

ЭПИГЕНЕТИКА

Часть 1

Основные эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов

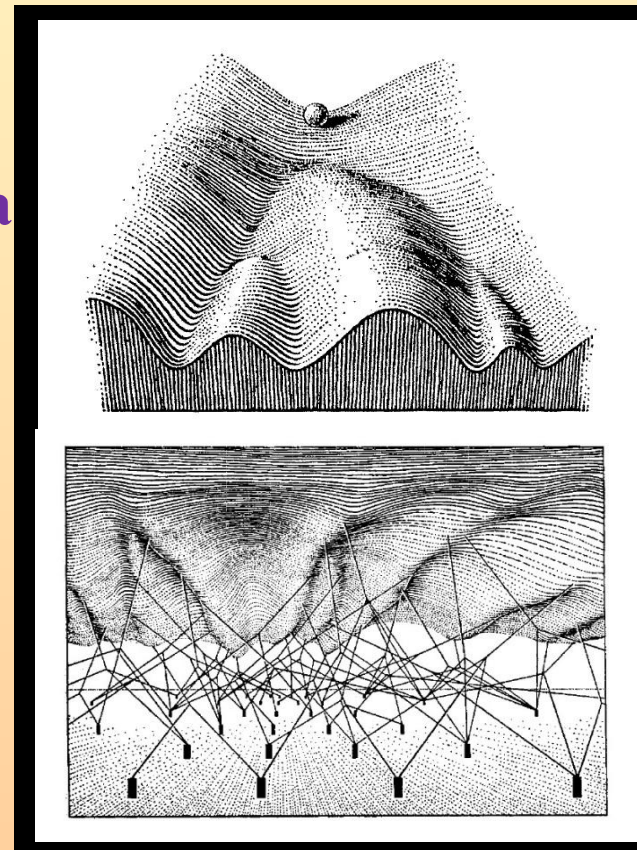
Предмет эпигенетики

В 1942 г. эмбриологом Конрадом Уоддингтоном был введен термин "эпигенетика", произошедший от объединения терминов «эпигенез» и «генетика»

Первая лаборатория эпигенетики была создана в МГНЦ в 2002 г.

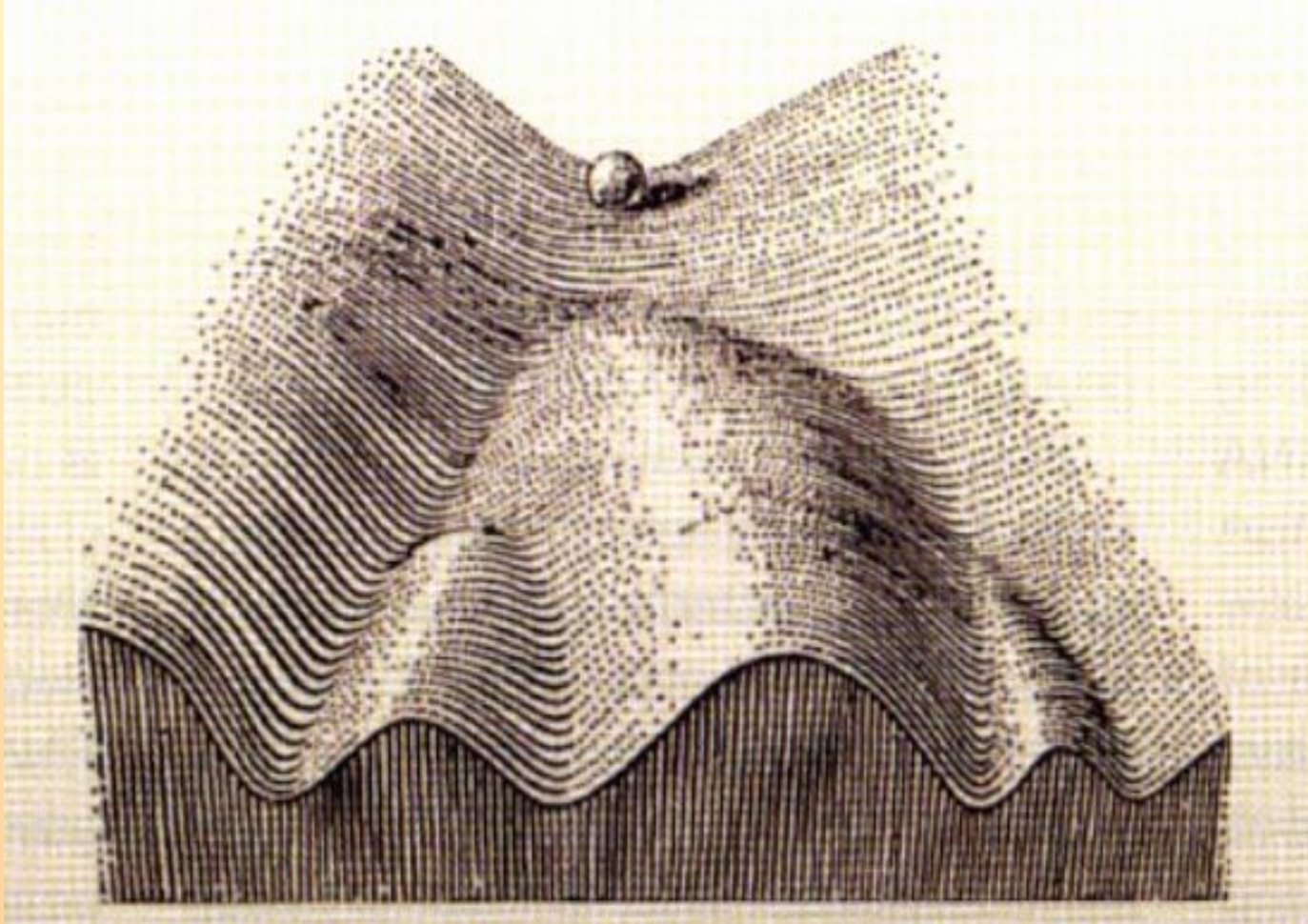
Конрад Уоддингтон
(1905-1975)

