



МИР

биологии и медицины

Эпигенетика

Второе издание

Под редакцией С.Д. Эллиса,
М.-Л. Капаррос, Т. Дженювейна, Д. Рейнберга;

помощник редактора Моника Лахнер

Перевод с английского
под редакцией д.б.н. И.А. Гамалей

ТЕХНОСФЕРА

Москва

2021

УДК 575
ББК 28.04
Э71

Э71 Эпигенетика

**/ Под редакцией С.Д. Эллиса, М.-Л. Капаррос, Т. Дженуейна, Д. Рейнберга;
помощник редактора Моника Лахнер. – 2-е изд.**

Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2021. – 1116 с. – ISBN 978-5-94836-624-1

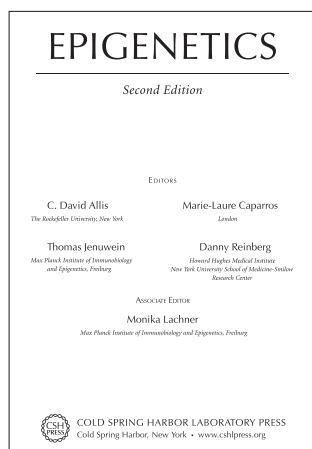
Во многих биологических процессах регуляция экспрессии генов включает эпигенетические механизмы. В новом издании «Эпигенетики» в 36 главах, написанных ведущими специалистами в этой области, описываются, объясняются и обсуждаются многообразные эпигенетические эффекты. В книге представлены различные молекулярные механизмы, лежащие в основе эпигенетической регуляции, обсуждаются клеточные процессы, которые зависят от такого рода регуляции, и дается обзор модельных организмов, у которых эпигенетические эффекты наиболее изучены.

Все главы предыдущего издания актуализированы, также добавлены новые главы, содержащие информацию о структуре, функции и динамике гистон-модифицирующих ферментов и гистон-взаимодействующих белков. Отдельные главы настоящей книги посвящены ремоделированию хроматина, метилированию ДНК, малым интерферирующим РНК и репрессии (сайленсингу) генов; инактивации X-хромосомы, дозовой компенсации и импринтингу; эпигенетике грибов, растений, насекомых и млекопитающих.

В книге рассматривается, как эпигенетические механизмы участвуют в клеточном делении и спецификации клеточного типа и как эпигенетические нарушения влияют на развитие рака и других заболеваний человека. Кроме того, рассматривается значимость эпигенетики для индуцированной плюрипотентности и репрограммирования клеток. В новых главах этого издания описывается участие эпигенетических процессов в наследовании, развитии нейронов, метаболизме и сигнализации, реакции клеток на окружающую среду, а также дальние хроматиновые взаимодействия, а серия коротких эссе освещает важные современные открытия.

Книга содержит оригинальные иллюстрации, которые помогут читателям понять механизмы эпигенетического контроля. Книга может стать пособием по изучению регуляции генов для студентов и аспирантов старших курсов, а также необходимым ресурсом для ученых, интересующихся этой быстро развивающейся областью.

УДК 575
ББК 28.04



Originally published in English as *Epigenetics*, Second Edition

Edited by C. David Allis, Marie- Laure Caparros, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg

Associate Editor Monika Lachner

© 2015 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA

© АО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление, 2021

Официальный русский перевод английского издания © 2015 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Перевод издан и распространяется с разрешения Cold Spring Harbor Laboratory Press, владельца всех прав и/или юридических полномочий на лицензирование, публикацию и распространение этого перевода.

ISBN 978-5-94836-624-1
ISBN 978-1-936113-59-0 (англ.)

Содержание

Предисловие, 5

Благодарности, 10

1. Краткая история эпигенетики, 12
Gary Felsenfeld

2. Следующее поколение: новые захватывающие открытия молодых ученых в области эпигенетических исследований, 23

Открытие гистоновых деметилаз, 25
Yujiang Geno Shi u Yu-ichi Tsukada

Репрограммирование клеток, 28
Kazutoshi Takahashi

днкРНК: связывание РНК с хроматином, 31
John L. Rinn

Энхансерные РНК: класс длинных некодирующих РНК, синтезированных в энхансерах, 34
Tae-Kyung Kim, Martin Hemberg u Jesse M. Gray

Расширение эпигенетического ландшафта: новые модификации цитозина в геномной ДНК, 38
Skirmantas Kriaucionis u Mamta Tahiliani

Мобильные малые РНК растений, 42
Patrice Dunoyer, Charles Melnyk, Attila Molnar u R. Keith Slotkin

Хроматин CpG-островков формируется за счет рекрутирования белков ZF-CxxC, 46
Neil P. Blackledge, John P. Thomson u Peter J. Skene

Ингибиторы бромодомена и экстратерминального домена (BETi) для терапии рака: химическая модуляция структуры хроматина, 49
Jun Qi

Фармакологическое ингибирование бромодомен-содержащих белков при воспалении, 52
Uwe Schaefer

Мутации гистона H3 при опухолях головного мозга у детей, 56
Xiaoyang Liu, Troy A. McEachron, Jeremy Schwartzentruber u Gang Wu

Фолдинг хромосом: водитель или пассажир эпигенетического состояния? 60
Tom Sexton u Eitan Yaffe

3. Общий обзор и основные понятия, 64
C. David Allis, Marie-Laure Caparros, Thomas Jenuwein, Monika Lachner, Danny Reinberg

4. Писатели и считыватели ацетилирования гистонов: структура, механизм и ингибирование, 144
Ronen Marmorstein u Ming-Ming Zhou

5. Стиратели ацетилирования гистонов: ферменты гистондеацетилазы, 173
Edward Seto u Minoru Yoshida

6. Структурная и функциональная координация метилирования ДНК и гистонов, 203
Xiaodong Cheng

7. Перспективы развития структурной биологии в области считывания эпигенетических меток метилирования гистонов и ДНК, 228
Dinshaw J. Patel

8. Эпигенетика дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, 283
Michael Grunstein u Susan M. Gasser

9. Эпигенетическая регуляция состояния хроматина у *Schizosaccharomyces pombe*, 313
Robin C. Allshire u Karl Ekwall

10. *Neurospora crassa* — модельная система для эпигенетических исследований, 341
Rodolfo Aramayo u Eric U. Selker

11. Эпигенетика инфузорий, 360
Douglas L. Chalker, Eric Meyer u Kazufumi Mochizuki

12. Эффект положения мозаичного типа, образование гетерохроматина и сайленсинг генов у *Drosophila*, 386
Sarah C. R. Elgin u Gunter Reuter

13. Эпигенетическая регуляция у растений, 416
Craig S. Pikaard u Ortrun Mittelsten Scheid

14. Мыши как модельные организмы для изучения эпигенетики, 452
Marnie Blewitt u Emma Whitelaw

15. Метилирование ДНК у млекопитающих, 483
En Li u Yi Zhang

16. РНКи и сборка гетерохроматина, 507
Robert Martienssen u Danesh Moazed
17. Транскрипционный сайленсинг, осуществляемый белками группы Polycomb, 527
Ueli Grossniklaus u Renato Paro
18. Регуляция транскрипции белками группы Trithorax, 555
Robert E. Kingston u John W. Tamkun
19. Дальнодействующие взаимодействия хроматина, 575
Job Dekker u Tom Misteli
20. Варианты гистонов и эпигенетика, 601
Steven Henikoff u M. Mitchell Smith
21. Ремоделирование нуклеосом и эпигенетика, 630
Peter B. Becker u Jerry L. Workman
22. Поддержание эпигенетической информации, 652
Geneviève Almouzni u Howard Cedar
23. Регуляция X-хромосом у *Caenorhabditis elegans*, 678
Susan Strome, William G. Kelly, Sevinc Ercan u Jason D. Lieb
24. Компенсация дозы у *Drosophila*, 701
John C. Lucchesi u Mitzi I. Kuroda
25. Компенсация дозы у млекопитающих, 721
Neil Brockdorff u Bryan M. Turner
26. Геномный импринтинг у млекопитающих, 748
Denise P. Barlow u Marisa S. Bartolomei
27. Зародышевая линия и плюрипотентные стволовые клетки, 771
Wolf Reik u M. Azim Surani
28. Индуцированная плюрипотентность и эпигенетическое репрограммирование, 797
Konrad Hochedlinger u Rudolf Jaenisch
29. Эпигенетический контроль иммунитета, 825
Meinrad Busslinger u Alexander Tarakhovsky
30. Метаболические сигналы хроматину, 854
Shelley L. Berger u Paolo Sassone-Corsi
31. Эпигенетическая регуляция у растений в ответ на действие окружающей среды, 880
David C. Baulcombe u Caroline Dean
32. Модификации гистонов и ДНК — регуляторы развития и функции нейронов, 901
Stavros Lomvardas u Tom Maniatis
33. Эпигенетика и болезни человека, 928
Huda Y. Zoghbi u Arthur L. Beaudet
34. Эпигенетические детерминанты злокачественных заболеваний, 959
Stephen B. Baylin u Peter A. Jones
35. Модификации гистонов и онкологические заболевания, 1000
James E. Audia u Robert M. Campbell
36. Значение хроматина: взгляд в будущее, 1037
Vincenzo Pirrotta
- Приложение 1: Интернет-источники, 1056
- Приложение 2: Полный каталог документированных модификаций гистонов, 1059
Yingming Zhao u Benjamin A. Garcia
- Приложение 3, 1084
- Предметный указатель, 1087

Задолго до того, как эпигенетика завершила свой путь от небольшой очень разнородной коллекции аномальных явлений до широко признанной области деятельности, имеющей собственное научное пособие, талантливая группа прозорливых молекулярных биологов заложила плодородный фундамент, на котором базируется современная биология хроматина и эпигенетика. В эту группу входили Vince Allfrey, Wolfram Hörz, Robert Simpson, Hal Weintraub, Jonathan Widom, Alan Wolffe и Abe Worcel. Эта книга посвящена памяти всей этой группы. Их пыл и приверженность идее изучения биологии хроматина вдохновили всех, кто следил за их работой, и сейчас их многочисленные проницательные догадки помогают нам.

Предисловие

С МОМЕНТА ПУБЛИКАЦИИ ПЕРВОГО издания сборника «Эпигенетика» издательством «Cold Spring Harbor Laboratory Press» в 2007 году, исследователи во всем мире, работающие в различных областях, имеющих отношение к эпигенетике, добились значительных успехов. Новичкам в этой области мы бы порекомендовали начать с обзорной главы (глава 3), чтобы ознакомиться с основными концепциями и получить общую информацию о направлениях, которые данная область охватывает. Редакционная группа обращает внимание на то, что, несмотря на большое количество перспективной информации, приведенной в данном сборнике, некоторые факты заслуживают особого внимания и достойны комментария в большем объеме, чем это планировалось в 2014 г. для этого издания.

Во-первых, благодаря существенным инновациям в технологиях секвенирования, которые часто называют «массивно-параллельным» или глубоким секвенированием (например, RNA-Seq или ChIP-Seq в масштабе генома), представленное в руководствах понятие о том, что поток генетической информации передается от ДНК к белку посредством информационной РНК, заметно изменилось. В настоящее время широко распространено мнение о том, что РНК играет множество самостоятельных ролей, что большая часть генома транскрибируется, и по некоторым оценкам достигает >90 %. Интересно, что только ~2 % транскриптов попадают в категорию информационных РНК, при этом высокая доля (~70 %) отвечает за дивергентно транскрибированные некодирующие (длинные или короткие) РНК (см. обзор Rinn J. L. в главе 2, а также Darnell, 2011; Guttman and Rinn, 2012). Определение функции этих некодирующих РНК остается одним из интенсивных направлений исследований, особенно в связи с появлением новых моделей, позволяющих предполагать, что эти РНК могут работать для интегрирования или обеспечения промежуточной структуры для хроматин-ремоделирующих и хроматин-модифицирующих комплексов ферментов, или

осуществления критических изменений в ядерной архитектуре посредством *cis*- или *trans*-механизмов, а также для обеспечения возможности рекрутировать факторы, которые сайленсируют домены хроматина (например, Polycomb) или способствуют транскрипции (например, посредник рекрутирования энхансерной РНК (eRNA), подробно рассмотренный Kim T.-K. с коллегами). Мы также обращаем внимание на интересные связи между выявленными модификациями гистонов и сплайсингом пре-иРНК (т.е. выявление интрона и экзона), чтобы подчеркнуть концепцию о том, что мир РНК расширяется и тесно связан с состояниями хроматина (Huff et al., 2010).

Во-вторых, достигнут заметный прогресс в документировании структур хроматин-связывающих модулей, которые считывают одну или несколько модификаций гистонов (см. новые главы в этой книге, написанные Cheng, Patel; Marmorstein and Zhou; а также Seto and Yoshida). Как можно понять смысл всей этой запутанной посттрансляционной модификации? Zhong с коллегами перенесли эпигеномику в масштабы всего генома (Xiao et al., 2012) и представили на рассмотрение то, что они называют «сравнительной эпигеномикой», в которой рассматривается локализация в клетках человека, мыши и свиньи впечатляющего набора эпигенетических меток (модификаций гистонов, геномные распределения метилирования цитозина, варианты гистонов, факторы транскрипции и т.д.), подразумевая эволюцию как полезный путеводитель для освещения функциональной значимости различных меток. Важно отметить, что сравнительная эпигеномика выявила регуляторные особенности генома, которые нельзя установить только путем сравнения последовательностей. Помимо более известных совместно ассоциирующих меток, таких как те, которые ассоциированы с бивалентными доменами (например, H3K4me3 и H3K27me3) на промоторах генов, регулируемых развитием, были идентифицированы другие высококонсервативные совместные метки.

Например, H3K27ac + H3K4me1/2 и H3K27ac + H3K4me2/3 метят активные элементы энхансеров и промоторов соответственно. Авторы этих результатов приходят к выводу, что общая проблема «наличия слишком большого количества комбинаций эпигенетических меток и незнания того, как отличить случайную колокализацию от функциональной, может быть преодолена с помощью эволюционного консерватизма». Мы аплодируем результатам этого исследования, поскольку они предоставляют свежий подход к пониманию сложностей эпигеномов. Мы также ждем с нетерпением других исследований, которые проводятся на базе заключений, сделанных с использованием эволюции в качестве гида.

В-третьих, остается фундаментальный вопрос о том, как наследуются какие-либо эпигенетические метки при нашем более полном понимании того, как метки метилирования цитозина в ДНК образуются во время репликации. Что касается гистоновых меток, то появляющиеся публикации предполагают наличие новых механизмов, которые включают аллостерическую регуляцию ключевых гистон-модифицирующих комплексов ферментов, при которой модификации на одном гистоновом хвосте, например, убиквитинирование гистона H2B (McGinty et al., 2008) или гистоновая метка H3K27me3 (Margueron et al., 2009), могут стимулировать нижележащую активность (например, DOT1L [KMT]) или инактивацию (например, PRC2) гистонметилтрансфераз (KMT) соответственно. Эти революционные исследования вместе взятые позволяют предположить, что новые ковалентные модификации могут быть введены в наивные матрицы хроматина, т.е. что существует потенциальный механизм наследования немодифицированных (в некоторых случаях — вновь синтезированных гистонов) и новых модифицированных состояний во время репликации и сборки хроматина, которые могут передаваться будущим поколениям. Мы с нетерпением ждем будущих исследований в этом направлении, особенно если они выполняются *in vivo* (мутанты гистонов и хроматиновой машинерии; см. Rando, 2012a) и *in vitro* (использование матриц «дизайнерского хроматина»; см. Fierz and Muir, 2012). Сложности этого «языка» связаны с точным определением перекрестного взаимодействия между метками гистонов, осложненным количеством и типом ковалентных модификаций в обоих гистоновых белках (например, моно- vs ди- vs трилизинное метилирование; ацетилирование лизина vs кротонилирование; симметричное vs асимметричное диметилирование аргинина) и ДНК (например, метилирование в сравнении с гидроксиметилированием по остаткам цитозина). Нет

сомнений в том, что расшифровка связей между модификациями гистонов, метилированием ДНК и некодирующими РНК дает надежду, что следующее поколение ученых, которое начнет свою деятельность в области общей эпигенетики, получит стимул и приложит необходимые усилия для исследований.

В-четвертых, варианты гистонов дают клеткам возможность для специальной разработки путей сборки хроматина, чтобы создавать различные его состояния в разных местоположениях генома. Мы предполагаем, что эволюция вариантов гистонов дала клетке регуляторные возможности, позволяющие ремоделировать матрицу хроматина способом, не соответствующим классическому принципу сопряжения синтеза гистонов с репликацией ДНК во время S-фазы (т.е. независимым от репликации депонированием гистонов; см. главу Henikoff and Smith). Поэтому неудивительно, что вариантам гистонов, особенно тем типам, которые не зависят от репликации, будут необходимы специальные механизмы и энергия для выполнения их задачи по «привлечению» и «сопровождению» гистонов на место в геноме. Совсем недавно в замечательной серии статей, инициатором которой были, в основном, ученые-медики, использующие секвенирование экзозома, были идентифицированы мутации в «эпигенетических регуляторах» при онкологических заболеваниях человека широкого спектра. Например, DAXX, ATRX и вариант H3.3 были связаны с онкогенезом (панкреатические нейроэндокринные опухоли, или сокращенно panNET; Jiao et al., 2011), что дает веские основания предполагать, что DAXX-опосредованная H3.3-специфическая сборка хроматина вводит в действие опухоль-супрессорную функцию ATRX-DAXX, что, вероятно, приводит к хромосомным аномалиям, включающим дисфункцию теломер. Возможно, самым большим сюрпризом стало открытие того, что мутации, вызывающие рак, существуют в самих гистон-кодирующих генах (см. обзор: Dawson and Kouzarides, 2012; You and Jones, 2012; Shen and Laird, 2013). Один из нас (C.D.A.), как известно, сказал: «Каждая аминокислота в гистонах имеет значение», но это утверждение трудно проверить на организме, в котором генетика гистонов нелегко отслеживается. Поскольку онкогенные мутации в настоящее время картированы на аминоконцах H3 в двух «горячих точках» — K27 и G34 — в различных группах детей с глиобластомой (с опухолью ствола и коры головного мозга соответственно) (см. Liu et al. [глава 2]), мы с нетерпением ждем информации, которая поможет диагностировать смертельные детские онкологические заболевания (литературу см. в обзоре Rheinbay et al., 2012). Мутация H3 в K36, возникающая с высокой частотой, тоже сцеплена с другими педиатрическими

видами рака (например, с хондробластомой; Behjati et al., 2013), что подчеркивает функциональную важность ковалентных модификаций по лизину в гистонах. Есть примеры и в отношении компонентов эпигенетического механизма болезней, не связанных раком (например, в путях связанных с неврологическими функциями и умственной отсталостью; см. Schaefer et al., 2011; Lotsch et al., 2013). Есть надежда, что рак и другие болезни (см. главы авторов Baylin and Jones; Audia and Campbell; Zoghbi and Beaudet; Qi, Schaefer; Liu et al.) будут поддерживать неослабевающий интерес к эпигенетике и к следующим соответствующим изданиям.

В-пятых, идея о том, что хроматин-ремоделирующие пути могут стать терапевтически полезными мишенями, обеспечивающими реверсию неправильного сайленсинга или активирования генов, поскольку сами гены не мутируют, привела к всеобщему признанию того, что разработка медикаментов, направленных на хроматин-зависимые мишени — это новый перспективный путь лечения в клинической онкологии. В частности, выявление измененного метилирования ДНК и активности ацетилазы гистонов (НАТ) в ряде видов рака человека, а также использование ингибиторов деацетилазы гистонов (HDAC) и метилирования ДНК в лечении рака человека убедительно это доказывают, ровно как и хорошо документированные генетические повреждения лизин-метилтрансфераз гистонов, таких как EZH2 (KMT6A), MMSET и др. Учитывая генетические связи с этими ключевыми ферментами, зависимыми от эпигенетики, были разработаны и протестированы низкомолекулярные ингибиторы с положительными терапевтическими результатами. Некоторые из этих ингибиторов разрешены к применению в США и широко используются в клинических испытаниях. Очевидно, что регуляторные сигналы, обеспечиваемые модификациями хроматина, произведут революцию в наших взглядах на рак по мере совершенствования новых моделей «эпигенетического канцерогенеза» (см. главу Audia and Campbell).