«Эпигенетика – раздел биологии, который изучает причинно-следственные взаимодействия между генами и их продуктами, и как они реализуются в определенные фенотипы (Waddington, 1942).



Развитие как эпигенетический процесс:

генотип+эпигенотип+внешняя среда = определенный фенотип



«эпигенетический фон лежит в основе развивающегося организма и представляет собой весь комплекс взаимодействий между ДНК, белками, внешними и внутренними стимулами»

По Уоддингтону процесс онтогенеза - это пространство возможностей - "эпигенетический ландшафт", представляющий собой набор эпигенетических траекторий, ведущих от зиготы к взрослому состоянию организма. Эпигенетические траектории в некоторой степени связаны между собой.

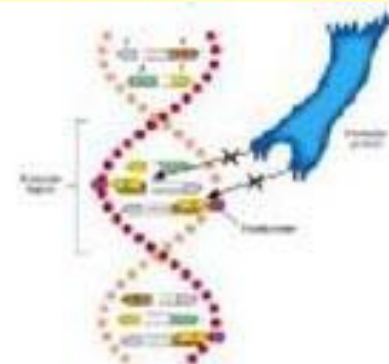
После того, как клеточные линии приобретают определенные «эпигенетические траектории», впоследствии они уже не могут от них уклониться, независимо от того, какие «реплики окружения» получают.

Таким образом, концепция Конрада Уоддингтона объясняет, как из одной клетки (зиготы) образуется многоклеточный организм, состоящий из клеток, кардинально различающихся между собой по виду и функциональной нагрузке.

Эпигенетический ландшафт



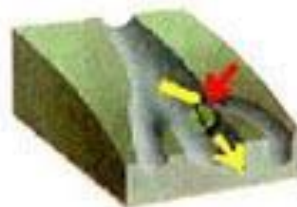
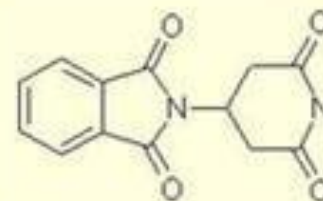
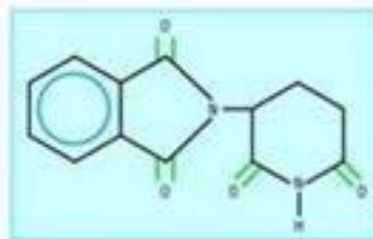
Норма
развитие идет по наиболее вероятному - нормальному пути