Каталитические ферменты — это не единственный класс эпигенетических регуляторов, которые, как было доказано, являются достойными лекарственными препаратами. В конце 2010 г. одна за другой появились две работы (Filippakopoulos et al., 2010; Nicodeme et al., 2010), в которых была представлена информация о том, что на гистоновые ацетилизин-связывающие карманы или бромодомены можно воздействовать малыми молекулами с полезным клиническим результатом (см. Schaefer and Qi [в главе 2] и главы, написанные Busslinger and Tarakhovsky, а также Marmorstein and Zhou). Более того, была заложена основа для столь же замечательного исследования, в котором был проведен

крупномасштабный структурный анализ семейства бромодоменов человека, который дал существенную информацию о молекулярной дискриминации, с помощью которой различные модули считывания гистоновое ацетилизина распознают разное окружение хроматина (Filippakopoulos et al., 2012). Мы рассчитываем, что такие исследования будут расширены на другие хроматин-считывающие «карманы» со свойственной им специфичностью, суля хорошие перспективы появления новых рубежей для изыскания новых лекарственных средств (Arrowsmith et al., 2012). И последнее в отношении потенциальных терапевтических мишеней: мы подчеркиваем, что гистоны — это не единственные физиологически соответствующие реципиенты этого ковалентного «языка». В настоящее время хорошо известно, что большие группы негистоновых белков модифицируются посредством элементов, которые первоначально были охарактеризованы как гистон-модифицирующие ферменты (например, ацетилирование и метилирование p53 посредством p300 (KAT3B) и Set7/9 (KMT7) соответственно, о чем первоначально сообщали Gu and Roeder (1997), а также Chuikov с коллегами (2004). «Мимикрия» под гистоны хорошо показана Tarakhovsky с коллегами (Sampath et al., 2007; Marazzi et al., 2012) с предположением, что эти механизмы распространяют свое влияние далеко за пределы гистоновых белков (Sims and Reinberg, 2008).

В конечном счете, корни эпигенетики уходят в проблемы биологии развития, сформулированные Waddington с коллегами (см. главу Felsenfeld). Упаковка хроматина эволюционировала так, что определенные гены в ней могут быть менее или более доступными для транскрипционных и других факторов, которые должны вовлекать истинную генетическую матрицу (см. заключительную главу Pirrotta). Хотя может быть и нет сомнений в том, что мы вступаем в «постгеномную» или «эпигеномную» эру, мы признаем что в основе репрограммирования дифференцированных клеток из более плюрипотентных эмбриональных, вероятно, лежат транскрипционные сети. Лучше всего это иллюстрируется получением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) в работе Yamanaka с коллегами (2006), в которой факторы транскрипции основных генов плюрипотентности (например, Oct-3/4, Sox2, c-Мус и Klf4) вводили в неплюрипотентные клетки — фибробласты взрослых мышей; было показано, что таким образом можно репрограммировать (или дедифференцировать) клетки обратно в более плюрипотентное или тотипотентное состояние (Takahashi and Yamanaka, 2006). Эти новаторские исследования основываются на первых работах Gurdon с коллегами, которые давно продемонстрировали, что соматические зрелые ядра могут быть

репрограммированы, если они пересажены в яйцеклетку (ооцит) (Gurdon et al., 1958). Хотя значимость «основных регуляторов» транскрипции не может ставиться под сомнение, низкая эффективность репрограммирования, стабильность индуцированных состояний и тенденция репрограммированных клеток к изменению в сторону неопластического состояния позволяют предполагать, что поддержку хроматина или «барьеры» для процесса репрограммирования еще предстоит полностью понять (Soufi et al., 2012; Chen et al., 2013). Редакторам приятно, что открытие индуцированной плюрипотентности в этом руководстве описано Takahashi (глава 2), а тема «репрограммирования» в целом посвящена глава, написанная Hochedlinger and Jaenisch. Кроме того, к направлениям, в которых эпигенетика тесно переплетается с вопросами биологии развития, имеют отношение главы, написанные Grossniklaus and Paro; Kingston and Tamkun; а также Reik and Surani.

В заключение нужно отметить, что в этом предисловии освещены лишь несколько перспективных областей, появившихся после публикации первого издания. В нашем обзоре и в следующих главах мы не только продолжим раскрывать эти области, но и затронем многие другие. Кроме того, в это издание включены короткие обзоры молодых ученых, сделавших важные открытия, которые задали новые и перспективные направления в области эпигенетики. Их очерки касаются истории того, как были сделаны эти открытия. Даже беглое сравнение первого и второго изданий этой книги показывает существенный прогресс, достигнутый в области эпигенетики в период между двумя изданиями. Добавлены двенадцать новых глав и значительно обновлены все главы, ранее опубликованные. Например, рис. 3.3 в главе 3 (как и в первом издании) показывает, что эпигенетические изменения в сравнении с истинной генетикой могут быть нестабильными или частью истинного наследования генеративной линии. Однако давняя дискуссия по сравнению различий между врожденными и приобретенными характеристиками (теория Ламарка) пересматривается заново в свете новых исследований, показывающих, что факторы окружающей среды могут обеспечивать адаптивные ответы посредством некодирующих РНК в соматических и генеративных клеточных линиях (Ashe et al., 2012; Lee et al., 2012; Rando, 2012b). Совершенно ясно, что новые открытия, движимые, возможно, читателями этого издания, образуют базу материалов для других изданий, которые выведут нас за рамки нашего нынешнего понимания. Биологи развития из прошлого взирают на нас, должно быть, с большим удовольствием.

Цель этого сборника, как и первого, — повысить осведомленность новичков и опытных

исследователей по ключевым концепциям, которые формируют широкую область эпигенетики и направляют ее развитие. Некоторые изречения подчеркивают общую проблему, к которой адресовано наше научное пособие: «Мы — нечто большее, чем сумма наших генов» (Klar, 1998); «Вы можете унаследовать что-то помимо последовательности ДНК. Вот что сейчас по-настоящему волнует» (Watson, 2003); или заголовок на обложке журнала «Time» (2010): «Почему ваша ДНК — это не ваша судьба» (Cloud, 2010). Не похоже, что развитие эпигенетики замедляется; более того, показатель ее цитируемости в литературе продолжает расти. Мы надеемся, что читатели этого научного пособия разделят наш энтузиазм и в то же время вдохновятся на попытку решения многих проблем, которые остаются неразгаданными или не до конца изученными. Мы благодарны всем, кто внес вклад в то, что это давно ожидаемое издание стало реальностью.

ЛИТЕРАТУРА

- Arrowsmith C. H., Bountra C., Fish P. V., Lee K., Schapira M. 2012. Epigenetic protein families: A new frontier for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11: 384–400.
- Ashe A., Sapetschnig A., Weick E. M., Mitchell J., Bagijn M. P., Cording A. C., Doebley A. L., Goldstein L. D., Lehrbach N. J., Le Pen J. et al. 2012. piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*. *Cell* 150: 88–99.
- Behjati S., Tarpey P. S., Presneau N., Scheipl S., Pillay N., Van Loo P., Wedge D. C., Cooke S. L., Gundem G., Davies H. et al. 2013. Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat. Genet.* 45: 1479–1482.
- Chen J., Liu H., Liu J., Qi J., Wei B., Yang J., Liang H., Chen Y., Chen J., Wu Y. et al. 2013. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat. Genet.* 45: 34–42.
- Chuiikov S., Kurash J. K., Wilson J. R., Xiao B., Justin N., Ivanov G. S., McKinney K., Tempst P., Prives C., Gambelin S. J. et al. 2004. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432: 353–360.
- Cloud J. 2010. Why genes aren't destiny. *Time* 175: 48–53.
- Darnell J. E. 2011. *RNA: Life's indispensable molecule*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Dawson M. A., Kouzarides T. 2012. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* 150: 12–27.
- Fierz B., Muir T. W. 2012. Chromatin as an expansive canvas for chemical biology. *Nat. Chem. Biol.* 8: 417–427.
- Filippakopoulos P., Qi J., Picaud S., Shen Y., Smith W. B., Fedorov O., Morse E. M., Keates T., Hickman T. T., Felletar I. et al. 2010. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468: 1067–1073.
- Filippakopoulos P., Picaud S., Mangos M., Keates T., Lambert J. P., Barsyte-Lovejoy D., Felletar I., Volkmer R., Muller S., Pawson T. et al. 2012. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* 149: 214–231.

- Gu W., Roeder R. G. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90: 595–606.
- Gurdon J. B., Elsdale T. R., Fischberg M. 1958. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182: 64–65.
- Guttman M., Rinn J. L. 2012. Modular regulatory principles of large noncoding RNAs. *Nature* 482: 339–346.
- Huff J. T., Plocik A. M., Guthrie C., Yamamoto K. R. 2010. Reciprocal intronic and exonic histone modification regions in humans. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 1495–1499.
- Jiao Y., Shi C., Edil B. H., deWilde R. F., Klimstra D. S., Maitra A., Schulick R. D., Tang L. H., Wolfgang C. L., Choti M. A. et al. 2011. DAXX/ATR, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 331: 1199–1203.
- Klar A. J. 1998. Propagating epigenetic states through meiosis: Where Mendel's gene is more than a DNA moiety. *Trends Genet.* 14: 299–301.
- Lee H. C., Gu W., Shirayama M., Youngman E., Conte D. Jr., Mello C. C. 2012. C. elegans piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts. *Cell* 150: 78–87.
- Lotsch J., Schneider G., Reker D., Parnham M. J., Schneider P., Geisslinger G., Doehring A. 2013. Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends Mol. Med.* 19: 742–753.
- Marazzi I., Ho J. S., Kim J., Manicassamy B., Dewell S., Albrecht R. A., Seibert C. W., Schaefer U., Jeffrey K. L., Prinjha R. K. et al. 2012. Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic. *Nature* 483: 428–433.
- Margueron R., Justin N., Ohno K., Sharpe M. L., Son J., Drury W. J. 3rd, Voigt P., Martin S. R., Taylor W. R., De Marco V. et al. 2009. Role of the Polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461: 762–767.
- McGinty R. K., Kim J., Chatterjee C., Roeder R. G., Muir T. W. 2008. Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1 L-mediated intranucleosomal methylation. *Nature* 453: 812–816.
- Nicodeme E., Jeffrey K. L., Schaefer U., Beinke S., Dewell S., Chung C. W., Chandwani R., Marazzi I., Wilson P., Coste H. et al. 2010. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468: 1119–1123.
- Rando O. J. 2012a. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: Revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 148–155.
- Rando O. J. 2012b. Daddy issues: Paternal effects on phenotype. *Cell* 151: 702–708.
- Rheinbay E., Louis D. N., Bernstein B. E., Suva M. L. 2012. A tell-tail sign of chromatin: Histone mutations drive pediatric glioblastoma. *Cancer Cell* 21: 329–331.
- Sampath S. C., Marazzi I., Yap K. L., Sampath S. C., Krutchinsky A. N., Mecklenbrauer I., Viale A., Rudensky E., Zhou M. M., Chait B. T. et al. 2007. Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly. *Mol. Cell* 27: 596–608.
- Schaefer A., Tarakhovsky A., Greengard P. 2011. Epigenetic mechanisms of mental retardation. *Prog. Drug. Res.* 67: 125–146.
- Shen H., Laird P. W. 2013. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 153: 38–55.
- Sims R. J. III, Reinberg D. 2008. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 815–820.
- Soufi A., Donahue G., Zaret K. S. 2012. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151: 994–1004.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676.
- Watson J. D. 2003. Celebrating the genetic jubilee: A conversation with James D. Watson. Interviewed by John Rennie. *Sci. Am.* 288: 66–69.
- Xiao S., Xie D., Cao X., Yu P., Xing X., Chen C. C., Muselman M., Xie M., West F. D., Lewin H. A. et al. 2012. Comparative epigenomic annotation of regulatory DNA. *Cell* 149: 1381–1392.
- You J. S., Jones P. A. 2012. Cancer genetics and epigenetics: Two sides of the same coin? *Cancer Cell* 22: 9–20.

Благодарности

КАК ЭТО, ВЕРОЯТНО, ПРОИСХОДИТ С КАЖДЫМ КРУПНЫМ предприятием по выпуску научного пособия, кажется, что проект вырастает из своих исходных рамок по многим причинам, по которым книга когда-либо выходит в свет. Это в самой полной мере относится к выпуску второго издания научного пособия «Эпигенетика». Границы были расширены: увеличилось количество глав, а также объем нашей главы, содержащей обзор и описание концепций. Почему? Здесь мы можем только предположить, что это частично связано с захватывающей наукой, которая представляет собой совместное поле деятельности, связанной с эпигенетикой.

Мы очень благодарны всем авторам, чьи работы вошли в это второе издание, — некоторым из первого издания этой книги, а также многим новеньким. Особую благодарность нужно выразить молодым ученым, которые приостановили свои работы, чтобы в статьях, представленных во второй главе, поделиться с нами некоторой информацией из первых рук о том, что лежало в основе захватывающих открытий, сделанных ими и их коллегами, которые помогают делать эту область науки такой, какая она есть сейчас. Именно старание и внимательность всех этих авторов составляют сущность этой книги; их знания и опыт делают это научное пособие тем, чем мы и задумывали — самым свежим подробным научным пособием по перспективному направлению эпигенетики. По каждой главе и статье мы консультировались с приглашенными экспертами, которые высказали свое мнение в своих конструктивных комментариях, позволив сделать статьи максимально точными и современными. Мы благодарим их всех.

Как и в случае с первым изданием, мы благодарны John Inglis за его инициативу и поддержку при подготовке второго издания, а также всем сотрудникам издательства «Cold Spring Harbor Laboratory Press» (Inez Sialiano, Kathy Bubbeo, Richard Sever, Jan Argentine и Denise Weiss), которые были главными действующими лицами в этом начинании. Что касается второго издания, редакторы должны выразить им особую благодарность, поскольку мы испытывали их предел прочности бесконечными задержками и настойчивыми просьбами, вызывающими отставание от графика. Мы также ценим, что издательство «Cold Spring Harbor Laboratory Press» обеспечивает доступ ко всем главам научного пособия в режиме онлайн на сайте «CSH Perspectives in Biology», чтобы на каждую работу можно было сослаться как на оригинальную статью. Все помощники редактора (Marisa Cerio (C.D.A.), Marcela Mare (T.J.) и Michele Giunta (D.R.)) также проявили исключительное

терпение, изо всех сил стараясь организовать бесчисленные звонки, встречи и составлять расписания, чтобы все это произошло.

Особую благодарность необходимо направить двум людям, которые, как и все, кто был вовлечен в работу над вторым изданием, досконально знают содержание каждой страницы, каждое предложение и слово в этом научном пособии. Короче говоря, Marie-Laure Caparros и Monika Lachner превратили это научное пособие в реальность. От оценки текста до напряженной обстановки, от составления ссылок до метания молний, от проверки цифр до разочарования, от подготовки приложений до беспокойства — они прошли через это все. Откуда берется их терпение? Никто не знает, но мы трое предполагаем, что они обе обладают какой-то формой в значительной степени своеобразной генетики и эпигенетики. Не передать словами, насколько мы благодарны за вашу потрясающую работу, старание и внимательность к мелким деталям, которые превращают хорошее научное пособие в превосходное, как мы надеемся.

Наконец, мы трое признаем свою ответственность за любые ошибки или оплошности в этом научном пособии. Многие задаются вопросом, — в чем причина того, это второе издание так долго не публиковалось? В какой черной дыре исчезли эти сроки? Причинами этих задержек была, вероятно, медлительность с нашей стороны. Пожалуйста, примите наши извинения. Все же мы получили удовольствие при решении задачи попытаться представить множество достижений в области эпигенетики в такой форме, которая привлечет читателей этого научного пособия и они присоединятся к нам с подлинным воодушевлением, которое должно у них появиться.

Финансовая поддержка при издании этой книги была оказана издательством «Cold Spring Harbor Laboratory Press» (г. Нью-Йорк). Рокфеллеровский университет (г. Нью-Йорк), медицинская школа Нью-Йоркского университета (г. Нью-Йорк) и институт иммунобиологии и эпигенетики Макса Планка (г. Фрайбург, Германия) предоставили дополнительные средства на обработку текста этой книги.

C. David Allis, *Рокфеллеровский университет, г. Нью-Йорк*
Thomas Jenuwein, *институт иммунобиологии и эпигенетики Макса Планка, г. Фрайбург*
Danny Reinberg, *медицинская школа Нью-Йоркского университета, исследовательский центр «Смайлоу»*

15 сентября 2014 г.



(Слева направо) Monika Lachner, Thomas Jenuwein, Danny Reinberg, Marie-Laure Caparros и David Allis на совещании редакторов в Нью-Йорке.

ГЛАВА 1

Краткая история эпигенетики

Gary Felsenfeld

*National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney,
National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20892-0540
e-mail: garyf@intra.niddk.nih.gov*

РЕЗЮМЕ

Термин «эпигенетика» первоначально использовался для обозначения слабоизученных процессов, в ходе которых оплодотворенная зигота развивается в зрелый сложный организм. По мере понимания того, что все клетки организма несут одну и ту же ДНК, и с расширением знаний о механизмах экспрессии генов определение было изменено, чтобы указать на способы, посредством которых наследуемые признаки могут быть связаны не с изменениями нуклеотидной последовательности, а с химическими модификациями ДНК или связанными с ней структурными и регуляторными белками. Недавнее открытие роли этих механизмов в раннем развитии может сделать желательным возврат к исходному определению эпигенетики.

СОДЕРЖАНИЕ

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1. Введение, 13 | 4. Роль метилирования ДНК, 15 |
| 2. Ключи от генетики и биологии развития, 13 | 5. Роль хроматина, 16 |
| 3. Во всех соматических клетках организма ДНК одинакова, 15 | 6. Все механизмы взаимосвязаны, 19 |
| | Литература, 20 |

1. ВВЕДЕНИЕ

История эпигенетики связана с исследованиями эволюции и развития. Но за последние 50 лет значение самого термина «эпигенетика» претерпело эволюцию, сопоставимую с резко возросшим объемом знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе регуляции экспрессии генов у эукариот. Современные определения эпигенетики отражают наше понимание того, что, хотя набор ДНК, по существу, одинаков во всех соматических клетках организма, паттерны экспрессии генов сильно различаются у клеток разных типов и эти паттерны могут быть клонально унаследованы. Это привело к формированию рабочего определения, которое выглядит следующим образом: «Эпигенетика — это сфера исследований митотически и (или) мейотически наследуемых изменений в генной функции, которые нельзя объяснить изменениями в нуклеотидной последовательности ДНК» (Riggs et al., 1996; Riggs and Porter, 1996). Совсем недавно к этому определению было добавлено ограничение, согласно которому инициация нового эпигенетического состояния должна включать в себя временной механизм, отличный от того, который требуется для его поддержания (Berger et al., 2009). Однако до 1950-х годов слово «эпигенетика» использовали в более широком смысле (и менее точно) — для обозначения всех событий развития, ведущих от оплодотворения зиготы к формированию зрелого организма, то есть всех регуляторных процессов, которые, начиная с генетического материала, формируют конечный продукт (Waddington, 1953). Эта концепция берет свое начало в гораздо более ранних исследованиях в области клеточной биологии и эмбриологии начиная с конца XIX столетия, которые заложили фундамент нашего сегодняшнего понимания взаимоотношений между генами и развитием. Долгое время среди эмбриологов шли горячие споры о природе и локализации компонентов, ответственных за реализацию плана развития организма. В своих попытках осмыслить большое число остроумных, но в конечном счете противоречивых экспериментов по манипулированию клетками и зародышами эмбриологи разделились на две школы: на тех, кто думал, что каждая клетка содержит преформированные элементы, которые в ходе развития лишь увеличиваются в размерах (преформизм), и тех, кто полагал, что этот процесс включает в себя химические реакции между растворенными компонентами, которые и реализуют сложный план развития (эпигенез). Эти школы сфокусировались на рассмотрении относительного значения ядра и цитоплазмы для процессов развития организма. Хотя определение, которое мы выбрали для эпигенетики, изменилось, чтобы отразить наши увеличившиеся знания,

важно помнить, что первоначальная проблема заключалась в следующем: как одна оплодотворенная яйцеклетка может дать начало сложному организму с клетками различных фенотипов?

Вслед за открытием существования хромосом, сделанным Флемингом в 1879 году, опыты, проведенные многими исследователями, в том числе Вильсоном и Бовери, дали надежное доказательство того, что программа развития находится в хромосомах. В конечном счете Томас Гент Морган (Morgan, 1911) привел наиболее убедительные доказательства этой идеи, продемонстрировав генетическое сцепление нескольких генов *Drosophila* с X-хромосомой. Начиная с этого момента был достигнут быстрый прогресс в создании линейных карт хромосом, в которых отдельные гены были локализованы в специфических участках на хромосомах *Drosophila* (Sturtevant, 1913). Конечно, оставались без ответа классические вопросы «эпигенеза»: какие молекулы внутри хромосом несут генетическую информацию, каким образом они направляют программу развития и как эта информация передается при клеточном делении. Было известно, что в хромосомах присутствуют и нуклеиновая кислота, и белки, но их относительный вклад не был очевиден; конечно, никто не верил, что нуклеиновая кислота одна может нести всю информацию о развитии. Более того, оставались более старые вопросы о возможном вкладе цитоплазмы в процессы развития. Данные по генетике *Drosophila* (см. раздел 2) заставляли считать, что наследуемые изменения в фенотипе могут происходить без соответствующих изменений в «генах». Характер этих дискуссий резко изменился, когда ДНК была идентифицирована как основной носитель генетической информации. В конечном счете оказалось полезным переосмыслить определение эпигенетики таким образом, чтобы различать те наследуемые изменения, которые возникают в результате изменений в нуклеотидной последовательности ДНК, и те, которые с ними не связаны. Более детальное понимание основных механизмов сопровождалось дальнейшим уточнением определения эпигенетики, но на данном этапе может оказаться бесполезной попытка достичь предельной точности в описании очень сложных регуляторных процессов, в которых переплетаются «эпигенетические» и «неэпигенетические» компоненты.