Талидомид



Мутация
изменяет ход развития

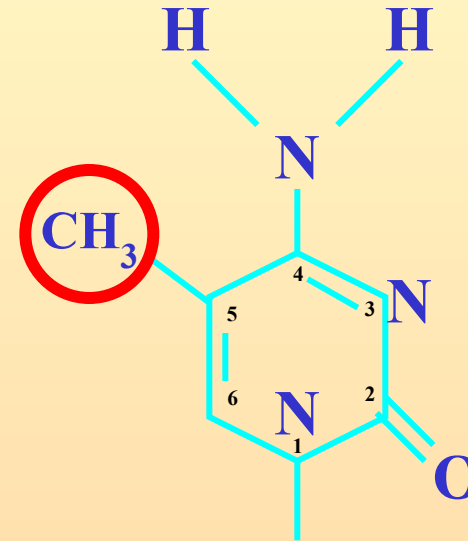


Воздействие среды (лечение)
может компенсировать действие мутаций и вернуть развитие к норме



Вредное влияние среды
может привести к отклонению от нормального пути развития даже при отсутствии мутаций

Молекулярные основы эпигенетики



5-Метилцитозин

Rollin Hotchkiss в 1948 году впервые выделил 5-метилцитозин в составе ДНК из тимуса теленка, хотя, пятый нуклеотид, 5-метил-дезоксцитидин, был впервые описан в ДНК из туберкулезной бациллы еще в 1925 г.

Молекулярные основы эпигенетики



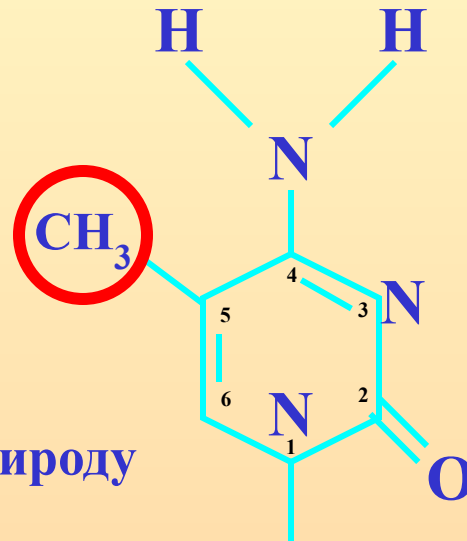
Б.Ф. Ванюшин

16 февраля 1935

Впервые определил природу метилируемых последовательностей ДНК у разных видов организмов (1959 г.)

«Метилирование ДНК контролирует все генетические процессы в клетке (репликация, транскрипция, репарация ДНК, рекомбинация, транспозиция генов), оно является механизмом клеточной и половой дифференцировки и

геномного импринтинга».



Robin Holliday

В 1975 г. обосновал роль метилирования ДНК в регуляции работы гена и предложил термин «эпимутация», а в 1979 г. определил вклад метилирования ДНК в процесс канцерогенеза.



Evolution of cancer DNA methylotyping

Vladimir V Strelnikov^{*,1,2}  & Dmitry V Zaletaev^{1,2,3}

¹Epigenetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

²Molecular & Cell Genetics Department, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³Medical Genetics Laboratory, IM Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

*Author for correspondence: vstrel@list.ru

First draft submitted: 26 March 2019; Accepted for publication: 9 April 2019; Published online: 30 May 2019

Keywords: 5-methyldeoxycytidine • cancer • DNA methylation • epigenomics • reduced representation bisulfite sequencing



Американцам Эндрю Файру и Крэйгу Мэллоу “за открытие фундаментального явления РНК-интерференции - подавления экспрессии генов с помощью РНК” в 2006 году была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.



В 1990 г. **Робин Холлидей** дал более конкретное определение эпигенетики. «Исследование механизмов временного и пространственного контроля генной активности в сложных организмах».

В 1992 г. **Брайан Холл** определил эпигенетику, как «сумму генетических и негенетических факторов, воздействующих на клетки в целях селективного контроля экспрессии генов, которые позволяют увеличить фенотипическое разнообразие в процессе развития».

Еще более узкое определение эпигенетики было предложено в 1996 г. **Артуром Риггсом**: «исследование митотически и/или мейотически наследуемых изменений в экспрессии генов, которые нельзя объяснить изменениями в ДНК».

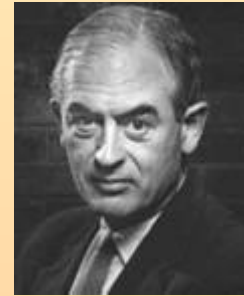
Эпигеном - это совокупность всех эпигенетических маркеров, обуславливающих экспрессию/инактивацию генов в данной клетке.

Геном/клетка содержит информацию двух видов – генетическую и эпигенетическую.

Генетическая информация – руководство по созданию живого организма.

Эпигенетическая информация – как, где и когда должна быть реализована генетическая информация.

*«Генетика предполагает, а эпигенетика располагает»
(Питер Медавар)*



Эпигенетика может рассматриваться как более высокий уровень генетической организации и регуляции, который не контролируется «центральной догмой» молекулярной биологии:

ДНК -> РНК -> белок

Эпигенетическая регуляция - наследственные и ненаследственные изменения в экспрессии конкретного гена без каких-либо соответствующих структурных изменений в его нуклеотидной последовательности.

Явления импринтинга, эффекта положения, особенности структурно-функциональной организации хроматина определенных хромосомных локусов (ремоделлинг хроматина), влияющих на экспрессию генов, и РНК-интерференция классифицируются как эпигенетические.

Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов можно определить как наследственный код, отличный от геномной последовательности нуклеотидов, который включает пост-трансляционную модификацию гистонов, ДНК-метилирование цитозина в CpG-динуклеотидах, АТФ-зависимый ремоделинг хроматина, обмен гистонов и их вариантов и различные типы малых, длинных, антисмысловых и некодирующих РНК, которые участвуют в инактивации и экспрессии генов.

На сегодняшний день, имеет смысл выделить три краеугольных эпигенетических механизма регуляции экспрессии генов: метилирование ДНК, модификацию гистонов и РНК-интерференцию.



Уровни эпигенетической регуляции

<p>ДНК (геном)</p>	<p>Метилирование CpG. Метилирование CpH, 5hmC, 5fC, 5caC; мутации отдаленных регуляторных элементов и транспозиции генетического материала.</p>
<p>РНК (эпитранскриптом)</p>	<p>РНК-интерференция. miРНК, siРНК, shРНК и др., длинные некодирующие, антисмысловые и кольцевые РНК; регуляторные мотивы пре-мРНК; альтернативный сплайсинг; цис- и транс-сплайсинг, индуцированный транскрипцией; метилирование 6mA (ApH); редакция РНК.</p>
<p>Белки (протеом)</p>	<p>Гистоновый код. Метилирование/деметилирование лизина 4, 9, 27, 36 и 79 гистона H3 и лизина 20 гистона H4; ацетилирование/деацетилирование гистонов H3 и H4; белковые комплексы, ремоделирующие хроматин; рибонуклеопротеиновые комплексы.</p>

The epigenome

DNA methylation

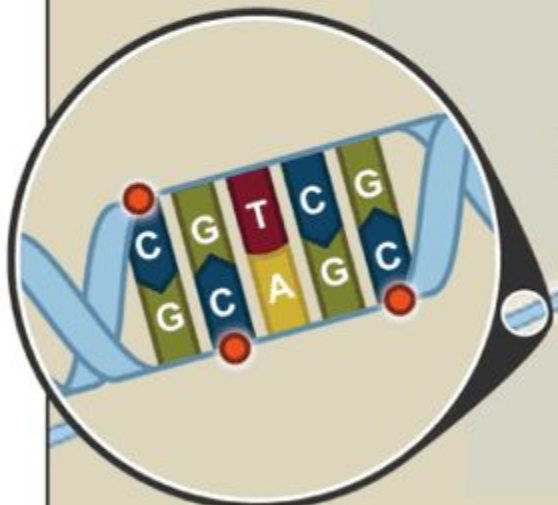
[●]

DNA accessibility

Histone modifications

[●]