2. КЛЮЧИ ОТ ГЕНЕТИКИ И БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Что бы ни происходило с этим определением, с начала XX столетия неуклонно накапливались идеи и научные данные, лежащие в основе современного понятия «эпигенетика». В 1930 году Герман Мёллер (Muller, 1930) описал у *Drosophila* класс

мутаций, которые он назвал *eversporting displacements* (*eversporting* в данном случае обозначает высокую частоту фенотипического изменения). Эти мутанты были связаны с хромосомными транслокациями (*displacements*), но «даже тогда, когда все части хроматина, по всей видимости, были представлены в нормальной дозе (хотя и были ненормально расположены относительно друг друга), фенотипический результат не всегда был нормальным». В некоторых из этих случаев Мёллер наблюдал мух, у которых были пятнистые глаза. Он думал, что это, вероятно, связано с «генетическим разнообразием различных клеток, формирующих глаз», но дальнейший генетический анализ привел его к тому, чтобы связать необычные свойства с хромосомной перестройкой; он сделал вывод, что «с этим как-то связаны, скорее, хромосомные участки, влияющие одновременно на различные признаки, чем отдельные гены или гипотетические “генные элементы”». На протяжении последующих 10–20 лет убедительные данные, полученные во многих лабораториях (Hannah, 1951), подтвердили, что эта пятнистость, мозаичность возникает тогда, когда перестройки ставят рядом ген белых глаз и гетерохроматиновые районы.

В течение этого периода хромосомные перестройки всех типов были объектом огромного внимания. Было очевидно, что гены не являются полностью независимыми объектами: на их функционирование может влиять их локализация в геноме, как было многократно показано на многих мутантах *Drosophila*, которые приводили к мозаичности, а также на других мутантах, связанных с транслокациями в эухроматиновые районы, у которых можно было наблюдать эффекты положения более общего типа (не мозаичного). Стала также ясной — главным образом благодаря работам МакКлинток (McClintock, 1965) — роль перемещаемых элементов в генетике растений, хотя они, вероятно, не участвуют в нормальном развитии.

Вторая линия доказательств берет свое начало в исследованиях процессов развития. Было очевидно, что во время развития имеет место дивергенция фенотипов среди дифференцирующихся клеток и тканей, и оказалось, что такие различные особенности фенотипа, однажды установившись, могут клонально наследоваться делящимися клетками. Хотя на этом этапе стало понятно, что существует программирование, специфичное для определенного типа клеток, и что оно может быть передано дочерним клеткам, однако, каким образом это происходит, было не совсем понятно.

Был предложен и рассмотрен целый ряд механизмов. В частности, исследователями-биохимиками клетка характеризовалась многочисленными взаимозависимыми биохимическими реакциями, которые поддерживают ее идентичность. Например,

в 1949 году Макс Дельбрюк (Delbruck, цит. в Jablonka and Lamb, 1995) предположил, что простая пара биохимических цепей реакций, каждая из которых продуцирует в качестве промежуточного вещества ингибитор другого пути, могла бы в результате давать систему, способную переключаться между двумя устойчивыми состояниями. Несколько позже были обнаружены реальные примеры таких систем — в Лас-опероне *Escherichia coli* (Novick and Weiner, 1957) и в переключении фага между лизогенным и литическим состояниями (Ptashne, 1992). Функционально эквивалентные модели можно предположить и для эукариот. Виды самостабилизирующихся ингибиторных и стимулирующих механизмов, наблюдаемых у лямбда-фага, на самом деле в гораздо более сложной форме встречаются и у высших организмов. У эмбриона морского ежа, например, развитие происходит через создание и развитие ряда самостабилизирующихся регуляторных сетей. Однако важно осознавать существенное различие между прокариотической и эукариотической системами: в случае морского ежа каждый из регуляторных «модулей» не находится в статическом состоянии, а скорее принимает от других модулей и отправляет им сигналы, которые дают начало изменяющемуся, зависящему от времени фенотипу, связанному с развивающимся эмбрионом. Следует также отметить, что, хотя структура и биохимия хроматина, безусловно, должны быть вовлечены в реализацию этой программы (см. раздел 5), система может быть полностью смоделирована с точки зрения контроля экспрессии генов путем специфического связывания факторов транскрипции с регуляторными областями соответствующих генов.

Предметом живого интереса и дискуссий был, конечно, сравнительный вклад ядра и цитоплазмы в передачу дифференцированного состояния в развивающемся эмбрионе; самостабилизирующаяся цепь биохимических реакций предположительно должна была поддерживаться сквозь череду клеточных делений. Второй тип эпигенетической передачи был четко продемонстрирован на примере *Paramecium* и других инфузорий, у которых картина расположения ресничек могла варьироваться у отдельных особей и наследоваться клонально (Beisson and Sonneborn, 1965). Результатом изменения этого кортикального паттерна с помощью микрохирургии была передача нового паттерна последующим поколениям. Было высказано предположение, что сходные механизмы работают и у многоклеточных организмов, у которых локальные цитоплазматические детерминанты влияют на организацию клеточных компонентов таким образом, что эта организация может передаваться при клеточном делении (Grimes and Aufderheide, 1991).

3. ВО ВСЕХ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ОРГАНИЗМА ДНК ОДИНАКОВА

Хотя морфология хромосом показывала, что все соматические клетки обладают полным набором хромосом, было далеко не очевидно, что все соматические клетки сохраняют полный набор ДНК, присутствующий в оплодотворенном яйце. До появления работ Эйвери, Маклауда и Маккарти (Avery et al., 1944), а также Херши и Чейза (Hershey and Chase, 1952) не было даже известно, что молекула ДНК, не содержащая белков, может нести генетическую информацию — вывод, подкрепленный исследованиями Уотсона и Крика, которые определили структуру ДНК в 1953 г. Работы Бриггса и Кинга (Briggs and King, 1952), изучавших *Rana pipiens*, и Ласки и Гердона (Laskey and Gurdon, 1970), занимавшихся исследованием на *Xenopus*, показали, что результатом введения в денуклеированные ооциты ядер, взятых из ранних эмбриональных клеток, может быть развитие эмбриона. Но даже в 1970 году Ласки и Гердон отмечали: «Предстоит еще доказать, что соматические клетки взрослого животного имеют гены помимо тех, которые необходимы для их собственного роста и дифференцировки». В статье, содержащей это утверждение, они продемонстрировали, что в первом приближении ДНК ядра соматической клетки, введенная в денуклеированную, была способна направлять последнюю по пути эмбриогенеза. Было ясно, что программа развития и специализация всего спектра экспрессии, наблюдаемая в соматических клетках, должны задействовать сигналы, которые не являются результатом какой-то делеции или мутации в нуклеотидной последовательности ДНК зародышевого пути, когда эта ДНК передается соматическим клеткам. В то же время другие эксперименты выявили, что эти сигналы могут обеспечивать фенотипическую стабильность на протяжении многих поколений клеточных делений. Даже после того как недифференцированные клетки имагинального диска *Drosophila* были трансплантированы и культивированы последовательным поколениям взрослых мух, они сохраняли свой специфичный для диска паттерн дифференцировки при переносе личинкам (Nadorn, 1965; McClure and Schubiger, 2007).

Конечно, существуют способы, посредством которых ДНК соматических клеток может стать отличающейся от ДНК клеток зародышевого пути с соответствующими последствиями для фенотипа клетки: например, как показали работы Барбары МакКлинток и других специалистов по генетике растений, мобильные элементы могут изменять картину экспрессии в соматических клетках. Аналогичным образом генерация разнообразия антител связана с перестройками ДНК в череде поколений

линии соматических клеток. Эта перестройка (или, точнее, ее последствия) может рассматриваться как своего рода эпигенетическое событие, сопоставимое с ранними наблюдениями эффекта положения мозаичного типа, описанного Меллером (1930). Однако значительная часть работ по эпигенетике в последние годы была сосредоточена на системах, в которых не происходило никаких перестроек ДНК, и, следовательно, акцент делался на модификациях оснований и на белках, образующих комплексы с ДНК в ядре.

4. РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Инактивация X-хромосомы у мышей явилась одной из первых моделей эпигенетического механизма этого рода, не связанного с перестройками в ДНК (Ohno et al., 1959; Lyon, 1961). Молчащая X-хромосома явно выбиралась случайным образом, а затем клонально наследовалась в соматических клетках, и не было никаких данных об изменениях в самой нуклеотидной последовательности ДНК. Отчасти для объяснения этого типа инактивации Риггс (Riggs, 1975) и Холлидей и Пью (Holliday and Pugh, 1975) предположили, что в качестве эпигенетической метки могло бы выступать метилирование ДНК. Ключевыми моментами этой модели были представления о том, что сайты метилирования являются палиндромными и что за метилирование немодифицированной ДНК и ДНК, уже метилированной по одной нити, отвечают разные ферменты. Они постулировали, что первое событие метилирования происходит значительно труднее, чем второе; однако, коль скоро первая нить модифицирована, комплементарная нить будет быстро модифицирована в том же палиндромном сайте. Метильная метка, присутствующая на родительской нити ДНК, после репликации могла бы копироваться на дочернюю нить, и в результате происходила бы надежная передача метилированного состояния следующему поколению. Вскоре после этого Берд воспользовался тем, что главной мишенью метилирования у животных является последовательность CpG (Daskocil and Sorm, 1962), для того чтобы предложить использовать чувствительные к метилированию ферменты рестрикции как способ выявления метилированного состояния. Последующие исследования (Bird and Southern, 1978; Bird, 1978) показали затем, что эндогенные сайты CpG были либо полностью неметилированы, либо полностью метилированы. Предсказания, сделанные на основе этой модели, были, таким образом, подтверждены; тем самым был установлен механизм эпигенетической передачи метильной метки посредством полуконсервативного воспроизведения паттерна метилирования.

В годы, последовавшие за этими открытиями, огромное внимание было уделено эндогенным

паттернам метилирования ДНК, возможной передаче этих паттернов через зародышевый путь, роли метилирования ДНК в сайленсинге генной экспрессии, возможным механизмам инициации или ингибирования метилирования в полностью неметилированном сайте и идентификации ферментов, ответственных за метилирование *de novo* и за поддержание метилирования на уже метилированных сайтах. Также возник большой интерес к возможным механизмам удаления метильной группы из метилированных остатков цитозина (или самого 5mC), что происходит на ранних стадиях развития и в зародышевой линии. Очевидно, степень, до которой метилирование ДНК может становиться эпигенетической меткой, сохраняющейся через зародышевую линию, определяется тем, какие сайты смогут «пережить» события деметилирования. Хотя значительный объем метилирования ДНК, наблюдаемый у позвоночных, связан с повторяющимися и ретровирусными последовательностями и может служить для поддержания этих последовательностей в перманентно «молчащем» состоянии, не может быть никаких сомнений в том, что во многих случаях эта модификация обеспечивает основу для эпигенетической передачи статуса генной активности. Наиболее четко это продемонстрировано на таких импринтированных локусах (Cattanach and Kirk, 1985), как локус *Igf2/H19* мыши или человека, в котором один аллель маркирован метилированием ДНК, что, в свою очередь, контролирует экспрессию с обоих генов (Bell and Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000; Kanduri et al., 2000). В то же самое время было ясно, что это не может быть единственным механизмом для эпигенетической передачи информации. Например, как отмечено в разделе 2, эффект положения мозаичного типа наблюдали за много лет до этого у *Drosophila* — организма, который обладает крайне низким уровнем метилирования ДНК. Более того, в последующие годы генетики, работавшие с *Drosophila*, идентифицировали группы генов *Polycomb* и *Trithorax*, которые, по-видимому, вовлечены в постоянно «заблокированное» состояние активности (либо «выключенное», либо «включенное» соответственно) кластеров генов в течение развития. Тот факт, что эти состояния стабильно передавались в череде клеточных делений, позволял предполагать, что в основе этого процесса лежит эпигенетический механизм.

5. РОЛЬ ХРОМАТИНА

Многие годы признавалось, что белки, связанные с ДНК в эукариотном ядре, особенно гистоны, могут участвовать в модификации свойств ДНК. Задолго до начала работ по метилированию ДНК Стедман и Стедман (Stedman and Stedman, 1950)

предположили, что гистоны могут действовать как общие репрессоры экспрессии генов. Они писали, что, поскольку все соматические клетки организма имеют одно и то же число хромосом, они имеют одинаковый генетический набор (хотя, как отмечается в разделе 3, это оставалось недоказанным еще несколько лет). Понимание тонкой природы модификаций гистонов было в далекой перспективе, так что Стедманы оперировали предположением, что разные типы клеток в организме, чтобы генерировать наблюдаемые различия в фенотипе, должны обладать различными типами гистонов. Гистоны действительно могут снижать содержание транскриптов неактивных генов у прокариот. Последующая работа касалась изучения способности хроматина служить матрицей для транскрипции и была направлена на решение вопроса о том, ограничена ли эта способность специфичным типом клеток. Другие результаты показали, что только небольшая часть ДНК, упакованная в виде хроматина, была доступна для зондов, сцепленных с ферментами (Cedar and Felsenfeld, 1973). Тем не менее был период, когда все полагали, что гистоны являются супрессорными белками, которые пассивно подавляют экспрессию генов. С этой точки зрения, активация гена означает просто «сдирание» с него гистонов; считалось, что коль скоро это сделано, транскрипция будет осуществляться, почти как у прокариот. Имелись, однако, некоторые данные о том, что в эукариотических клетках нет более или менее протяженных районов открытой ДНК (Clark and Felsenfeld, 1971), что сосредоточило внимание на промоторах и других специфических регуляторных сайтах. Более того, даже если модель «голой» ДНК является правильной, было неясно, каким образом принимается решение о том, какие из покрытых гистонами участков должны быть освобождены.

Работы по решению этой проблемы начались еще в 1964 году, когда Олфри и Мирски (Allfrey and Mirsky, 1964) высказали спекулятивное соображение, что с активацией генов могло бы коррелировать ацетилирование гистонов и что «активный» хроматин не обязательно должен быть лишен гистонов. В последующее за этим десятилетие наблюдался огромный интерес к изучению взаимоотношений между модификациями гистонов и экспрессией генов. Были идентифицированы иные, чем ацетилирование, модификации (метилирование и фосфорилирование), но их функциональное значение оставалось неясным. Исследовать эту проблему стало гораздо легче после открытия Корнбергом и Томасом упаковки ДНК в нуклеосому (Kornberg and Thomas, 1974), основополагающую субъединицу хроматина, содержащую гистоны. Определение кристаллической структуры нуклеосомы, сначала с разрешением 7 Å, а потом с разрешением 2,8 Å, также

дало важную структурную информацию, в частности данные о распространении аминотерминальных «хвостов» гистонов за пределы кора «ДНК — белковый октамер», что делало очевидной их доступность для модификаций (Richmond et al., 1984; Luger et al., 1997). Начав в 1980 году и продолжив свои исследования на протяжении еще нескольких лет, Грунштейн (Grunstein) и его сотрудники (Wallis et al., 1980; Durrin et al., 1991), применив генетический анализ на дрожжах, смогли показать, что аминотерминальные «хвосты» гистонов имеют большое значение для регуляции экспрессии генов и для образования «молчащих» доменов хроматина.

Окончательная привязка к детальным механизмам началась с того, что Эллис (Allis) с коллегами (Brownell et al., 1996) показали, что гистоновая ацетилтрансфераза из *Tetrahymena* гомологична белку Gcn5, регулятору транскрипции у дрожжей; это явилось прямым доказательством того, что ацетилирование гистонов связано с контролем экспрессии генов. Дополнительные доказательства были получены из исследования, показывающего, что гистоновая деацетилаза млекопитающих связана с репрессивным регулятором транскрипции дрожжей Rpd3p (Taunton et al., 1996). С этого момента начался буквально взрывной поток открытий модификаций гистонов, а также переоценка роли тех из них, которые уже были известны прежде.

Все это еще не было ответом на вопрос о том, каким образом сайты для модификации выбираются *in vivo*. Было показано, например (Pazin et al., 1994), что Gal4-VP16 может активировать транскрипцию с реконструированной хроматиновой матрицы АТФ-зависимым образом. Активация сопровождалась репозиционированием нуклеосом, и было высказано предположение, что это является критическим событием в обеспечении доступности промотора. Для более полного понимания значения этих открытий потребовалась идентификация АТФ-зависимых комплексов ремоделинга нуклеосом, таких как SWI/SNF и NURF (Peterson and Herskowitz, 1992; Tsuiyama and Wu, 1995), и понимание того, что в подготовке хроматиновой матрицы к транскрипции участвуют и модификации гистонов, и ремоделинг нуклеосом. Более поздние результаты работы многих лабораторий показали, что отдельные сайты различаются в порядке связывания и идентичности ферментов, задействованных на этих этапах. Однако должно быть ясно, что начальные детерминанты специфической активности гена во время нормального развития должны включать в себя регуляторные факторы, которые распознают и связываются с конкретными последовательностями ДНК в энхансерах, промоторах и других контрольных сайтах. Эти факторы обычно представляют собой белки со специфичными для последовательности ДНК

связывающими доменами, которые, в свою очередь, способны связываться с доменами, которые рекрутируют кофакторы, прямо или косвенно влияющие на экспрессию генов, включая во многих случаях модификацию гистонов или комплексы ремоделирования нуклеосом. Первое прямое доказательство главенства первенства ДНК-связывающих факторов было получено в работах Вайнтрауба (Davis et al., 1987; Tapscott et al., 1988; Weintraub et al., 1989) и его сотрудников, которые показали, что сверхэкспрессия белка MyoD в фибробластах и других тканях индуцировала их превращение в миоциты. Сейчас понятно, что такие специфичные для последовательности события связывания устанавливают начальные состояния регуляции; последующие эпигенетические механизмы обеспечивают способы поддержания этих начальных состояний после их установления. Конечно, нарушение таких установленных эпигенетических паттернов способно изменить фенотипы.

Комплексы, которые модифицируют или ремоделируют гистоны, могут доставляться сайт-специфичным путем не только с помощью белков, но и с помощью РНК. Недавно стало известно, что некоторые виды некодирующих РНК также способны к локализованному связыванию в сочетании с рекрутированием регуляторных комплексов (Chu et al., 2011). Например, в случае HOTAIR (Rinn et al., 2007) и Kcnqlot1 (Pandey et al., 2008; Mohammad et al., 2010) РНК имеют тенденцию связываться с ДНК довольно близко к своим собственным участкам синтеза и приносить с собой гистон-модифицирующий комплекс Polycomb PRC2 (см. ниже), связанный с определенной последовательностью на каждой РНК. Kcnqlot1 также может рекрутировать ДНК-метилтрансферазу (Mohammad et al., 2010). Было показано, что HOTAIR, как и РНК-компонент некодирующей РНК теломеразы, связываются непосредственно с отдельными мотивами на ДНК, обеспечивая направленную специфичность (Chu et al., 2012).

Оставалось неясным, каким образом с использованием этих механизмов информация о данном состоянии активности могла бы передаваться при клеточном делении; т.е. была непонятна их роль в эпигенетической передаче информации. Следующим важным шагом стало понимание того, что модифицированные гистоны рекрутируют специфичным для данной модификации образом белки, которые, в свою очередь, могут влиять на локальные структурные и функциональные состояния хроматина. Было, например, обнаружено, что метилирование лизина-9 в гистоне H3 приводит к рекрутированию белка HP1 гетерохроматина (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Nakayama et al., 2001). Более того, HP1 мог рекрутировать фермент

(Suv39H1), отвечающий за метилирование. Это привело к созданию модели распространения воспроизведения сайленсированного состояния замолкшего хроматина по всему данному участку посредством процессивного [processive] механизма (рис. 1.1А). Не менее важно, что данная модель дала разумное объяснение того, как это состояние может передаваться и сохраняться в цикле репликации ДНК (рис. 1.1Б). В последнее время внимание сосредоточено на белках группы *Polycomb* (Margueron and Reinberg, 2011) и, в частности, на комплексе PRC2, который содержит компонентный белок Ezh2/E(Z), метилирующий гистон H3 по остатку K27 — метке, связанной с гетерохроматином. Аналогично механизму, обуславливающему связывание лизина-9 гистона H3, комплекс PRC2 связывается с H3K27me3 (Hansen et al., 2008). Это вовлекает в процесс другой член комплекса PRC2, Eed/ESC, который содержит домен, взаимодействующий с метилированным H3K27, и это взаимодействие, в свою очередь, стимулирует активность метилтрансферазы Ezh2 (Margueron et al., 2008; Margueron et al., 2009). Такое построение компонентов предполагает тот же тип механизма распространения, предложенный для метилирования H3K9, как показано на рис. 1.1А. Еще предстоит определить, действуют ли механизмы, которые могут объяснить распространение

модификации гистона, вниз по цепи полинуклеосом и во время митоза.

Несмотря на эти результаты, вопрос о роли модификаций гистонов в эпигенетических процессах продолжает оставаться источником путаницы. Понятно, что, несмотря на частое использование термина «эпигенетическая модификация», данная модификация гистонов, происходящая в этом участке генома, необязательно является элементом эпигенетического механизма, а может быть просто частью биохимического процесса, такого как экспрессия гена или восстановление разрыва нити ДНК.

Были предложены различные типы механизмов воспроизведения, которые зависели не от модифицированных гистонов, а скорее от варианта гистонов (Ahmad and Henikoff, 2002; McKittrick et al., 2004). Гистон H3 включается в хроматин только во время репликации ДНК. Напротив, вариант этого гистона, H3.3, отличающийся от H3 четырьмя аминокислотами, включается в нуклеосомы независимо от репликации образом и имеет тенденцию накапливаться в активном хроматине, в котором он обогащается «активными» модификациями гистонов (McKittrick et al., 2004). Было выдвинуто предположение о том, что для поддержания активного состояния достаточно присутствия H3.3 и что после репликации остается достаточно H3.3 для поддержания активного

А Распространение эпигенетической метки



Б Зависимое от репликации распространение эпигенетической метки

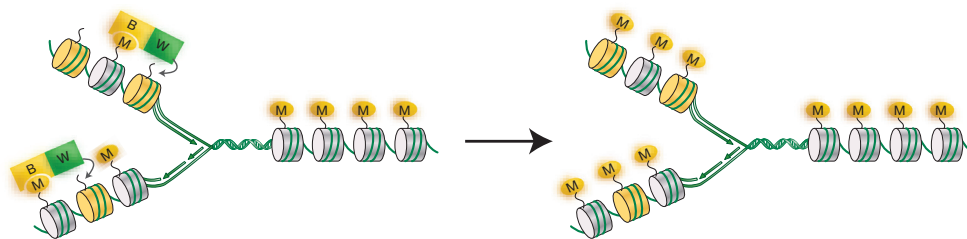


Рис. 1.1. Распространение эпигенетических меток. А — общий механизм распространения модификации гистона, такой как метилирование H3K9, обычно обнаруживаемое в гетерохроматиновых областях. Модифицированный гистоновый хвост (M) взаимодействует со связывающим белком (B), который имеет сайт связывания, специфичный для данной модификации. B также имеет специфический сайт взаимодействия с ферментом-«переписчиком» (W), который выполняет такую же модификацию гистона на соседней нуклеосоме (серый цилиндр). Распространение гистоновой метки будет продолжаться до тех пор, пока модифицирующий аппарат не достигнет граничного элемента, определяющего границу между гетерохроматином и эухроматином; Б — общий механизм поддержания модификации гистонов во время репликации. Недавно депонированные нуклеосомы (желтый цвет), которые могут включать в себя варианты гистонов, после репликации ДНК перемежаются с материнскими нуклеосомами (закрашены серым). Модифицированный гистоновый хвост (M) на материнской нуклеосоме взаимодействует со связывающим белком (B). Как и на рис. 1.1А, B взаимодействует с «переписчиком» (W), который катализирует модификацию гистона на гистоновом хвосте от соседней дочерней нуклеосомы

состояния, хотя он и разбавляется вдвое. Последующая транскрипция приводила бы к замещению нуклеосом, содержащих H3, вариантом H3.3, воспроизводя таким образом это активное состояние в следующем поколении. Результаты, полученные Ng и Gurdon (Ng and Gurdon, 2005; Ng and Gurdon, 2008a; Ng and Gurdon, 2008b), убедительно подтверждают такую модель. В экспериментах по ядерной трансплантации они показали, что, когда ядра из клеток, экспрессирующих энтодермальные гены, трансплантируются в лишенные ядра яйцеклетки *Xenopus*, происходит значительная экспрессия этих генов в клетках анимального полюса (которые не должны их экспрессировать) развивающихся в результате эмбрионов. Степень этого эпигенетического дефекта контролируется обилием гистона H3.3: снижение уровня H3.3 приводит к уменьшению доли клеток, экспрессирующих энтодермальные гены, тогда как повышенная экспрессия H3.3 приводит к росту доли клеток анимального полюса с аберрантной экспрессией энтодермального гена. Другие варианты гистонов способны помочь придать стабильность подавленному эпигенетическому состоянию. У мышей вариант *macroH2A* (*mH2A*) связан с необратимой инактивацией X-хромосомы. Внедрение этого варианта помогает придать неактивной X-хромосоме сопротивляемость к перепрограммированию в экспериментах по переносу ядра (Pasque et al., 2011).

В определение понятия «эпигенетический механизм» было предложено включить, помимо способности к сохранению стабильности в ходе деления клетки, требование начального сигнала, такого как экспрессия фактора транскрипции, потребность в котором отпадает после того, как новое состояние будет стабилизировано (Berger et al., 2009). Поведение такого рода было описано для глюкокортикоид-респонсивного элемента, в котором временное связывание глюкокортикоидного рецептора (GR) с некоторыми сайтами приводит к ремоделированию нуклеосом, что делает возможным связывание модифицированной молекулы рецептора эстрогена после отсоединения GR (Voss et al., 2011). Следует иметь в виду, что большинство факторов транскрипции эукариот не держатся продолжительное время на своих сайтах связывания, а быстро отсоединяются. Определенные виды модификаций хроматина могут, в принципе, обеспечивать механизм для интеграции сигналов от множества факторов транскрипции (Struhl, 1999).

6. ВСЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОСВЯЗАНЫ

В этих моделях в конечном счете начала замыкаться связь между модифицированными или вариантными гистонами, активацией специфических генов

и эпигенетикой, хотя многое еще предстоит сделать. Хотя существуют определенные представления о том, как может поддерживаться данное состояние гетерохроматина, они не объясняют, каким образом устанавливаются структуры «молчащего» хроматина. Большая часть доказательств существования таких механизмов получена из работ по сайленсингу локуса переключения типа спаривания (MAT-локуса) и центромерных последовательностей у *Schizosaccharomyces pombe*. Формирование гетерохроматина включает в себя продукцию РНК-транскриптов, особенно из повторяющихся последовательностей, которые преобразуются в малые РНК под действием белков, таких как Dicer, Argonaute и РНК-зависимая РНК-полимераза (Zofall and Grewal, 2006). Эти РНК впоследствии рекрутируются в сайты гомологичной ДНК как часть комплексов, которые в конечном итоге будут включать в себя ферменты, обеспечивающие «сайленсинг» модификациям гистонов, тем самым инициируя образование гетерохроматина. В настоящее время также есть свидетельства того, что те же механизмы требуются для поддержания по крайней мере некоторых гетерохроматиновых областей в клетках растений и позвоночных.

Теперь нам известно бесчисленное количество примеров эпигенетических механизмов, действующих в живых организмах. В дополнение к аллель-специфической и случайной инактивации X-хромосомы, описанной в разделе 5, и аналогичной ей аллель-специфической экспрессии во многих других импринтированных локусах, существуют эпигенетические явления, участвующие в экспрессии антител, в которых перестройка генов иммуноглобулинов на одной хромосоме избирательно подавляется. У *Drosophila* гены группы Polycomb ответственны за установление домена «молчащего» хроматина, который поддерживается на протяжении всех последующих клеточных делений (глава 17 [Grossniklaus and Paro, 2014]). Эпигенетические изменения отвечают также за парамутации у растений, при которых один аллель может вызывать наследуемое изменение экспрессии гомологичного аллеля (Brink, 1956; Stam et al., 2002). Это пример эпигенетического состояния, которое наследуется как митотически, так и мейотически — феномен, хорошо документированный у растений, но лишь недавно отмеченный у животных (Rassoulzadegan et al., 2006). Кроме того, было показано, что структура конденсированного хроматина, характерная для центромер у таких разных организмов, как мухи и люди, может быть передана через ассоциированные с центромерой белки, а не через нуклеотидную последовательность ДНК. Во всех этих случаях нуклеотидная последовательность ДНК остается интактной, но ее способность

к экспрессии подавляется. Весьма вероятно, что во всех случаях это опосредуется метилированием ДНК, модификациями гистонов, присутствием вариантов гистонов или всеми тремя механизмами; в некоторых случаях мы уже знаем, что это действительно так. Возможно, X-хромосома, которая стала источником вдохновения для первых гипотез о роли метилирования ДНК в эпигенетической активации сигнального пути (сигналинга), является лучшим примером взаимосвязи и совместного функционирования всех этих механизмов для достижения эпигенетической регуляции. Недавние исследования показывают, что сайленсинг неактивной X-хромосомы включает в себя, помимо метилирования ДНК, специфические молчащие модификации гистонов, белки группы *Polycomb*, некодирующие РНК и варианты гистонов (Lee, 2011). Все они, вероятно, участвуют в передаче «молчащего состояния» во время деления клеток.

В последние годы изучение эпигенетики было сосредоточено на определении механизмов передачи информации, не закодированной в ДНК. Возможно, уместно пересмотреть первоначальное использование термина «эпигенетика» 70-летней давности для описания тогда еще плохо изученных процессов, ведущих развитие от оплодотворенной зиготы к зрелому организму. Теперь мы много знаем об этих процессах благодаря недавним результатам изучения эмбриональных стволовых клеток, которые показывают, как экспрессия нескольких критических факторов может установить самостабилизирующееся плюрипотентное состояние. Это состояние может передаваться в ряду клеточных делений в ходе деления клеток с помощью механизма, который может считаться эпигенетическим (согласно нынешним определениям). Такое состояние также может быть нарушено, что приводит к различным эпигенетически поддерживаемым паттернам экспрессии, соответствующим разным путям дифференцировки в разные типы клеток. Благодаря тщательному пересмыслению этих результатов, а также результатов более ранних исследований по ядерной трансплантации можно сделать вывод, что соматические клетки могут быть перепрограммированы до плюрипотентности (Yamanaka and Blau, 2010). В ближайшие годы эти процессы будут изучены более подробно, хотя уже сейчас механизмы их работы более или менее понятны.

Хотя краткая история эпигенетики была представлена в виде последовательного рассказа, более правильным был бы взгляд на эти события как на ряд параллельных и перекрывающихся попыток определить и объяснить эпигенетические явления. Определение термина «эпигенетика» изменилось, но вопросы относительно механизмов развития, поставленные более ранними поколениями ученых,

снова оказываются в центре внимания. Современная эпигенетика все еще обращается к этим центральным вопросам. Более 80 лет прошло с тех пор, как Меллер описал явление, называемое сейчас эффектом положения мозаичного типа. Отрадно наблюдать за медленным прогрессом от исследования фенотипов через элегантные генетические исследования к современному анализу и вскрытию сути эпигенетических механизмов на молекулярном уровне, и особенно к синтезу всей этой информации при анализе перехода от плюрипотентных стволовых клеток к индивидуальным дифференцированным состояниям. Вместе с этими знаниями пришло понимание того, что фактически эпигенетические механизмы отвечают за значительную часть фенотипа сложных организмов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарен доктору Джону Гердону (John Gurdon) за обмен мнениями, комментарии и советы. Эта работа была поддержана внутрикорпоративной программой исследований Национального института здоровья, Национального института диабета, болезней органов пищеварения и почек.

ЛИТЕРАТУРА

- * Ссылка на источник уже есть в этой книге.
- Ahmad K., Henikoff S. 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9: 1191–1200.
- Allfrey V. G., Mirsky A. E. 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51: 786–794.
- Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79: 137–158.
- Bannister A. J., Zegerman P., Partridge J. F., Miska E. A., Thomas J. O., Allshire R. C., Kouzarides T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410: 120–124.
- Beisson J., Sonneborn T. M. 1965. Cytoplasmic inheritance of the organization of the cell cortex in *Paramecium aurelia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 53: 282.
- Bell A. C., Felsenfeld G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405: 482–485.
- Berger S. L., Kouzarides T., Shiekhattar R., Shilatifard A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 23: 781–783.
- Bird A. P. 1978. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: II. The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern. *J. Mol. Biol.* 118: 49–60.
- Bird A. P., Southern E. M. 1978. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* 118: 27–47.

- Briggs R., King T.J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 38: 455–463.
- Brink R.A. 1956. A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* 41: 872–889.
- Brownell J.E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondson D.G., Roth S.Y., Allis C.D. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843–851.
- Cattanach B.M., Kirk M. 1985. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 315: 496–498.
- Cedar H., Felsenfeld G. 1973. Transcription of chromatin in vitro. *J. Mol. Biol.* 77: 237–254.
- Chu C., Qu K., Zhong F.L., Artandi S.E., Chang H.Y. 2011. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol. Cell* 44: 667–678.
- Chu C., Quinn J., Chang H.Y. 2012. Chromatin isolation by RNA purification (ChIRP). *J. Vis. Exp.* 61 pii: 3912. doi: 10.3791/3912.
- Clark R.J., Felsenfeld G. 1971. Structure of chromatin. *Nat. New Biol.* 229: 101–106.
- Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987–1000.
- Doskocil J., Sorm F. 1962. Distribution of 5-methylcytosine in pyrimidine sequences of deoxyribonucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 55: 953–959.
- Durrin L.K., Mann R.K., Kayne P.S., Grunstein M. 1991. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* 65: 1023–1031.
- Grimes G.W., Aufderheide K.J. 1991. Cellular aspects of pattern formation: The problem of assembly. *Monogr. Dev. Biol.* 22: 1–94.
- * Grossniklaus U., Paro R. 2014. Transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6: a019331.
- Hadorn E. 1965. Problems of determination and transdetermination. *Brookhaven Symp. Biol.* 18: 148–161.
- Hannah A. 1951. Localization and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* 4: 87–125.
- Hansen K.H., Bracken A.P., Pasini D., Dietrich N., Gehani S.S., Monrad A., Rappsilber J., Lerdrup M., Helin K. 2008. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat. Cell Biol.* 10: 1291–1300.
- Hark A.T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., Tilghman S.M. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405: 486–489.
- Hershey A.D., Chase M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36: 39–56.
- Holliday R., Pugh J.E. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226–232.
- Jablonka E., Lamb M.J. 1995. *Epigenetic inheritance and evolution*. Oxford University Press, New York.
- Kanduri C., Pant V., Loukinov D., Pugacheva E., Qi C.F., Wolffe A., Ohlsson R., Lobanenko V.V. 2000. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr. Biol.* 10: 853–856.
- Kornberg R.D., Thomas J.O. 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184: 865–868.
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410: 116–120.
- Laskey R.A., Gurdon J.B. 1970. Genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cells. *Nature* 228: 1332–1334.
- Lee J.T. 2011. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 815–826.
- Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251–260.
- Lyon M.F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse. *Nature* 190: 372–373.
- Margueron R., Reinberg D. 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469: 343–349.
- Margueron R., Li G., Sarma K., Blais A., Zavadil J., Woodcock C.L., Dynlacht B.D., Reinberg D. 2008. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol. Cell* 32: 503–518.
- Margueron R., Justin N., Ohno K., Sharpe M.L., Son J., Drury W.J. 3rd, Voigt P., Martin S.R., Taylor W.R., De Marco V. et al. 2009. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461: 762–767.
- McClintock B. 1965. The control of gene action in maize. *Brookhaven Symp. Biol.* 18: 162–184.
- McClure K.D., Schubiger G. 2007. Transdetermination: *Drosophila* imaginal disc cells exhibit stem cell-like potency. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 1105–1118.
- McKittrick E., Gafken P.R., Ahmad K., Henikoff S. 2004. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 1525–1530.
- Mohammad F., Mondal T., Guseva N., Pandey G.K., Kanduri C. 2010. Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development* 137: 2493–2499.
- Morgan T.H. 1911. An attempt to analyze the constitution of the chromosomes on the basis of sex-linked inheritance in *Drosophila*. *J. Exp. Zool.* 11: 365–414.
- Muller H.J. 1930. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* 22: 299–334.
- Nakayama J., Rice J.C., Strahl B.D., Allis C.D., Grewal S.I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292: 110–113.
- Ng R.K., Gurdon J.B. 2005. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 1957–1962.
- Ng R.K., Gurdon J.B. 2008a. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle* 7: 1173–1177.
- Ng R.K., Gurdon J.B. 2008b. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat. Cell Biol.* 10: 102–109.
- Novick A., Weiner M. 1957. Enzyme induction as an all-or-none phenomenon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43: 553–566.
- Ohno S., Kaplan W.D., Kinoshita R. 1959. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell Res.* 18: 415–418.

- Pandey R.R., Mondal T., Mohammad F., Enroth S., Redrup L., Komorowski J., Nagano T., Mancini-Dinardo D., Kanduri C. 2008. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell* 32: 232–246.
- Pasque V., Halley-Stott R.P., Gillich A., Garrett N., Gurdon J.B. 2011. Epigenetic stability of repressed states involving the histone variant macro-H2A revealed by nuclear transfer to *Xenopus* oocytes. *Nucleus* 2: 533–539.
- Pazin M.J., Kamakaka R.T., Kadonaga J.T. 1994. ATP-dependent nucleosome reconfiguration and transcriptional activation from preassembled chromatin templates. *Science* 266: 2007–2011.
- Peterson C.L., Herskowitz I. 1992. Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68: 573–583.
- Ptashne M. 1992. *A genetic switch: Phage λ and higher organisms*, 2nd ed. Cell Press and Blackwell Scientific, Cambridge, MA.
- Rassoulzadegan M., Grandjean V., Gounon P., Vincent S., Gillet I., Cuzin F. 2006. RNA-mediated non-Mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441: 469–474.
- Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D., Klug A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311: 532–537.
- Riggs A.D. 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* 14: 9–25.
- Riggs A.D., Porter T.N. 1996. Overview of epigenetic mechanisms. In *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (ed. Russo V.E.A., Martienssen R., Riggs A.D.), pp. 29–45. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Riggs A.D., Martienssen R.A., Russo V.E.A. 1996. Introduction. In *Epigenetic mechanisms of gene regulation* (ed. Russo V.E.A. et al.), pp. 1–4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Rinn J.L., Kertesz M., Wang J.K., Squazzo S.L., Xu X., Bruggmann S.A., Goodnough L.H., Helms J.A., Farnham P.J., Segal E. et al. 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129: 1311–1323.
- Stam M., Belele C., Dorweiler J.E., Chandler V.L. 2002. Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize b1 locus is associated with paramutation. *Genes Dev.* 16: 1906–1918.
- Stedman E., Stedman E. 1950. Cell specificity of histones. *Nature* 166: 780–781.
- Struhl K. 1999. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98: 1–4.
- Sturtevant A.H. 1913. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J. Exp. Zool.* 14: 43–59.
- Tapscott S.J., Davis R.L., Thayer M.J., Cheng P.F., Weintraub H., Lassar A.B. 1988. MyoD1: A nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242: 405–411.
- Taunton J., Hassig C.A., Schreiber S.L. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272: 408–411.
- Tsukiyama T., Wu C. 1995. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 83: 1011–1020.
- Voss T.C., Schiltz R.L., Sung M.H., Yen P.M., Stamatoyannopoulos J.A., Biddie S.C., Johnson T.A., Miranda T.B., John S., Hager G.L. 2011. Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. *Cell* 146: 544–554.
- Waddington C.H. 1953. Epigenetics and evolution. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7: 186–199.
- Wallis J.W., Hereford L., Grunstein M. 1980. Histone H2B genes of yeast encode two different proteins. *Cell* 22: 799–805.
- Weintraub H., Tapscott S.J., Davis R.L., Thayer M.J., Adam M.A., Lassar A.B., Miller A.D. 1989. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 5434–5438.
- Yamanaka S., Blau H.M. 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465: 704–72.
- Zofall M., Grewal S.I. 2006. RNAi-mediated heterochromatin assembly in fission yeast. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71: 487–496.

ГЛАВА 2

Следующее поколение: новые захватывающие открытия молодых ученых в области эпигенетических исследований

Редакция признает, что большей частью успехов, достигнутых в современной эпигенетике, мы обязаны упорному труду, самоотверженности и творческому подходу, которые молодые ученые проявляют в работе и решении научных проблем. Именно они проводят большую часть экспериментов, на которых основываются открытия, описанные в главах нашей книги. В попытке добавить новые аспекты к этому изданию редакторы сделали подборку основных статей, которые, по нашему мнению, были новаторскими по своему характеру и вполне способными «изменить правила игры» в этой сфере в ближайшие годы или определили новые направления развития эпигенетики (подробные ссылки в списке литературы см. ниже). Нашим первым авторам (или соавторам) этого важного сборника эссе было предложено написать короткие обзоры в исторической ретроспективе, рассказывающие о том, как происходило становление их исследований, иногда включая подробности их мировоззрения и описание препятствий, с которыми они столкнулись, а также о том, как они преодолевали эти препятствия. Мы собрали эссе этих молодых ученых, признавая, что многие из них уже полностью посвятили себя эпигенетическим исследованиям, проводя работу в своих собственных независимых лабораториях по всему миру. Мы приветствуем их коллективные, уже осуществленные открытия и надеемся на их дальнейшие успехи. В основном мы ожидаем, что другие молодые ученые, студенты и новички в этой области будут вдохновлены подобными свершениями и последуют по их стопам, что приведет к будущим открытиям, которые помогут решить многие фундаментальные вопросы, остающиеся в эпигенетике на сегодня. Хотя у нас не было возможности охватить все интересные работы, продолжающие публиковаться и в настоящее время, наша цель состояла в том, чтобы дать нашим читателям представление о том, сколько из этих открытий было сделано непосредственно теми, кто возглавлял эксперименты.

Эссе

Гистоновые деметилазы

Открытие гистоновых деметилаз, Yujiang Geno Shi, Yu-ichi Tsukada, с. 25–27.

Исходные статьи:

Shi et al., *Cell* 119: 941–953 (2004).