Polycomb complex



DNA
Histone

DNA binding proteins

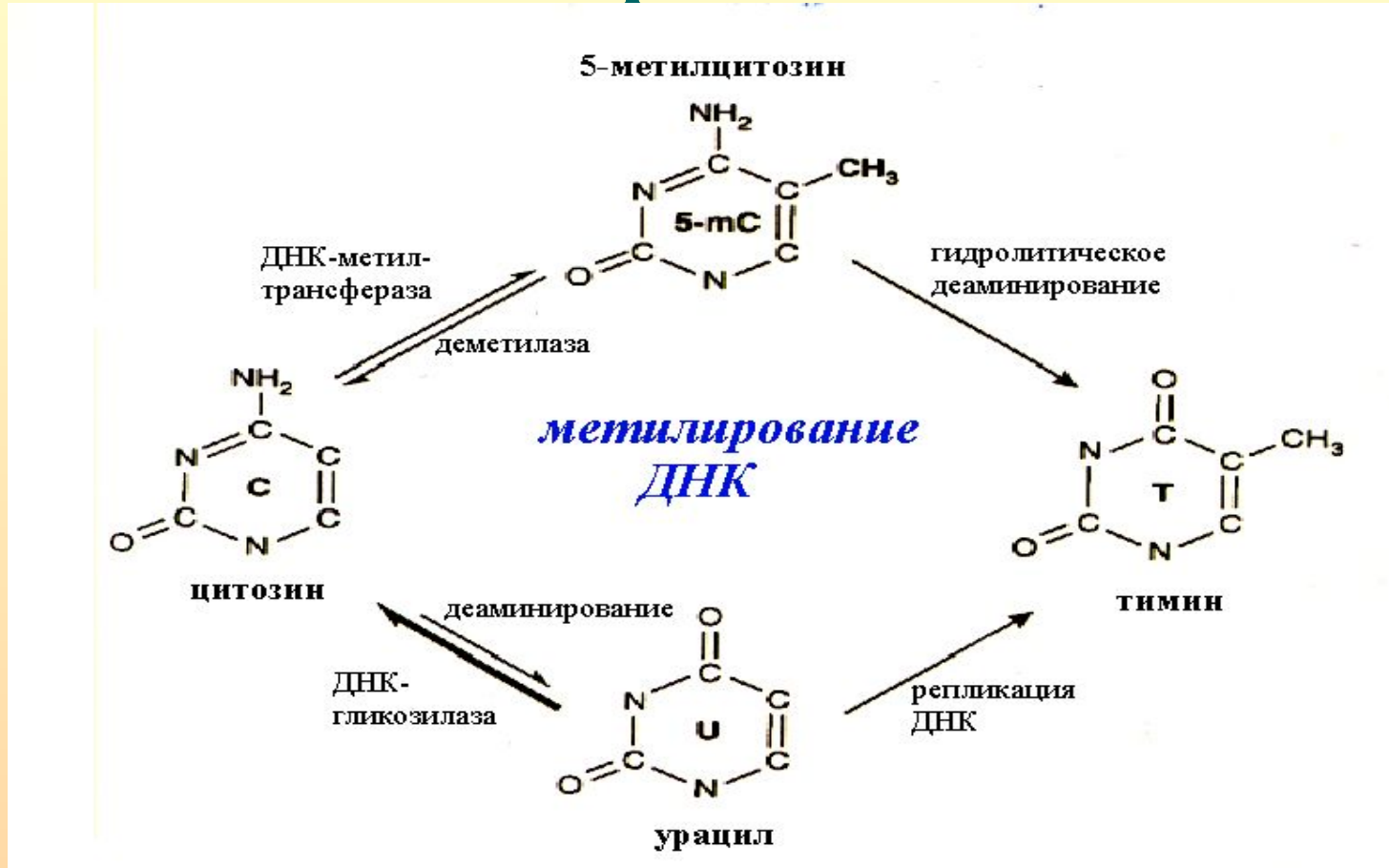


RNA



Метилирование ДНК вовлечено в широкий круг биологических процессов, которые включают регуляцию репликации и сплайсинга ДНК, структуры хроматина, экспрессии тканеспецифичных генов, клеточную дифференцировку, инактивацию X-хромосомы и геномный импринтинг, канцерогенез, латентный период у вирусов.