Tsukada et al., *Nature* 439: 811–816 (2006).

Репрограммирование

Репрограммирование клеток, Kazutoshi Takahashi, с. 28–30.

Исходная статья:

Takahashi and Yamanaka, *Cell* 126: 663–676 (2006).

Функциональные некодирующие РНК

днкРНК: связывание РНК с хроматином, John L. Rinn, с. 31–33.

Исходная статья:

Rinn et al., *Cell* 129: 1311–1323 (2007).

Энхансерные РНК: класс длинных некодирующих РНК, синтезированных в энхансерах, Tae-Kyung Kim, Martin Hemberg, and Jesse M. Gray, с. 34–37.

Исходная статья:

Kim et al., *Nature* 465: 182–187 (2010).

Деметилирование ДНК

Расширение эпигенетического ландшафта: новые модификации цитозина в геномной ДНК, Skirmantas Kriaucionis and Mamta Tahiliani, с. 38–41.

Исходные статьи:

Tahiliani et al., *Science* 324: 930–935 (2009).

Kriaucionis and Heintz, *Science* 324: 929–930 (2009).

Малые мобильные РНК

Мобильные малые РНК растений, Patrice Dunoyer, Charles Melnyk, Attila Molnar, and R. Keith Slotkin, с. 42–45.

Исходные статьи:

Molnar et al., *Science* 328: 872–875 (2010).

Dunoyer et al., *Science* 328: 912–916 (2010).

Slotkin et al., *Cell* 136: 461–472 (2009).

Хроматин CpG-островков

Хроматин CpG-островков формируется за счет рекрутирования белков ZF-CxxC, Neil P. Blackledge, John P. Thomson, and Peter J. Skene, с. 46–48.

Исходные статьи:

Thomson et al., *Nature* 464: 1082–1086 (2010).

Blackledge et al., *Mol Cell* 38: 179–190 (2010).

ВЕТ-считыватели гистоновых меток как мишени для эпигенетической терапии

Ингибиторы бромодомена и экстрактерминального домена (BETi) для терапии рака: химическая модуляция структуры хроматина, Jun Qi, с. 49–51.

Исходная статья:

Filippakopoulos et al., *Nature* 468: 1067–1073 (2010).

Фармакологическое ингибирование бромодоменов-содержащих белков при воспалении, Uwe Schaefer, с. 52–55.

Исходная статья:

Nicodeme et al., *Nature* 468: 1119–1123 (2010).

Вызванные раком мутации гистоновых генов

Мутации гистона H3 при опухолях головного мозга у детей, Xiaoyang Liu, Troy A. McEachron, Jeremy Schwartzenruber, and Gang Wu, с. 56–59.

Исходные статьи:

Wu et al., *Nat. Genet.* 44: 251–253 (2012).

Schwartzentruber et al., *Nature* 482: 226–231 (2012).

Взаимодействия хромосом на дальнем расстоянии

Фолдинг хромосом: водитель или пассажир эпигенетического состояния? Tom Sexton and Eitan Yaffe, с. 60–63.

Исходные статьи:

Sexton et al., *Cell* 148: 458–472 (2012).

Lieberman-Aiden et al., *Science* 326: 289–293 (2009).

Открытие гистоновых деметилаз

Yujiang Geno Shi¹ и Yu-ichi Tsukada²

¹ Harvard Medical School, and Endocrinology Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115;

² Research Center for Infectious Diseases, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan

e-mail: yujiang_shi@hms.harvard.edu and ytsukada@bioreg.kyushu-u.ac.jp

Метилирование гистонов — ключевой элемент эпигенома эукариот. С момента открытия первой гистоновой деметилазы (HDM — histone demethylase) в 2004 году было идентифицировано и охарактеризовано более 20 деметилаз. Они принадлежат либо к семейству LSD, либо к семейству JmjC, демонстрируя обратимость всех состояний метилирования почти на всех основных сайтах метилирования лизина в гистонах. Эти находки положили конец многолетним спорам об обратимости метилирования гистонов, став крупным прорывом, изменившим наше понимание эпигенетического наследования и регуляции функции генома. Здесь мы суммируем открытие HDM, а также последние достижения, проблемы и будущие перспективы исследований HDM.

Метилирование гистонов по остаткам лизина и аргинина представляет собой ключевые ковалентные модификации гистонов в эпигенетической регуляции. Вместе с метилированием ДНК они являются характерными признаками эпигенетического наследования. Хотя другие модификации гистонов, такие как ацетилирование и фосфорилирование, как известно, обратимы в течение некоторого времени, обратимость метилирования гистонов остается под вопросом. Только в 2004 году с открытием первой гистоновой деметилазы (HDM — histone demethylase) эта проблема была решена.

Как это часто бывает, первая HDM — LSD1 (идентификатор гена — KDM1A) — была обнаружена неожиданным образом. Изучая, как метаболические ферменты, их гомологи и кофакторы участвуют в регуляции эпигенетических генов, исследователи Ян Ши и Юйцзян Гено Ши (Yang Shi и Yujiang Geno Shi) заинтересовались тем, как гомолог метаболического фермента, названный nPAO (nuclear polyamine oxidase, ядерная полиаминоксидаза; также идентифицируемый как KIAA0601/BHC110), который они ранее выделили из транскрипционного комплекса CtBP, может функционировать в процессе эпигенетической регуляции генов (Shi et al., 2003). Основываясь на гомологии nPAO с известными полиаминоксидазами и учитывая, что полиамины также

являются минорными компонентами хроматина, они выдвинули предположение, что nPAO может регулировать структуру хроматина посредством механизма окисления полиаминов. Несмотря на месяцы попыток, эксперименты, направленные на определение предполагаемой полиаминоксидазной активности nPAO, не увенчались успехом. Хотя с химической точки зрения окисление метилированного лизина может привести к деметилированию лизина посредством реакции окисления амина, на тот момент времени отсутствовали сообщения об открытии такого механизма реакции. Когда в качестве субстрата полиамин был заменен на гистон H3, деметилированный по лизину 4 (H3K4me2), Y.G. Shi наконец смог успешно обнаружить деметилирование гистонов, опосредованное nPAO. Таким образом, лаборатория доктора Yang Shi открыла первую деметилазу лизина (KDM1) (Shi et al., 2004). Белок nPAO был затем переименован в LSD1 (лизин-специфичную гистоновую деметилазу 1), и с тех пор было выделено семейство гистоновых деметилаз LSD. Это открытие положило конец десятилетиям споров об обратимости метилирования гистонов. Оно стало крупным прорывом и сдвигом парадигмы в нашем понимании динамики метилирования гистонов. Химическая реакция, которую катализирует LSD1/KDM1A, — это окисление амина путем окислительного расщепления α -углеродного мостика в метилированном лизине с образованием промежуточного имина, который гидролизуетсся с образованием формальдегида, в результате чего высвобождается одна молекула H_2O_2 и деметилируется лизин (рис. 1). Примечательно, что, поскольку для образования промежуточного имина требуется протонированный азот, LSD-семейство деметилаз может деметилировать только моно- и диметилированные (me1, me2), но не триметилированные (me3) остатки лизина. Это повысило вероятность существования других классов HDM, которые еще предстояло обнаружить.

Для поиска гистоновых деметилаз в лаборатории доктора Yi Zhang был применен подход

с биохимической очисткой на основе оценки их активности. Сходство химических реакций при удалении метильной группы у 1-meA или 3-meC из ДНК с помощью семейства AlkB ДНК-репарационных деметилаз (Falnes et al., 2002; Trewick et al., 2002), с одной стороны, и при деметилировании лизина — с другой, позволило ученым выдвинуть гипотезу о том, что аналогичный механизм может быть использован для деметилирования гистонов. В результате был разработан, оптимизирован и использован при очистке гистоновой деметилазы метод измерения высвобождения формальдегида

с использованием α -кетоглутарата (α -KG) и Fe(II) в качестве кофакторов путем мониторинга ферментативной активности фракций, сходящих с колонки. К 2005 году Yu-ichi Tsukada в лаборатории Yi Zhang удалось идентифицировать первую HDM, содержащую домен JmjC (JHDM1/KDM2), который деметилюет гистон H3K36 (Tsukada et al., 2006). Оказывается, в геноме млекопитающих есть 30 различных белков, содержащих домен JmjC. Химическая реакция, катализируемая HDM, содержащими домен JmjC, представляет собой окисление метильной группы за счет радикальной атаки

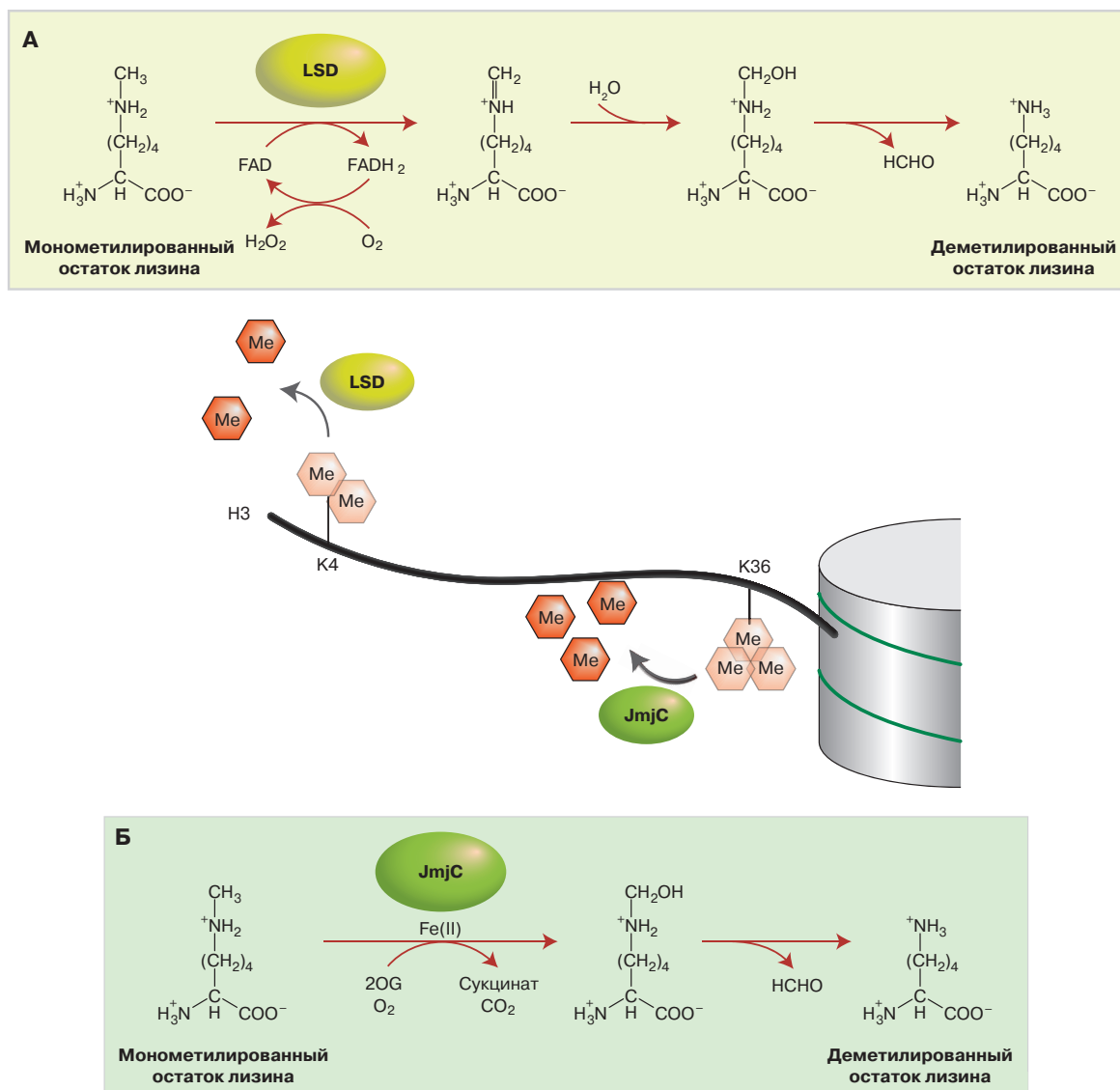


Рис. 1. Деметилирование гистонов, опосредованное деметилазой семейства LSD в результате FAD-зависимой аминоксиданной реакции (А) и деметилазой семейства с JmjC-доменами посредством 2OG-Fe (II)-зависимой диоксигеназной реакции (Б). Деметилазы LSD могут деметилировать моно- и диметилированные состояния остатков лизина в гистонах. Деметилазы семейства с JmjC-доменами могут деметилировать моно-, ди- и триметилированные остатки лизина в гистонах. Для простоты показан только монометил-лизин

высокорекционноспособных оксоферрильных частиц с образованием нестабильного промежуточного карбиноламина; последующее высвобождение формальдегида из карбиноламина дает деметилированный лизин (см. рис. 1). В отличие от химической реакции, опосредованной LSD1, эта реакция совместима с остатками триметилированного (me3) лизина. Таким образом, в дополнение к семейству деметилаз LSD (включающему LSD1 и LSD2) открытие семейства деметилаз, содержащих домен JmjC (включающий более 20 HDM), дополнительно показало обратимость всех состояний метилирования гистонов (моно-, ди- и триметилирования) почти на всех основных модифицируемых сайтах метилирования гистонов. Несколько других лабораторий также изучали белки, содержащие домен JmjC, в качестве потенциальных кандидатов на гистоновую деметилазу и внесли свой вклад в определение представителей семейства деметилаз JmjC.

Хотя для идентификации LSD1, первой HDM, потребовалось более 40 лет, менее чем за четыре года с момента открытия деметилирования гистонов мы стали свидетелями быстрого прогресса в наших знаниях в этой области, так что теперь именно она является основным направлением эпигенетических исследований. Более 20 HDM активно катализируют деметилирование почти всех основных сайтов метилирования гистонического лизина и ряда сайтов метилирования аргинина. Тем не менее следующие фундаментальные вопросы, относящиеся к ферментативному действию, регуляции и биологической функции, остаются нерешенными: во-первых, есть вероятность существования третьего класса HDM, который еще предстоит открыть. Это утверждение в значительной степени основано на предположении, что не существует известной деметилазы для метилирования H3K79. Подобная модификация уникальна тем, что это единственный остаток, который метилируется Dot1/Dot1L гистоновой метилтрансферазой, не содержащей SET-домен, поэтому есть соблазн предположить, что деметилирование H3K79 может использовать другой новый класс HDM. Кроме того, новые деметилазы аргинина могут составлять новый класс HDM. Во-вторых, функциональная характеристика деметилаз в основном ограничивается аспектами транскрипции генов и, в частности, инициацией транскрипции с промотора. Это слишком узкая специализация, которая не может полностью объяснить широкий диапазон участия HDM в биологических и патологических процессах. Стоит изучить, как HDM участвуют в элонгации транскрипции, процессинге котранскрипционной информационной РНК, процессах репликации и/или репарации ДНК. В-третьих, еще

предстоит изучить, как регулируются сами HDM. Например, будет полезно знать, как они специфически направляются к сайтам проявления своей активности; как деметилазы осуществляют свои функции в контексте более крупных комплексов, содержащих ассоциированные кофакторы; как регулируются их экспрессия и активность. И, поскольку действие этих ферментов требует метаболических кофакторов, важно понять, как клеточный метаболизм связан с внутриклеточной функцией и регуляцией HDM.

Влияние открытия гистоновых деметилаз вышло за рамки регуляции метилирования гистонов, включая стимулирование поиска ДНК-деметилаз, описанных у Kriaucionis и Tahiliani (2014). Мы ожидаем больше открытий в этом направлении, которые сильно повлияют на развитие эпигенетики. Наиболее важно то, что HDM участвуют во многих нормальных и патологических процессах, включая транскрипцию генов, самообновление стволовых клеток, развитие организма и онкогенез. Теперь, когда мы знаем, что метилирование гистонов обратимо, появляется надежда, что деметилазы станут многообещающими терапевтическими мишенями для будущих «эпигенетических лекарств». Ответы на фундаментальные вопросы, поднятые выше, абсолютно необходимы не только для понимания биологических функций деметилирования гистонов, но и для продвижения дальнейших клинических прикладных исследований сложных заболеваний человека.

ЛИТЕРАТУРА

- Falnes P. O., Johansen R. F., Seeberg E. 2002. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* 419: 178–182.
- Kriaucionis S., Tahiliani M. 2014. Expanding the epigenetic landscape: Novel modifications of cytosine in genomic DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a018630.
- Shi Y. J., Sawada J.-I., Sui G. C., Affar E. B., Whetstone J., Lan F., Ogawa H., Luke M. P.-S., Nakatani Y., Shi Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP corepressor complex. *Nature* 422: 735 — 738.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J. R., Cole P. A., Casero R. A., Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941 — 953.
- Trewick S. C., Henshaw T. F., Hausinger R. P., Lindahl T., Sedgwick B. 2002. Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* 419: 174 — 178.
- Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M. E., Borchers C. H., Tempst P., Zhang Y. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439: 811 — 816.

Репрограммирование клеток

Kazutoshi Takahashi

Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Kyoto, 606-8507, Japan

e-mail: takahash@cira.kyoto-u.ac.jp

Технология ядерного репрограммирования была впервые создана более 50 лет назад. С ее помощью можно омолаживать соматические клетки, стирая эпигенетическую память и конструируя новый порядок плюрипотентности. Недавно было открыто, что индуцированная плюрипотентность может быть достигнута с помощью небольшого набора факторов транскрипции, что дает беспрецедентные возможности для фармацевтической промышленности, клинических и лабораторных исследований. Эта технология позволяет получить доступ к исследованиям патологий с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов (iPS — induced pluripotent stem). Кроме того, ожидается, что iPS-клетки станут «восходящей звездой» регенеративной медицины в качестве источника для трансплантационной терапии.

Дифференцировка клеток долгое время считалась односторонним движением, при котором клетку можно представить в виде шара, катящегося вниз под уклон и развертывающего «развитие» от недифференцированного состояния стволовых клеток или клеток-предшественниц к физиологически зрелому состоянию, как описано Конрадом Уолдингтоном (Conrad Waddington) (рис. 1А) (Waddington, 1957). Фактически все клетки скатываются по этому эпигенетическому уклону в более глубокие долины, из которых нет выхода и которые определяют судьбу клеток во время развития. Они продолжают катиться до тех пор, пока не достигнут своего окончательного стабильного состояния в самой нижней точке, функционально отождествившись с конечным дифференцированным состоянием. Согласно этой метафоре изменений в судьбе клеток следует строго избегать с помощью горных хребтов, которые не позволяют перемещаться из одной долины в другую. Открытый нами метод создания *in vitro* плюрипотентных клеток млекопитающих из дифференцированных соматических клеток добавил свою лепту к совокупности прочих доказательств того, что эту догму можно обратить вспять. Что еще более важно, это доступный метод для изучения репрограммирования и эпигенетики (Takahashi and Yamanaka, 2006).

В прошлом неспособность передавать генетическую информацию от соматических клеток следующему поколению обычно считалась барьером Вейсмана. Однако недавние открытия показывают, что судьба клеток теперь представляется гораздо более гибкой, чем полагали ранее. Если отталкиваться от метафоры о ландшафте Уолдингтона, омоложение можно отнести к процессу, при котором клетки возвращаются по своему пути созревания, несмотря на неровности эпигенетического ландшафта, чтобы приобрести большую степень незрелости и в конечном итоге перейти в плюрипотентное состояние (рис. 1Б).

Концепция омоложения и клеточного репрограммирования была впервые предложена Джоном Гардоном в его знаменательных экспериментах по получению клонов из соматических клеток у *Xenopus laevis*. Это произошло примерно в то же время, когда пропагандировалась доктрина Уолдингтона (Gurdon et al., 1958). Позже Ян Вилмут (Ian Wilmut) и его коллеги сообщили об успешном клонировании овцы Долли, показав, что стирание эпигенетической памяти, определяющей судьбу соматических клеток, возможно даже у млекопитающих (Wilmut et al., 1997). Омоложение клетки до плюрипотентного состояния также было продемонстрировано путем слияния соматических клеток с плюрипотентными стволовыми клетками, такими как эмбриональные стволовые (ES — embryonic stem) клетки (Tada et al., 2001). Эти два подхода свидетельствовали о том, что оплодотворенные яйцеклетки и плюрипотентные стволовые клетки содержат скрытые «факторы репрограммирования», которые способны стирать соматическую память.

Другим исследованием, противоречащим модели однонаправленного эпигенетического ландшафта Уолдингтона, была работа по изменению судьбы клеток при помощи определенных факторов, написанная 25 лет назад (Davis et al., 1987). В своих новаторских исследованиях Davis et al. провели эксперименты по вычитающей гибридизации с использованием комплементарной ДНК (кДНК) и выявили ген миогенной дифференцировки (myogenic differentiation) 1 (*MYOD1*). Было достаточно

эктопической экспрессии всего лишь одного этого белка MYOD1, чтобы вызвать превращение фибробластов в миобласты, экспрессирующие миозин. Эта новаторская работа ясно показала, что фактор (факторы) транскрипции имеет решающее значение не только для поддержания клеточной идентичности, но и для определения судьбы клетки.