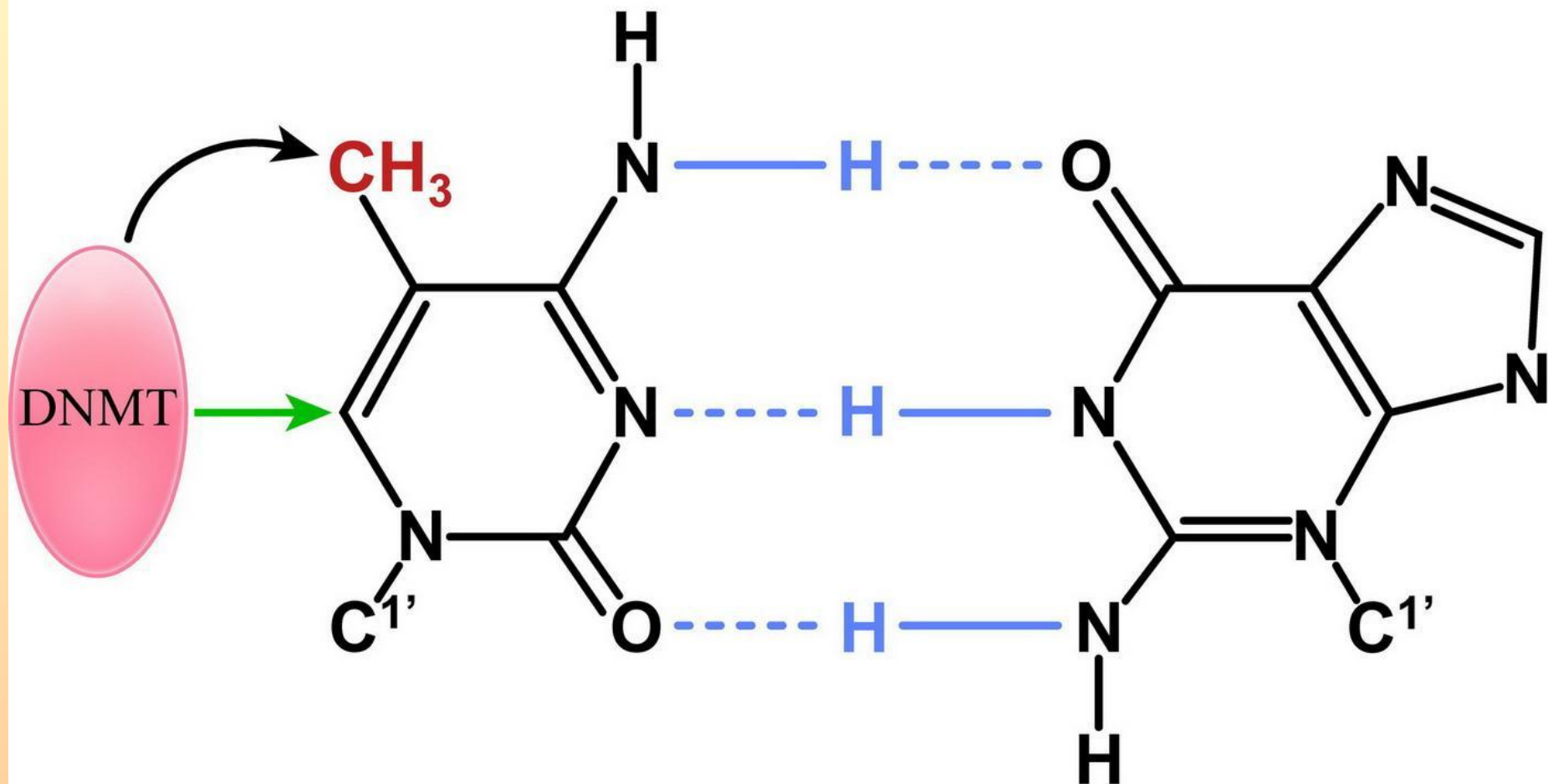
Схема метилирования цитозина



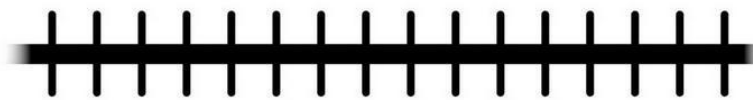
Метилирование цитозиновых остатков (обратимая ковалентная модификация ДНК, при которой цитозиновый остаток метилируется в позиции N5 пиримидинового кольца) осуществляется с помощью ДНК-метилтрансфераз - Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b, которые переносят метильную группу S-аденозилметионина.