Опираясь на результаты этих исследований, мы показали, что латентная плюрипотентность может быть индуцирована в дифференцированных соматических клетках с помощью определенного коктейля факторов транскрипции без необходимости переноса в яйцеклетку (Takahashi and Yamanaka, 2006). Коктейль состоял из OCT3/4, SOX2, KLF4 и c-MYC, и его было достаточно, чтобы вернуть дифференцированные соматические клетки, включая терминально дифференцированные, такие как Т-лимфоциты, к плюрипотентному состоянию. Полученные дедифференцированные клетки были обозначены как iPS-клетки, и их теоретически можно использовать для генерации всех типов клеток в организме, в том числе и ES-клеток. Это открытие подтвердило важность сетей факторов транскрипции в определении судьбы клеток и окончательно повлияло на наше понимание клеточного репрограммирования.

Эффективность репрограммирования соматических клеток в iPS-клетки обычно составляет менее 1%. Это говорит о том, что для запуска изменений важны не только факторы репрограммирования, но и последующие стохастические события, необходимые для продолжения процесса репрограммирования. Поскольку никаких серьезных различий в геномных последовательностях между исходными клетками и перепрограммированными iPS-клетками не наблюдалось, изменения эпигенетического статуса, такие как метилирование ДНК и модификация

гистонов, по-видимому, являются критическими событиями для репрограммирования. Фактически использование низкомолекулярных соединений, которые ингибируют гистоновую деацетилазу, тем самым увеличивая общий уровень ацетилирования хроматина, может улучшить эффективность репрограммирования. Во время репрограммирования наблюдаются замолкание генов соматических клеток и реактивация генов, экспрессируемых плюрипотентными стволовыми клетками. Хотя эти изменения явно связаны с эпигенетическими состояниями, их механизмы и движущая сила все еще неясны. Генерация iPS-клеток является хорошей моделью и инструментом для понимания эпигенетических изменений, инициируемых факторами транскрипции. Кроме того, технология iPS-клеток в настоящее время применяется для исследований в качестве источника стволовых клеток для терапевтического использования, так и инструмента для изучения патологических процессов.

После знаковых экспериментов, которые показали, что MYOD1 является главным детерминирующим фактором, направляющим близкородственные фибробласты в сторону развития по пути миобластов, продолжается поиск других факторов, управляющих линиями развития конкретных клеток. Наблюдались и другие относительно близкородственные превращения, например из лимфоидных клеток в миелоидные и из глиальных клеток в нейроны, при применении определенных факторов транскрипции. Недавние сообщения также показали, что можно напрямую преобразовать соматические клетки в более дистально отстоящие в линии развития дифференцированные типы клеток и даже выйти за пределы происхождения зародышевого листка (например, энтодермы, мезодермы или эктодермы), что проиллюстрировано преобразованием

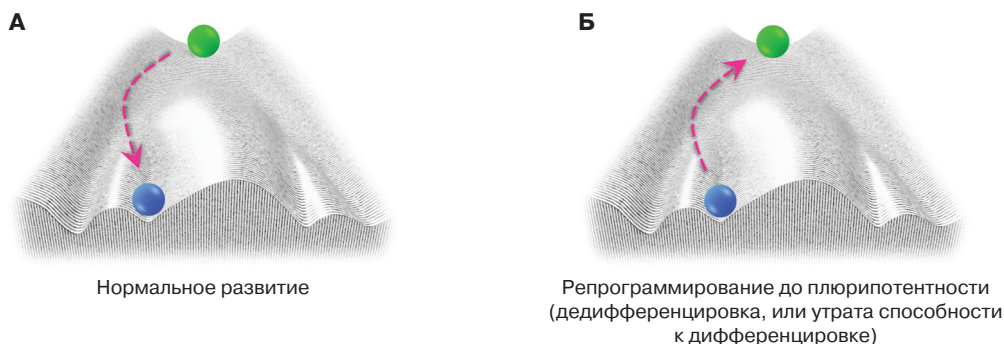


Рис. 1. Репрограммирование клеток, представленное в виде траектории движения по эпигенетическому ландшафту Уоддингтона: *А* — нормальную траекторию развития клетки можно проследить начиная с плюрипотентной клетки (зеленый шар) на вершине холма до ее конечного дифференцированного состояния (синий шар), что показывает, как эпигенетика способствует определению судьбы клетки во время развития; *Б* — окончательно дифференцированная клетка (синий шар) может быть перепрограммирована в обратном направлении до плюрипотентности при воздействии коктейля факторов транскрипции

фибробластов в нейроны, клетки пути гематопоеза, хрящевые клетки, кардиомиоциты и гепатоциты. Все эти открытия устранили часть препятствий на путях реализации судьбы клетки. Клеточная идентичность явно оказалась более гибкой, чем считалось ранее, и в значительной степени определялась эпигенетическим статусом клетки.

ЛИТЕРАТУРА

- Davis R., Weintraub H., Lassar A. B. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987–1000.
- Gurdon J. B., Elsdale T. R., Fischber M. 1958. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182: 64–65.
- Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 11: 1553–1558.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676.
- Waddington C. H. 1957. The strategy of the genes. Allen & Unwin, London.
- Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813.

днкРНК: связывание РНК с хроматином

John L. Rinn

Harvard University, Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Cambridge, Massachusetts 02138
e-mail: john_rinn@harvard.edu

Многочисленные исследования, проведенные за последнее десятилетие, выявили растущее количество длинных некодирующих РНК (днкРНК, lncRNA — long non-coding RNA) у многих организмов. Результаты проведенных с тех пор исследований показали, что днкРНК составляют важный уровень регуляции генома при различных биологических процессах и заболеваниях. Здесь мы обсуждаем общую, недавно определившуюся тему взаимодействия днкРНК с эпигенетическим механизмом, что, в свою очередь, модулирует активность и локализацию эпигенетического аппарата во время спецификации судьбы клетки.

Идентичность клетки достигается за счет сложной хореографии регуляторных элементов ДНК, взаимодействующих с белковыми регуляторными комплексами, что порождает множество уникальных эпигенетических ландшафтов. Обширные массивы эпигенетических ландшафтов образуются с использованием повсеместно экспрессируемых комплексов, модифицирующих и моделирующих хроматин, чтобы дать начало бесчисленным уникальным комбинациям посттрансляционных модификаций гистонов и паттернов метилирования ДНК. Исследование этих процессов поднимает извечный вопрос: каким образом ферментные комплексы доставляют эти метки на определенную комбинацию сайтов в различных условиях существования клеток? Долгое время предполагалось, что некодирующие молекулы РНК могут обеспечивать некоторую специфичность для нацеливания этих комплексов на сайты их действия. В самом деле, становится все более очевидным, что масса из тысяч длинных некодирующих РНК (днкРНК, lncRNA — long non-coding RNA) представляет собой ключевой уровень эпигенетического контроля (см. рис. 24 главы 3 [Allis et al.]).

Более 20 лет известен яркий пример основанной на РНК эпигенетической регуляции, которая действует при компенсации дозы генов у млекопитающих (глава 25 [Brockdorff and Turner, 2014]). В частности, длинная межгенная некодирующая РНК (lincRNA — long intergenic noncoding RNA), называемая XIST (X-неактивный специфический

транскрипт, X inactive-specific transcript), экспрессируется с одной женской X-хромосомы, что приводит к рекрутированию комплексов группы *Polycomb* (PcG), таких как PRC2, к этой хромосоме. В результате происходит сопутствующее замолкание транскрипции на большей части X-хромосомы. Другими словами, один ген днкРНК способен нацелиться на большую часть хромосомы и заставить ее гены замолчать *in cis*. Это яркий прецедент для РНК-опосредованной эпигенетической регуляции. Однако связь между РНК и рекрутированием PRC2 долгое время была неуловимой. Ключ к разгадке был найден при изучении эпигенетической динамики другой lincРНК, названной HOTAIR (антисмысловая межгенная РНК Нох-транскрипта, Hox transcript antisense intergenic RNA; Rinn et al., 2007). HOTAIR экспрессируется с одного из четырех кластеров факторов транскрипции HOX (HOXC — clusters of HOX). Семейство белков HOX является ключевым регулятором формирования плана тела организма во время его развития. HOTAIR была идентифицирована благодаря своему отличительному паттерну экспрессии в тканях передних и дистальных органов мышей во время развития и в фибробластах взрослых людей (Rinn et al., 2007). Интересно, что экспрессия HOTAIR проводит четкую эпигенетическую границу между эухроматиновыми и гетерохроматиновыми районами в кластере HOXC. Более того, эухроматин-гетерохроматиновые области были инвертированы в клетках передних и дистальных органов; мы назвали эти области «диаметральными» хроматиновыми доменами. В совокупности данные привели к первоначальной гипотезе, что HOTAIR служит эпигенетической границей *in cis* в кластере HOXC. К нашему удивлению, граница HOXC-кластера в хроматине осталась неизменной, когда функция РНК HOTAIR была утрачена; однако кластер HOXD, расположенный на отдельной хромосоме, стал активным. Таким образом, подобно XIST, экспрессия HOTAIR из кластера HOXC приводит к эпигенетическому замолканию, однако кластер HOX, который она регулирует (HOXD), расположен на другой хромосоме, то есть регулируется *in trans*. Возникает вопрос: как?

Ответ был получен с помощью нескольких критических экспериментов, которые показали, что lincRNA HOTAIR взаимодействует с PRC2 и что это было необходимо для правильной локализации PRC2. Первый эксперимент с использованием иммунопреципитации комплекса PRC2 идентифицировал HOTAIR как физически связанную или соосажденную с PRC2 (Rinn et al., 2007). Реципрокный эксперимент, в ходе которого были выделены белки, связанные с транскриптом HOTAIR, также выявил связь между HOTAIR и компонентами комплекса PRC2, но не с другими регуляторными факторами хроматина. Последним недостающим звеном была демонстрация того, что взаимодействие РНК—белок между HOTAIR и PRC2 необходимо для правильной локализации PRC2 в кластере HOXD. В самом деле, недостаток HOTAIR приводит к неправильной локализации PRC2 по отношению к кластеру HOXD *in trans* и сопутствующей активации генов внутри кластера HOXD. Взятые вместе, эти находки показали, что физическая ассоциация между HOTAIR и PRC2 необходима для правильного направления регуляторного аппарата хроматина к их целевым

сайтам. Таким образом, был однозначно выявлен новый уровень модуляции эпигенетических ландшафтов на основе РНК.

После обнаружения того факта, что PRC2 физически связывается с HOTAIR или XIST, направляя, таким образом, данный комплекс к специфическим районам генома, было установлено, что этот механизм, как было показано, применим к многочисленным днкРНК, которые физически ассоциируются с PRC2. Многие из этих ассоциаций на самом деле необходимы для соответствующей локализации эпигенетического регуляторного аппарата *in cis* и *in trans* (рис. 1). Два независимых исследования, в частности, выявили, что как в клетках человека, так и в клетках мыши сотни днкРНК, составляющие до 30 % транскриптома, преципитируют вместе с PRC2. Более того, многие из протестированных днкРНК, связанных с PRC2, необходимы для правильной эпигенетической и транскрипционной регуляции мишеней PRC2 (Khalil et al., 2009; Zhao et al., 2010). Далее этими исследователями было отмечено, что одна РНК может быть связана со многими разными регуляторными

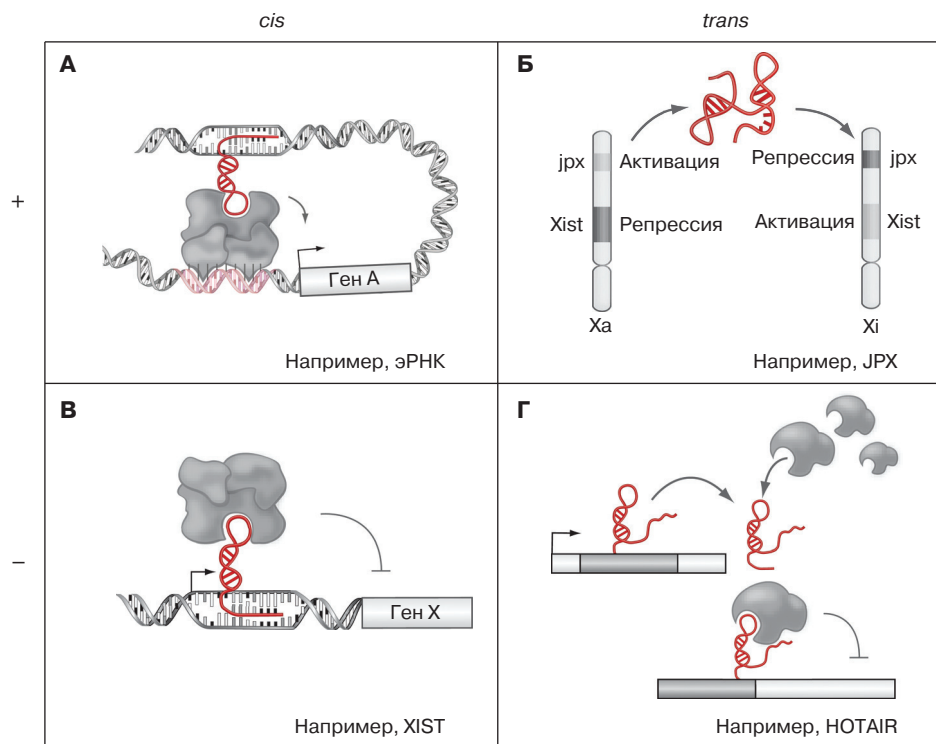


Рис. 1. Модели функционирования днкРНК в ходе эпигенетического контроля экспрессии генов, как активирующие, так и подавляющие транскрипцию *in cis* и *in trans*: *A* — энхансерные РНК, как было показано, играют опосредованную РНК роль в формировании энхансерных взаимодействий, приводящих к дальнедействующей регуляции *cis*-генов с помощью днкРНК; *B* — активация днкРНК JPX в качестве примера транс-действующей днкРНК, которая в данном случае способствует активации Xist. *C* — Xist как пример днкРНК, которая способствует репрессии генов в *cis*-хромосоме на большей части X-хромосомы; *D* — экспрессия HOTAIR приводит к транс-репрессии генов HOX

белками хроматина, указывая тем самым, что она может функционировать как мост из РНК между множеством комплексов (Khalil et al., 2009). Действительно, тщательный биохимический анализ HOTAIR показал, что, помимо связывания с PRC2, она также связывается с гистоновой деметилазой LSD1 и NCOR (nuclear receptor corepressor, корепрессор ядерного рецептора). Это указало на существование новой модели эпигенетической регуляции, в которой одиночная днкРНК рекрутирует несколько синергетически функционирующих регуляторных комплексов хроматина. Это помогает направлению данных комплексов к NCOR, стыковке с этим ядерным рецептором и способствует образованию гетерохроматина (LSD1 и PRC2). В совокупности эти исследования привели к идее, что РНК-скаффолд (РНК-каркас, на котором ассоциированы различные белки) может связывать многочисленные молекулы хроматина и дополнительные регуляторные комплексы для придания специфичности районам-мишеням в геноме (рис. 1Г). Недавно было открыто, что сверхэкспрессия HOTAIR является маркером метастатического рака молочной железы (Gupta et al., 2010), что подчеркнуло важность роли HOTAIR в эпигенетической регуляции. Фактически HOTAIR служит «онко-днкРНК», индуцируя метастазы при раке молочной железы вследствие сверхэкспрессии за счет ремоделирования эпителиального эпигенома по аналогии с эпигеномом стромальных клеток. В совокупности уроки, извлеченные из исследований HOTAIR за последние пять лет, показали, что днкРНК играют критическую роль во взаимодействии с комплексами хроматина и их модуляции во время развития и болезни.

За 50 лет, прошедших с тех пор, как РНК была идентифицирована как центральный компонент потока генетической информации, становится все более очевидным, что РНК — это больше чем просто мессенджер: она выполняет обширные и разнообразные функции (Amaral et al., 2008). Фактически днкРНК составляют критический уровень эпигенетической регуляции, в котором разные

днкРНК ассоциированы с различными эпигенетическими состояниями, но проявляют общий механизм действия; они физически связаны с комплексами, модифицирующими и моделирующими хроматин, и направляют их к конкретным геномным локусам, которые имеют решающее значение для надлежащего исполнения той или иной клеточной функции. Однако это только один аспект биологии днкРНК; существует множество других функциональных ролей, которые они играют в многочисленных биологических процессах, упомянутых у Amaral et al. (2008).

ЛИТЕРАТУРА

- * Ссылка на источник уже есть в этой книге.
- Amaral P. P., Dinger M. E., Mercer T. R., Mattick J. S. 2008. The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* 319: 1787–1789.
- * Brockdorff N., Turner B. M. 2014. Dosage compensation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a019406.
- Gupta R. A., Shah N., Wang K. C., Kim J., Horlings H. M., Wong D. J., Tsai M. C., Hung T., Argani P., Rinn J. L. et al. 2010. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 464: 1071–1076.
- Khalil A. M., Guttman M., Huarte M., Garber M., Raj A., Rivea Morales D., Thomas K., Presser A., Bernstein B. E., van Oudenaarden A. et al. 2009. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 11667–11672.
- Rinn J. L., Kertesz M., Wang J. K., Squazzo S. L., Xu X., Bruggmann S. A., Goodnough L. H., Helms J. A., Farnham P. J., Segal E. et al. 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129: 1311–1323.
- Tsai M. C., Manor O., Wan Y., Mosammaparast N., Wang J. K., Lan F., Shi Y., Segal E., Chang H. Y. 2010. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329: 689–693.
- Zhao J., Ohsumi T. K., Kung J. T., Ogawa Y., Grau D. J., Sarma K., Song J. J., Kingston R. E., Borowsky M., Lee J. T. 2010. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol. Cell* 40: 939–953.

Энхансерные РНК: класс длинных некодирующих РНК, синтезированных в энхансерах

Tae-Kyung Kim¹, Martin Hemberg² и Jesse M. Gray³

¹ The University of Texas Southwestern Medical Center, Department of Neuroscience, Dallas, Texas 75390-9111;

² Boston Children's Hospital, Department of Ophthalmology, Boston, Massachusetts 02215;

³ Genetics Department, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

e-mail: taekyung.kim@utsouthwestern.edu

Недавние исследования показали, что активные энхансеры транскрибируются, образуя класс некодирующих РНК, называемых энхансерными РНК (эРНК). эРНК отличаются от длинных некодирующих РНК (днкРНК), но эти два вида некодирующих РНК могут играть сходную роль в активации транскрипции мРНК. Новые исследования, демонстрирующие, что эРНК функционируют, осуществляя контроль за транскрипцией мРНК, ставят под сомнение идею о том, что энхансеры являются просто участками сборки факторов транскрипции. Вместо этого связь между промоторами и энхансерами может быть двунаправленной, когда промоторы требуются для активации транскрипции энхансера. В свою очередь, эРНК могут облегчить взаимодействие энхансер—промотор или активировать транскрипцию, направляемую промотором.

За последние три десятилетия достаточно хорошо был продемонстрирован функциональный вклад энхансеров в экспрессию генов. Однако механизмы, с помощью которых энхансеры влияют на экспрессию генов, остаются малоизученными. Недавние технологические достижения позволили наблюдать в масштабе всего генома за молекулами и механизмами, которые управляют функционированием энхансера. Мы знаем, что энхансеры рекрутируют генеральные коактиваторы, такие как p300/CBP, которые демонстрируют общую сигнатуру хроматина. Эта сигнатура включает в себя высокие уровни монометилирования гистона H3 по лизину 4 (H3K4me1), но низкие уровни промотор-специфической метки H3K4me3 (рис. 1). С использованием CBP и паттернов метилирования гистонов для идентификации нейрональных энхансеров в нашем исследовании показано, что несколько тысяч энхансеров могут рекрутировать РНК-полимеразу II (Pol II) и транскрибировать некодирующие РНК при активации нейронов (Kim et al., 2010).

Транскрипты, которые мы назвали энхансерными РНК (эРНК), с тех пор были обнаружены независимыми исследователями во многих различных типах и видах клеток, свидетельствуя о том, что синтез эРНК не уникален для нейронов, а скорее является универсальным клеточным механизмом, участвующим в управлении функцией энхансера.

Энхансерные РНК четко отличаются от канонических длинных некодирующих РНК (днкРНК), функции которых лучше охарактеризованы. Первое отличие состоит в том, что, хотя днкРНК в широком смысле идентифицировались по присутствию H3K4me3 на их промоторах, эРНК могут быть получены от энхансеров без детектируемых уровней H3K4me3. Это различие может иметь место из-за того, что уровни экспрессии эРНК в 10–100 раз ниже, чем в случае днкРНК, поскольку уровни H3K4me3 обычно коррелируют с уровнем экспрессии генов. Во-вторых, в отличие от промоторов днкРНК и генов, кодирующих белки, энхансеры демонстрируют небольшое смещение в направлении инициации транскрипции. В-третьих, тогда как днкРНК подвергаются процессам созревания, таким как сплайсинг и полиаденилирование, эРНК короче (менее 2 килобаз), хотя присутствуют доказательства небольшого сплайсинга и полиаденилирования. Отсутствие полиаденилирования было сделано на основании того факта, что эРНК были впервые обнаружены при анализе общей клеточной РНК (с использованием процедуры секвенирования тотальной РНК (РНК-seq)) в нейронах, но не наблюдались в полиаденилированной РНК (с использованием секвенирования мРНК (мРНК-seq)). Однако о полиаденилированных эРНК сообщалось (или предполагалось) из анализа других типов не нейрональных клеток. Несмотря на некоторые из этих различий между стереотипными эРНК и днкРНК, мы и другие исследователи наблюдали относительно

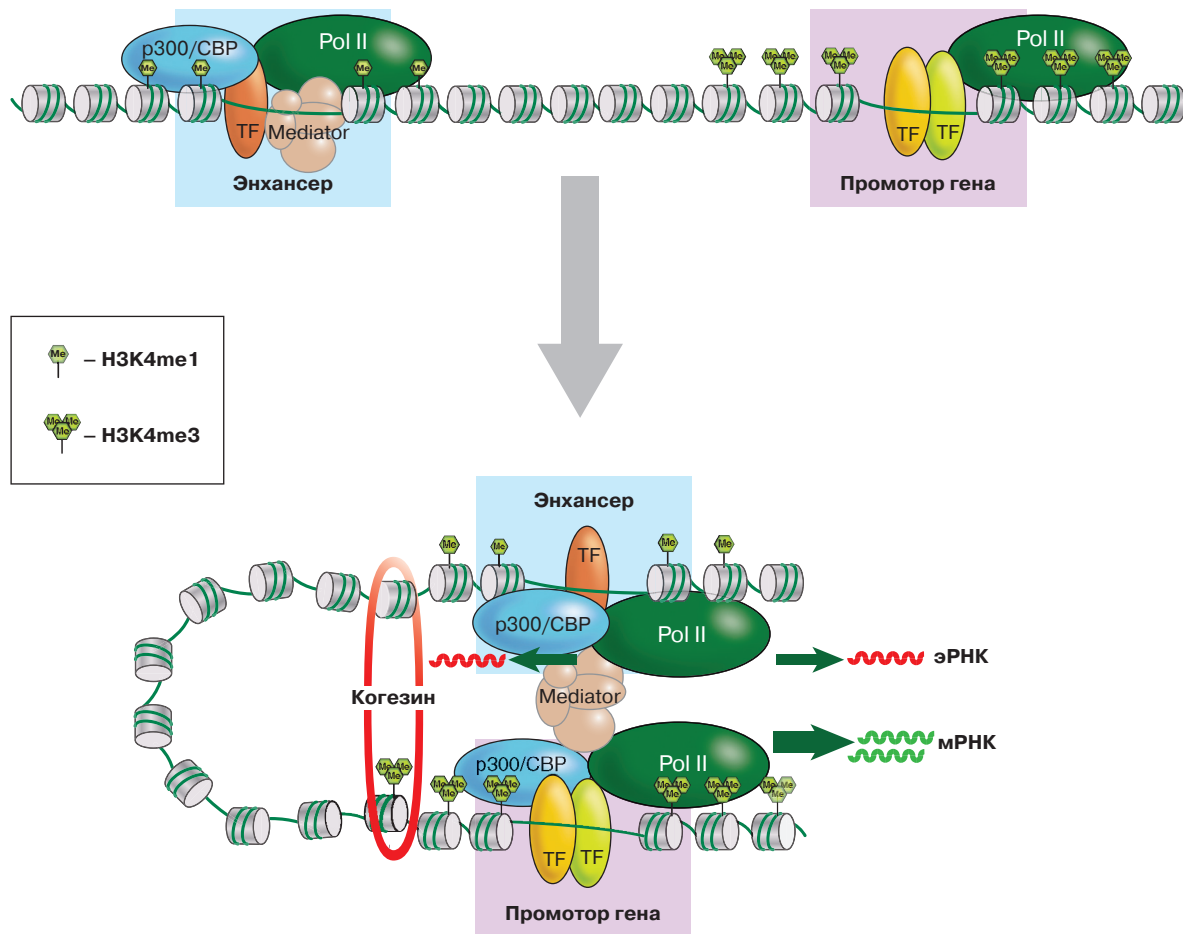


Рис. 1. Синтез и функция эРНК. Во время активации транскрипции коактиватор (например p300/CBP) и РНК Pol II связываются с набором энхансеров и двунаправленно транскрибируют эРНК. Хроматиновая петля между энхансером и промотором будет приближать эРНК к промотору гена-мишени, чтобы обеспечить координацию активации. Некоторые эРНК (например эРНК, экспрессируемые из ER- α -связанных энхансеров в клетках раковых опухолей молочной железы человека) облегчают и/или стабилизируют специфическое образование петель между энхансерами и промоторами, частично за счет взаимодействия с когезином

небольшое количество геномных локусов, которые было нелегко классифицировать как энхансеры или промоторы днкРНК из-за присутствия меток H3K4me3 и H3K4me1. Эти локусы могут представлять отдельный класс энхансеров или указывать на то, что принятая идентификация энхансера и промотора применима лишь в определенной степени. Различие между энхансером и промотором может быть просто количественным, касающимся уровней экспрессии транскриптов. Действительно, сообщалось, что промоторы, кодирующие белок, действуют как энхансеры, регулируя другие близлежащие промоторы.

Главный вопрос, поднятый открытием эРНК, связан с тем, вносит ли транскрипционная активность энхансеров вклад в их функцию. Несколько линий косвенных доказательств предполагают, что

синтез эРНК — это регулируемый процесс, а не просто транскрипционный шум. При нейрональной стимуляции только часть энхансеров продуцирует эРНК, и эта часть, как правило, расположена рядом с довольно активно индуцируемыми мРНК (Kim et al., 2010). Основываясь на этом наблюдении, мы предполагаем, что энхансеры, продуцирующие эРНК, активно участвуют в стимулировании экспрессии генов-мишеней в ответ на передачу сигналов, индуцируемую стимулом. Эта гипотеза была подтверждена коррелятивными исследованиями эРНК в различных типах клеток. Более того, кинетический анализ эРНК в макрофагах, активированных липополисахаридами (ЛПС), показал, что синтез эРНК предшествует транскрипции соседних генов, кодирующих белок, что указывает на активную роль эРНК в регуляции гена-мишени.

Этот факт получил дополнительное подтверждение в недавней работе по изучению днкРНК человека с помощью нокдауна, вызываемого мРНК (малые интерферирующие РНК, small interfering RNA). Данное исследование позволило сделать вывод о том, что днкРНК вносят вклад в активацию окружающих белок-кодирующих мРНК (Lai et al., 2013). Хотя не было ясно показано, происходят ли днкРНК с энхансер-подобной функцией из энхансерных областей, эти днкРНК из базы последовательностей GENCODE отличаются от эРНК тем, что они обычно в результате процессинга подвергаются сплайсингу и полиаденилированию, а также имеют высокие уровни H3K4me3 на своих промоторах. Тем не менее комбинация этих двух независимых открытий — эРНК, получаемая из функционально определенных энхансеров, и днкРНК, демонстрирующая функцию, подобную энхансеру, — предполагает, что участки генома, не кодирующие белки, могут продуцировать транскрипты со специфическими регуляторными функциями и играть более активную роль в экспрессии генов, чем предполагалось ранее.

В поддержку этого вывода недавние исследования предоставили более прямые доказательства, демонстрирующие, что по крайней мере некоторые эРНК функционально важны для экспрессии генов-мишеней. Нокдаун нескольких эРНК вызывает снижение экспрессии близлежащих генов-мишеней (Lam et al., 2013; Li et al., 2013; Melo et al., 2013). Кроме того, искусственная вставка эРНК перед минимальным промотором в репортерной системе на основе плазмиды усиливает экспрессию репортерного гена. Эти результаты согласуются с предполагаемой ролью эРНК в активации транскрипции. Интересно, что активирующая функция эРНК, по-видимому, является специфичной по отношению к последовательности или цепи, хотя критические детерминанты этой специфичности не были идентифицированы (Lam et al., 2013). В других экспериментах на клетках раковых опухолей молочной железы человека РНК, экспрессируемые с энхансеров, связанных с рецептором α -эстрогена (ER- α), увеличивают силу специфического образования петель между энхансером и промотором, частично за счет взаимодействия с когезином (Li et al., 2013). Было также показано, что днкРНК с энхансер-подобной функцией, упомянутые выше, опосредуют образование петель в хроматине, но путем взаимодействия с медиаторным комплексом (Lai et al., 2013).

Хотя эти результаты в совокупности подтверждают, что образование петель хроматина является важным регуляторным этапом, с помощью которого обычно действуют эти отдельные классы активирующих днкРНК (см. рис. 1), у эРНК могут быть и другие функции. Наше исследование,

сосредоточенное на нейрональном гене *Arc* и энхансере, связанном с ним, показало, что синтез эРНК требует присутствия интактного промотора гена *Arc* (Kim et al., 2010); то есть детектируемые уровни эРНК не синтезируются при делеции промотора гена *Arc*, хотя РНК Pol II и факторы транскрипции все еще связываются с энхансером. Одним возможным объяснением может быть то, что без промотора в энхансере *Arc* отсутствует неизвестный фактор, необходимый для его собственной транскрипционной активности. Такой неизвестный фактор может присутствовать на промоторе и обеспечивать синтез эРНК на энхансере только тогда, когда энхансер находится в непосредственной близости от промотора, посредством механизма образования петель. Эти результаты бросают вызов стандартной модели однонаправленных взаимодействий энхансер—промотор, в которых энхансеры действуют на промоторы. Вместо этого для активации энхансера и промотора может потребоваться обратная связь, при которой каждый из элементов белкового комплекса необходим для активации другого. В этом сценарии маловероятно, что образование петель хроматина полностью обеспечивается эРНК, поскольку ее синтез может происходить только после образования петель между энхансером и промотором. Выпетливание хроматина также удерживало бы образующиеся эРНК в непосредственной близости от промоторов-мишеней, потенциально обеспечивая элегантный способ предотвращения активации неспецифических генов-мишеней посредством данных эРНК. Затем формирующийся транскрипт эРНК может способствовать привлечению активаторов к промотору, действуя как скаффолд для собирания активирующих белков. Поскольку эРНК обычно нестабильны, специфичность функции эРНК будет частично определяться их коротким периодом полужизни, предотвращая неспецифическую активацию вне локального сайта синтеза эРНК после его завершения. Также необходимо указать, что акт транскрипции эРНК, в дополнение к самому транскрипту эРНК, может иметь специфическую биологическую функцию. Например, задействованная в транскрипции РНК-полимераза II может рекрутировать модификаторы хроматина на энхансеры, стабилизируя энхансерный домен в активном состоянии.

Открытие новых функциональных ролей эРНК, безусловно, расширяет растущую регуляторную способность некодирующих РНК. Эти результаты не только иллюстрируют более сложную роль цис-регуляторных последовательностей, чем считалось ранее, но также предоставляют большие возможности для будущих исследований в раскрытии сложных уровней генной регуляции, в которых переплетаются днкРНК, цис-регуляторные последовательности,



эпигенетические модификации и трехмерная конфигурация хроматина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим докторов наук М. Э. Гринберга (M. E. Greenberg) и Г. Креймана (G. Kreiman) за их руководство и поддержку. Эта работа была поддержана Фондом Уайтхолла (Т-К.К.), Фондом Уэлча (Т-К.К.) и Фондом Клингенштейна (Т-К.К.).

ЛИТЕРАТУРА

Kim T. K., Hemberg M., Gray J. M., Costa A. M., Bear D. M., Wu J., Harmin D. A., Laptewicz M., Barbara-Haley K., Kuersten S. et al. 2010. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465: 182–187.

Lai F., Orom U. A., Cesaroni M., Beringer M., Taatjes D. J., Blobel G. A., Shiekhattar R. 2013. Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* 494: 497–501.

Lam M. T., Cho H., Lesch H. P., Gosselin D., Heinz S., Tanaka-Oishi Y., Benner C., Kaikkonen M. U., Kim A. S., Kosaka M. et al. 2013. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* 498: 511–515.

Li W., Notani D., Ma Q., Tanasa B., Nunez E., Chen A. Y., Merkurjev D., Zhang J., Ohgi K., Song X. et al. 2013. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* 498: 516–520.

Melo C. A., Drost J., Wijchers P. J., van de Werken H., de Wit E., Oude Vrielink J. A., Elkon R., Melo S. A., Leveille N., Kalluri R. et al. 2013. eRNAs are required for 53-dependent enhancer activity and gene transcription. *Mol. Cell* 49: 524–535.

Расширение эпигенетического ландшафта: новые модификации цитозина в геномной ДНК

Skirmantas Kriaucionis¹ и Mamta Tahiliani²

¹ Ludwig Institute for Cancer Research Ltd., University of Oxford, Nuffield Department of Clinical Medicine, Old Road Campus Research Building, Headington, Oxford OX3 7DQ, United Kingdom;

² Skirball Institute / NYU School of Medicine, New York, New York 10016
e-mail: mamta.tahiliani@med.nyu.edu

Метилирование оснований цитозина в ДНК имеет решающее значение для замолкания активности эндогенных ретровирусов, регулирования экспрессии генов и установления клеточной идентичности, поэтому оно долгое время считалась неотъемлемой эпигенетической меткой. Недавно было установлено, что белки транслокации десять-одиннадцать (TET — ten eleven translocation) могут окислять 5-метилцитозин (5mC — 5-methylcytosine), что, в свою очередь, приводит к образованию 5-гидроксиметилцитозина (5hmC — 5-hydroxymethylcytosine) и других окисленных вариантов цитозина в геноме. Это открытие вызвало сдвиг парадигмы в нашем понимании того, каким образом динамические изменения в метилировании ДНК регулируют транскрипцию и клеточную дифференцировку, тем самым влияя на нормальное развитие и болезненные состояния.

Метилирование оснований цитозина (называемого 5-метилцитозином, или 5mC) является эпигенетической меткой, которую часто называют пятым основанием, чтобы подчеркнуть его наследуемость и важность в развитии. 5mC считается эпигенетической меткой, потому что он управляет биологической функцией (то есть репрессией транскрипции) без изменения способности кодирования белка локальной последовательности ДНК, состоящей из определенной комбинации четырех стандартных нуклеотидных оснований. 5mC жизненно важен для различных процессов, включая эмбриогенез, родительский импринтинг, инактивацию X-хромосомы, замолкание эндогенных ретровирусов, а также регуляцию генной экспрессии и сплайсинга. Метилирование цитозина влияет на эти процессы как путем модуляции взаимодействий белок-ДНК, так и за счет образования зачатков репрессивных гетерохроматиновых структур. В 2009 году 5-гидроксиметилцитозин (5hmC) был

одновременно идентифицирован двумя исследовательскими группами как нормальный компонент геномной ДНК в нейронах млекопитающих и эмбриональных стволовых (ES — embryonic stem) клетках (Kriaucionis and Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009). Это знаменательное открытие стимулировало огромное количество исследований, направленных на понимание того, как эта модификация оказывает свое влияние на регуляцию генома и как она связана с путем деметилирования 5mC, который ранее не был обнаружен у ферментов.

5hmC был случайно идентифицирован в лаборатории Натаниэля Хайнца (Nathaniel Heintz), когда Скимантас Криаучионис (Skirmantas Kriaucionis) выделил хроматин из ярко выраженных эухроматиновых ядер мозжечковых нейронов Пуркинье. Выделение ядер из клеток Пуркинье само по себе было техническим достижением, требующим использования трансгенных мышей с ядрышками, мечеными eGFP (bacTRAP), и высокопроизводительного флуоресцентно-активируемого сортирования клеток, чтобы получить достаточно материала для анализов. Цель состояла в том, чтобы сравнить содержание 5mC в клетках Пуркинье с гранулированными клетками, используя классический метод анализа состава «ближайшей соседней» ДНК, восходящий к классическим экспериментам Корнберга (Kornberg) 1961 года и использованный в новаторских экспериментах Адриана Берда (Adrian Bird) по количественной оценке глобальных уровней метилированных CpG. Беспристрастный и надежный метод выявил дополнительный сигнал, который был воспроизводимо богаче представлен в нейронах Пуркинье и обнаруживался в других типах нейрональных клеток. Самой захватывающей фазой этих экспериментов было определение сигнала как 5hmC, новой модификации основания в геномной ДНК (Kriaucionis and Heintz, 2009).

5hmC был одновременно открыт Мамтой Тахилиани (Mamta Tahiliani) в лаборатории Анджаны Рао (Anjana Rao), когда ее поиски ДНК-деметилазы приняли неожиданный поворот. Поиск такого фермента был в первую очередь мотивирован демонстрацией активной ликвидации метилирования ДНК в родительском геноме сразу после оплодотворения. Это многообещающее открытие сильно свидетельствовало в пользу того, что снятие паттернов метилирования может быть критическим для эпигенетического репрограммирования (как проиллюстрировано на рис. 3 главы 15 [Li and Zhang, 2014]). Сотрудник Мамты в области биоинформатики Л. Аравинд (L. Aravind) предсказал, что семейство белков TET представляет собой диоксигеназы со специфичностью к нуклеиновым кислотам. Недавно было показано, что отдаленно родственные диоксигеназы удаляют метильные группы как с гистонов, так и с оснований поврежденной ДНК. Следовательно, белки TET были чрезвычайно привлекательными кандидатами на роль ДНК-деметилазы. В своих начальных экспериментах Мамта обнаружила, что сверхэкспрессия TET1 снижает уровни 5mC, детектируемые благодаря иммунофлуоресценции, что указывает на то, что TET1 действует как истинная ДНК-деметилаза. Однако ее попытки подтвердить деметилирование с помощью тонкослойной хроматографии дали неожиданные результаты, потому что снижение уровня 5mC не сопровождалось прогнозируемым увеличением цитозина. Однако, отрегулировав контраст на отсканированном изображении, она заметила, что то, что казалось слабым шмером (пятном) под цитозином, приняло форму независимого пятна, свидетельствуя о том, что TET1 может преобразовывать 5mC в новый вид нуклеотида. Поскольку многие диоксигеназы иницируют катализ, гидроксилируя свои субстраты, Мамта предположила, а затем подтвердила, что этот нуклеотид был 5hmC. Исследователи также показали, что 5hmC присутствует в геноме ES-клеток и что уровни TET1 и 5hmC снижаются при дифференцировке ES-клеток. Это указывало на то, что 5hmC является обычным компонентом ДНК млекопитающих и что TET-белки и 5hmC играют важную роль в регуляции экспрессии генов и клеточной идентичности в ES-клетках (Tahiliani et al., 2009). Последующие исследования в нескольких лабораториях установили, что каждый член семейства TET (TET1 / TET2 / TET3) способен преобразовывать 5mC в 5hmC (Wu and Zhang, 2011). Однако исследования на мышах показали, что Tet3 является единственным членом семейства TET, необходимым *in vivo* для нормального развития.

Открытие окисления 5mC до 5hmC ферментами семейства TET подняло вопрос о том, являлось ли полное деметилирование ДНК от 5hmC до C

пассивным (то есть производимым путем разбавления после каждого репликационного цикла или активно катализируемым). Ферменты семейства TET продемонстрировали последовательное окисление 5hmC до 5-формилцитозина (5fC — 5-formylcytosine) и 5-карбоксилцитозина (5acC — 5-carboxylcytosine), что описано в обзоре Wu и Zhang (2011). Быстрая потеря 5mC в родительском геноме совпадает с транслокацией TET3 в ядро и крупномасштабным превращением 5mC в 5hmC, 5fC и 5acC (Wu and Zhang, 2011). Иммуноокрашивание хроматина в метафазе также продемонстрировало, что все три окисленных производных 5mC большей частью сохраняются на исходных нитях ДНК и пассивно разбавляются репликацией во время ранних циклов расхождения нитей, что указывает на то, что TET-опосредованное окисление 5mC может стимулировать пассивную потерю продуктов окисления 5mC через циклы репликации. Альтернативно или даже одновременно 5fC и 5acC могут быть ДНК-гликозилом тимина (TDG — thymine DNA glycosylase) и их можно заменить цитозином посредством эксцизионной репарации оснований (рис. 1A) (Wu and Zhang, 2011; рис. 6 в главе 15 [Li and Zhang, 2014]). Когда и где в геноме действуют эти механизмы, остается предметом активных исследований.

Понимание биологической функции 5hmC потребовало разработки инновационных инструментов для его обнаружения и однозначного установления его отличия от 5mC и C. Теперь ясно, что бисульфитное секвенирование не может отличить 5hmC от 5mC, также оно неверно интерпретирует 5fC и 5acC как цитозин (Pastor et al., 2013). Поэтому важно отметить, что данные, полученные за десятилетия бисульфитного секвенирования, следует интерпретировать с осторожностью, поскольку «метилирован» может быть либо 5mC, либо 5hmC, тогда как позиции, ранее идентифицированные как позиции цитозина, могут фактически содержать 5fC или 5acC. В настоящее время разработан ряд методов для обогащения 5hmC-содержащей ДНК и совсем недавно — для ее секвенирования с разрешением до одного нуклеотида (Pastor et al., 2013).

Многочисленные доказательства указывают на то, что 5hmC является не просто промежуточным продуктом деметилирования, а скорее новой модификацией ДНК со своей собственной эффекторной программой. 5hmC присутствует в различных типах зрелых клеток взрослых организмов, и его уровни колеблются от 0,05 % всех оснований в некоторых иммунных клетках до 0,6 % в клетках Пуркинье. Это приводит к вопросу о том, существуют ли считыватели этой метки, способные преобразовать присутствие этой модификации в биологическую функцию, как, например, в случае,

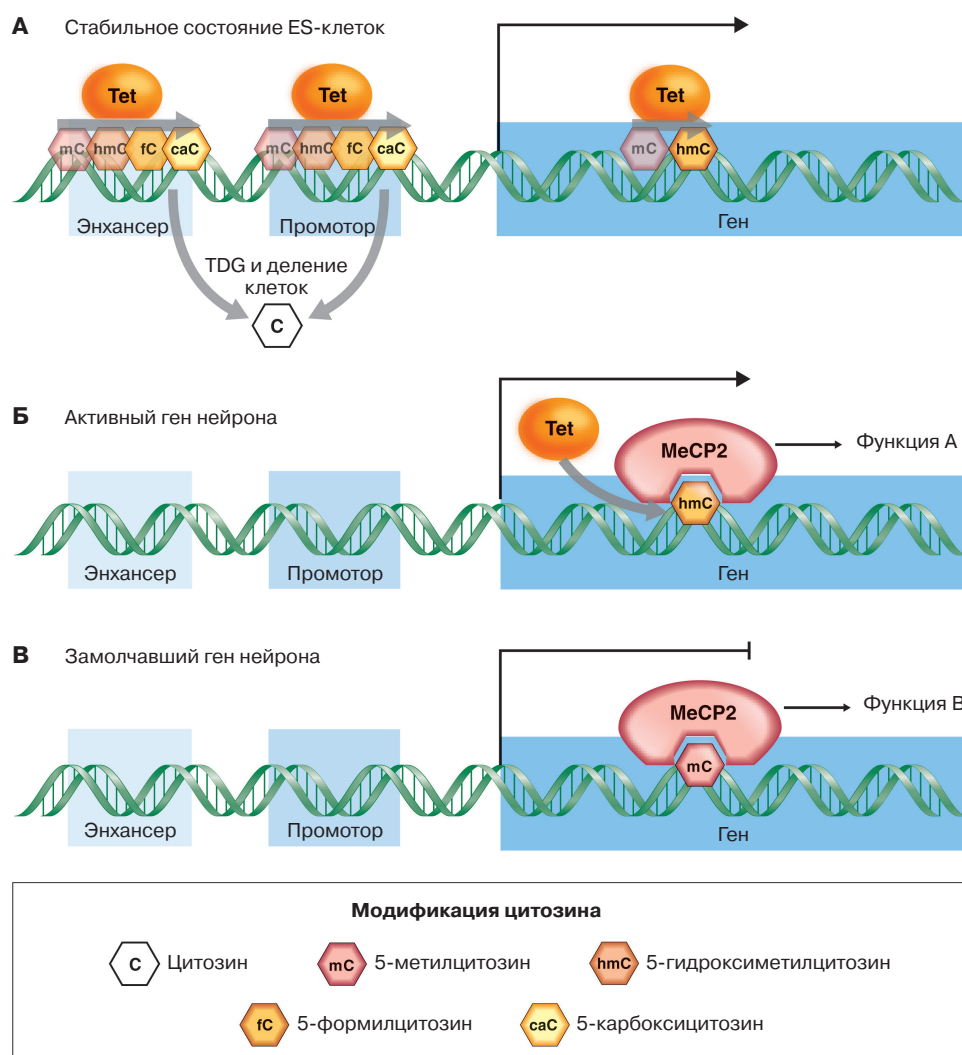


Рис. 1. Распределение и метаболизм модификаций цитозина в генах в ES-клетках и нейронах: *А* — опосредованное TET-окисление 5mC с последующим удалением 5caC с помощью эксцизионной репарации оснований (BER) предохраняет промоторы и энхансеры от метилирования в ES-клетках. Также возможно, что окисление 5mC блокирует поддержание состояния метилирования в этих районах. MeCP2 связывает как 5mC (*Б*), так и 5hmC (*В*) в кодирующих последовательностях нейрональных генов, где состояние модификации цитозина коррелирует с уровнем экспрессии

когда неметилированные цитозины могут «считываться» белками, содержащими домен CXXC (см. главу 2 [Blackledge et al., 2013]), или когда метилированные CpG распознаются белками MBD. Уже идентифицирован ряд белков, связывающихся с 5hmC, включая MeCP2, MBD3 и Uhrf2, которые, как известно, регулируют транскрипцию. Связанные с 5fC и 5caC белки включают ряд ДНК-репарационных белков, что согласуется с ролью этих модификаций в качестве промежуточных продуктов деметилирования.

Тип клетки, стадия развития и специфическое распределение 5hmC по геномному локусу предполагают особые функции этой модификации

ДНК. Методы обогащения 5hmC, а также методы однонуклеотидного секвенирования показали, что в ES-клетках уровни 5hmC повышены на энхансерах и промоторах, содержащих CpG-островки (CGI), которые не подвергаются метилированию, несмотря на высокое содержание CpG (Pastor et al., 2013). В нейрональных клетках 5hmC обильно представлен в последовательностях собственно генов (рис. 1*Б, В*) (Mellén et al., 2012; Pastor et al., 2013). Хотя в ES-клетках также было отмечено обогащение кодирующих последовательностей генов 5hmC, однонуклеотидные методы не подтвердили это открытие. Было высказано предположение, что белки семейства TET и 5hmC играют роль в предохранении

CGI от метилирования в ES-клетках, тогда как функция 5hmC в кодирующей последовательности собственно генов в нейрональных клетках все еще остается неясной.

В будущих исследованиях необходимо изучить точную функцию 5hmC в процессах раннего развития, гематопоза и функциях нейронов. Будет интересно узнать, способна ли единая модель объяснить функцию 5hmC во всех типах клеток или его функция будет варьироваться в каждом исследуемом типе клеток.

ЛИТЕРАТУРА

* Ссылка на источник уже есть в этой книге.

* Blackledge N. P., Thomson J. P., Skene P. J. 2013. CpG island chromatin is shaped by recruitment of ZF-CxxC proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: a018648.

Kriaucionis S., Heintz N. 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324: 929–930.

* Li E., Zhang Y. 2014. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6: a019133.

Mellén M., Ayata P., Dewell S., Kriaucionis S., Heintz N. 2012. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151: 1417–1430.

Pastor W. A., Aravind L., Rao A. 2013. TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 341–356.

Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y., Pastor W. A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L. M., Liu D. R., Aravind L. et al. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930–935.

Wu H., Zhang Y. 2011. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 25: 2436–2452.

Мобильные малые РНК растений

Patrice Dunoyer¹, Charles Melnyk², Attila Molnar³ и R. Keith Slotkin⁴

¹ IBMP-CNRS, 67084 Strasbourg Cedex, France;

² The Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Cambridge CB2 1LR, United Kingdom;

³ Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EA, United Kingdom;

⁴ Department of Molecular Genetics and Center for RNA Biology, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210

e-mail: patrice.dunoyer@ibmp-cnrs.unistra.fr

У растений сайленсинг посредством РНК является фундаментальным регулятором экспрессии генов, образования гетерохроматина, подавления мобильных элементов и защиты от вирусов. Специфичность этих процессов, привязанная к последовательности, основывается на молекулах малых некодирующих РНК (мнРНК, sRNA — small noncoding RNA). Хотя распространение сайленсинга посредством РНК среди всех клеток и тканей растения было установлено в течение почти двух десятилетий, только недавно мнРНК были формально продемонстрированы в качестве мобильных сигналов сайленсинга. Здесь мы обсуждаем различные типы мобильных молекул мнРНК, их ближние и дальние перемещения, а также их функцию в клетках-реципиентах.

Сайленсинг посредством РНК — это регуляторный механизм, который контролирует экспрессию эндогенных генов и экзогенных молекулярных паразитов, таких как вирусы, трансгены и мобильные генетические элементы. Одним из наиболее интересных аспектов сайленсинга посредством РНК, обнаруживаемого у растений и беспозвоночных, является его подвижная природа, другими словами, его способность распространяться от клетки, в которой он был инициирован, к соседним клеткам. Этот феномен основан на перемещении малых некодирующих молекул РНК (мнРНК, 21–24 нуклеотидов в длину), которые обеспечивают специфичность последовательности при эффектах сайленсинга (замолкания). У растений существуют два основных класса мнРНК: короткие интерферирующие РНК (киРНК) и микроРНК. Эти мнРНК генерируются различными и иногда взаимодействующими биохимическими путями, которые могут влиять на их подвижность. Перемещение растительных мнРНК делится на две основные категории: от клетки к клетке (ближнее) и системное (дальнее) (Melnyk et al., 2011).

ДАЛЬНИЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ МАЛЫХ РНК

Первый намек на мобильную природу сайленсинга посредством РНК у растений был сделан в исследованиях табака, продемонстрировавших локализованный сайленсинг трансгена, который передавался во вновь образующиеся ткани в соответствии с паттерном сосудистого транспорта (рис. 1). Существование сигнальной молекулы для РНК-сайленсинга было позже подтверждено у растений элегантными экспериментами с прививками (Melnyk et al., 2011). Эти исследования продемонстрировали, что сигнал сайленсинга, исходящий от «замолчавшего» трансгенного подвоя, распространяется на большие расстояния через сосудистую сеть и может запускать *de novo* сайленсинг гомологичного трансгена в отдаленно расположенных тканях растения. Однако идентификация сигнала системного сайленсинга заняла несколько лет и только недавно была окончательно определена благодаря возможностям высокопроизводительного секвенирования в сочетании с экспериментами по микропрививке арабидопсиса (Dunoyer et al., 2010a; Molnar et al., 2010). Обнаружение как трансгенных, так и эндогенных киРНК в тканях привоя с тройным мутантом по гену рибонуклеазы Dicer (который является дефектным по биогенезу киРНК) подтвердило, что киРНК, в отличие от их транскриптов-предшественников, являются мобильным сигналом сайленсинга на больших расстояниях. Эти эксперименты также продемонстрировали, что мобильные киРНК способны направлять *de novo* метилирование на целевых локусах, находящихся на больших расстояниях, с помощью РНК-направленного метилирования ДНК (Dunoyer et al., 2010a; Molnar et al., 2010). Интересно, что только одна треть локусов с эндогенными киРНК в геноме у арабидопсиса генерирует мобильные киРНК, что указывает на сложный процесс формирования каналов, лежащий в основе их мобильности.

КОРОТКИЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ ОТ КЛЕТКИ К КЛЕТКЕ

После локальной индукции сайленсинг посредством РНК распространяется от места инициации к окружающим 10–15 соседним клеткам (см. рис. 1). Это движение от клетки к клетке, вероятно, происходит через плазмодесмы (поры, соединяющие клетки растений), поскольку клетки без плазмодесм устойчивы к сигналам мобильного сайленсинга. Иногда сайленсинг посредством РНК может быть амплифицирован (каскадно размножен) путем преобразования РНК-мишени в новую двухцепочечную РНК (дцРНК, double-stranded RNA) с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы RDR6 и продукции вторичных киРНК (Melnik et al., 2011). Этот процесс амплификации, известный как «транзитивность» (см. рис. 1), приводит к более широкому распространению сайленсинга от клетки к клетке посредством повторяющихся событий передачи сигналов на короткие расстояния. Для идентификации белков, необходимых для биогенеза, движения или восприятия сигнала сайленсинга от клетки к клетке, были разработаны конкретные генетические скрининги (Melnik et al., 2011). В этих системах был идентифицирован Dicer-подобный белок 4 (DCL4 — Dicer-like-4), связанный с перемещением сайленсинга на короткие расстояния, что указало на ключевую роль генерируемых с помощью DCL4 21-нуклеотидных киРНК. Впоследствии эти 21-нуклеотидные киРНК были непосредственно идентифицированы как сигнал сайленсинга, передаваемый от клетки к клетке, для чего использовалась комбинация систем с трансгеном-репортером, вирусных супрессоров РНК-сайленсинга, которые специфически нейтрализуют 21-нуклеотидные киРНК, и экзогенного применения (бомбардировки) флуоресцентно меченых 21-нуклеотидных киРНК (Dunoyer et al., 2010b). Помимо DCL4, перемещение сайленсинга от клетки к клетке нарушают несколько мутаций в пути РНК-направленного метилирования ДНК, но этот механизм еще нуждается в пояснении. Следует отметить, что бомбардировка 24-нуклеотидными киРНК, ассоциированными с РНК-направленным путем метилирования ДНК, распространяется до той же степени, что и бомбардировка 21-нуклеотидными киРНК, что указывает на мобильность обоих классов РНК (Dunoyer et al., 2010a, 2010b).

ФУНКЦИИ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ МАЛЫХ РНК

Паттерны развития

Мобильные малые РНК у растений образуются из эндогенных или экзогенных источников несколькими путями. Во время развития дикого

типа движение мРНК устанавливает градиенты концентраций целевых мРНК, используемых для определения паттернов развития. Например, перемещение эндогенных киРНК, состоящих из 21 пары нуклеотидов, от верхушки листьев, где они образуются, к нижним слоям клеток генерирует градиент, функция которого заключается в установлении паттерна формирования листа — от верхушки к основанию (Melnik et al., 2011). Некоторые микроРНК также мобильны. Например, miR165/166 продуцируется в определенных клетках корня и перемещается в соседние клетки, где она нацеливается на мРНК, кодирующие несколько факторов транскрипции. Результирующий градиент мРНК-мишени определяет типы сосудистых клеток (Melnik et al., 2011). Интересно, что некоторые микроРНК также могут перемещаться на большие расстояния в растениях. При фосфатном голодании одна микроРНК перемещается из верхушки растения в корень, где она разрушает свою мРНК-мишень, которая кодирует супрессор поглощения фосфата (Melnik et al., 2011).

Вирусная устойчивость

Поскольку вирусы являются потенциальными триггерами сайленсинга посредством РНК в инфицированных клетках, они также представляют собой огромные источники мобильных малых РНК. Эти полученные из вируса киРНК могут перемещаться как от клетки к клетке, так и системно, опережая фронт инфекции, и запускают антивирусную реакцию сайленсинга в интактных клетках, которые еще не инфицированы. Этот эффект был продемонстрирован с использованием вируса, дефектного по функции перемещения и несущего фрагмент эндогенного гена. Хотя инфицирование этим вирусом ограничивалось нижними листьями, он запускал замолкание эндогенного гена внутри и вокруг не защищенных от него сосудистых частей растения. Кроме того, вирусные супрессоры сайленсинга посредством РНК, которые специфически нейтрализуют киРНК, необходимы для успешного инфицирования соседних клеток (Dunoyer et al., 2010b; Melnik et al., 2011).

Эпигенетические изменения

Работа с вирусами свидетельствует о том, что сигналы мобильного сайленсинга могут направлять эпигенетические изменения. После инфицирования РНК-вирусом сайленсинг может возникать у отдельного растения, стабильно трансформированного трансгеном, не обладающим гомологией с последовательностями данного вируса. Такой сайленсинг проявляется как метилирование ДНК на промоторе

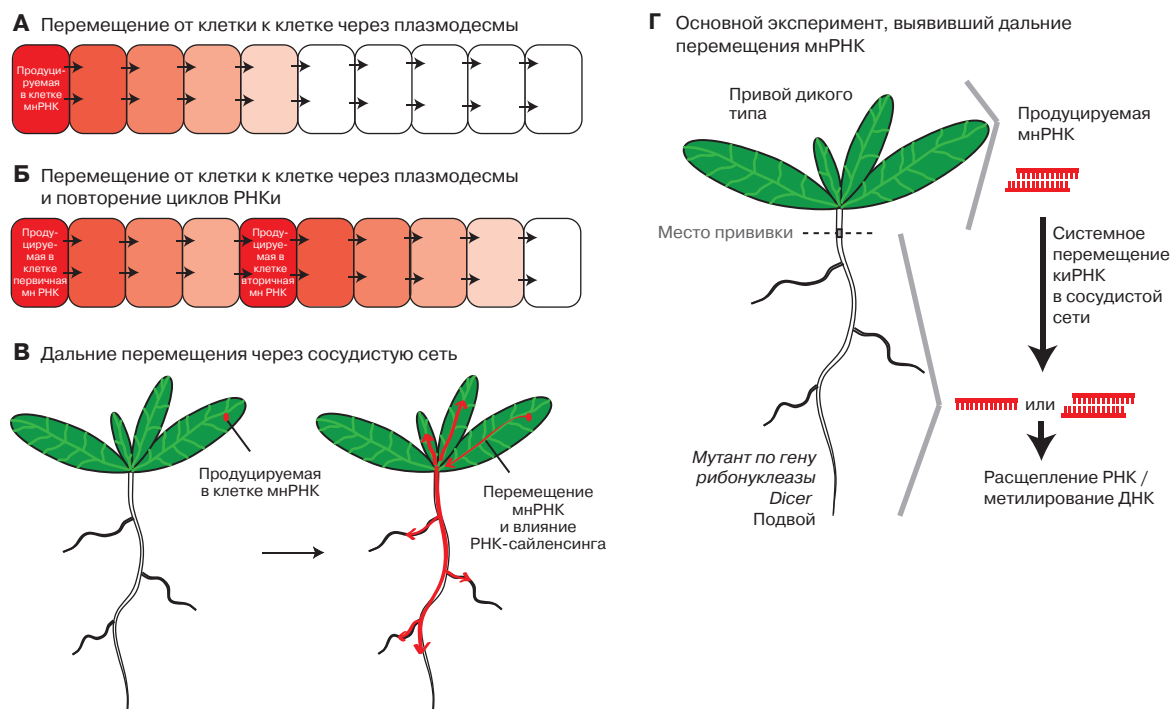


Рис. 1. Перемещение растительных мнРНК и, следовательно, РНК-сайленсинга может происходить посредством двух различных механизмов: *А* — мнРНК могут перемещаться по каналам между растительными клетками, называемыми плазмодесмами. Диффузия мнРНК из клетки, в которой они были продуцированы, показана красным градиентом; *Б* — перемещение от клетки к клетке может быть расширено за границы диффузии через плазмодесмы благодаря реципиентным клеткам, которые используют первичные мнРНК для инициации последовательных циклов РНКи и продуцирования вторичных мнРНК. Этот процесс амплификации называется транзитивностью; *В* — движение на большие расстояния от одного органа к другому, достигается за счет загрузки мнРНК в сосудистую систему растения. Клетки, продуцирующие мнРНК, и перемещение мнРНК показаны красным; *Г* — в этом критическом эксперименте, который определил мнРНК как мобильный фактор в РНК-сайленсинге, верхушка растения дикого типа (привой) была привита к корню *dicer mutant* растения, который не способен продуцировать киРНК; киРНК, генерируемые в привое, транспортировались в корень, где были идентифицированы с помощью глубокого секвенирования и участвовали в расщеплении РНК и РНК-направленном метилировании ДНК

трансгена и передается последующим поколениям в отсутствие вируса, демонстрируя наследуемый эпигенетический сайленсинг (Melnyk et al., 2011). Также известно, что наследственный эпигенетический сайленсинг происходит в эндогенных мобильных генетических элементах (TE — transposable elements). У арабидопсиса TE активируются в клетках, которые соседствуют со сперматозоидами и клетками эмбриона, становясь источником киРНК (Slotkin et al., 2009). Активация TE в этих клетках совпадает с соответствующим увеличением метилирования ДНК в сперматозоидах и эмбрионе, свидетельствуя, что TE киРНК могут перемещаться в соседние гаметы и развивающийся в последующем эмбрион и усиливать РНК-направленное метилирование ДНК и сайленсинг TE, сохраняющийся в череде поколений (Slotkin et al., 2009). Однако прямое перемещение эндогенных TE киРНК в гаметы или эмбрион не было продемонстрировано.

ПЕРЕМЕЩЕНИЕ МАЛЫХ РНК В ДРУГИЕ ОРГАНИЗМЫ

В качестве интересного наблюдения следует отметить способность мобильных сигналов сайленсинга перемещаться за пределы растений. Замолчавшие на уровне РНК трансгены, экспрессирующиеся в растении, могут подавлять экспрессию комплементарных генов у грибных и беспозвоночных патогенов, которые питаются тканями растений (Melnyk et al., 2011). Сигналы подавления трансгенной РНК могут также передаваться между несколькими растениями через соединяющее их паразитическое растение (Melnyk et al., 2011). Эти примеры представляют собой важные биотехнологические приложения для мобильного РНК-сайленсинга и указывают на то, что подобное движение мнРНК может происходить в природе от растения к патогенам или симбионтам.

ЛІТЕРАТУРА

- Dunoyer P., Brosnan C.A., Schott G., Wang Y., Jay F., Alioua A., Himber C., Voinnet O. 2010a. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.* 29: 1699–1712.
- Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J.C., Voinnet O. 2010b. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328: 912–916.
- Melnyk C.W., Molnar A., Baulcombe D.C. 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing. *EMBO J.* 30: 3553–3563.
- Molnar A., Melnyk C.W., Bassett A., Hardcastle T.J., Dunn R., Baulcombe D.C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328: 872–875.
- Slotkin R.K., Vaughn M., Borges F., Tanurdzić M., Becker J.D., Feijó J.A., Martienssen R.A. 2009. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136: 461–472.