цитозин

гуанин



Неметилированная
ДНК

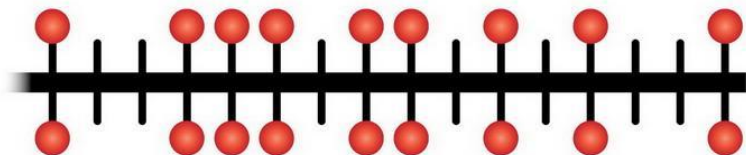


метилирование
de novo

Dnmt3a
Dnmt3b



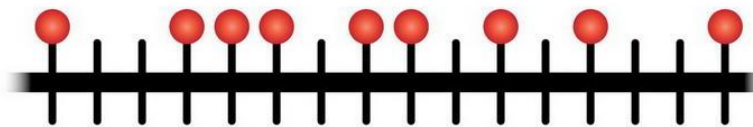
Метилированная
ДНК



репликация
ДНК



Гемиметилированная
ДНК



Dnmt1

поддерживающее
метилирование



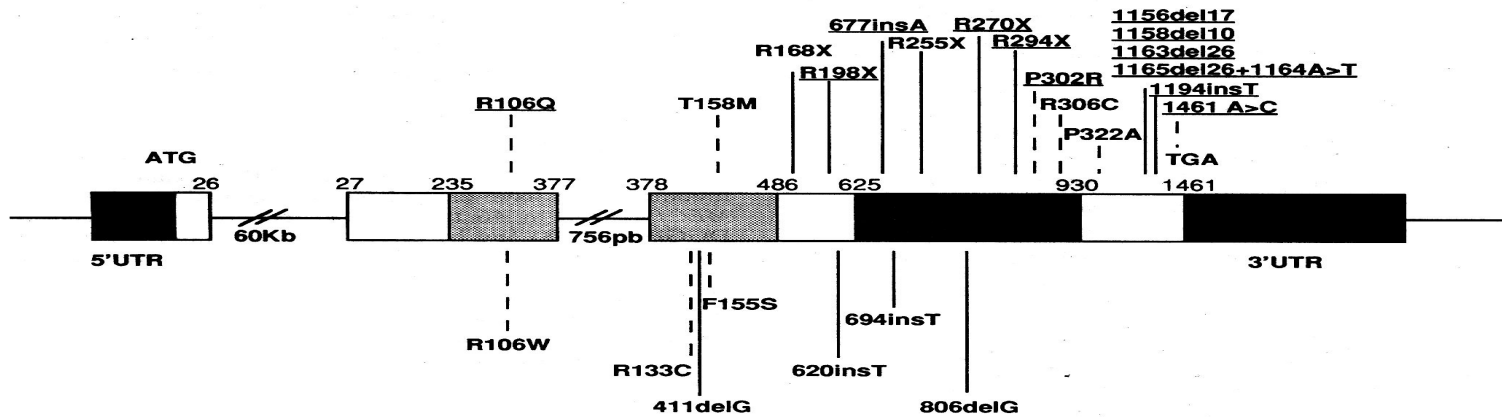
Фенотипические проявления мутаций ДНК-метилтрансфераз и метилсвязывающих белков

Модификатор	Функция	Мутантный фенотип у мышей
Метилирование ДНК		
DNMT1	ДНК метилтрансфераза	Деметилирование генома, остановка развития на E8,5
DNMT3a	ДНК метилтрансфераза	Патология кишечника, аномалии сперматогенеза, постнатальная летальность в 4 недели
DNMT3b	ДНК метилтрансфераза	Деметилирование микросателлитной ДНК, дефекты нервной трубки, эмбриолетальность на сроке E14,5-E18,5
Метилсвязывающие белки		
Mbd3	Ремоделирующий хроматин комплекс NuRD	Нормальная имплантация, остановка развития на сроке E6,5



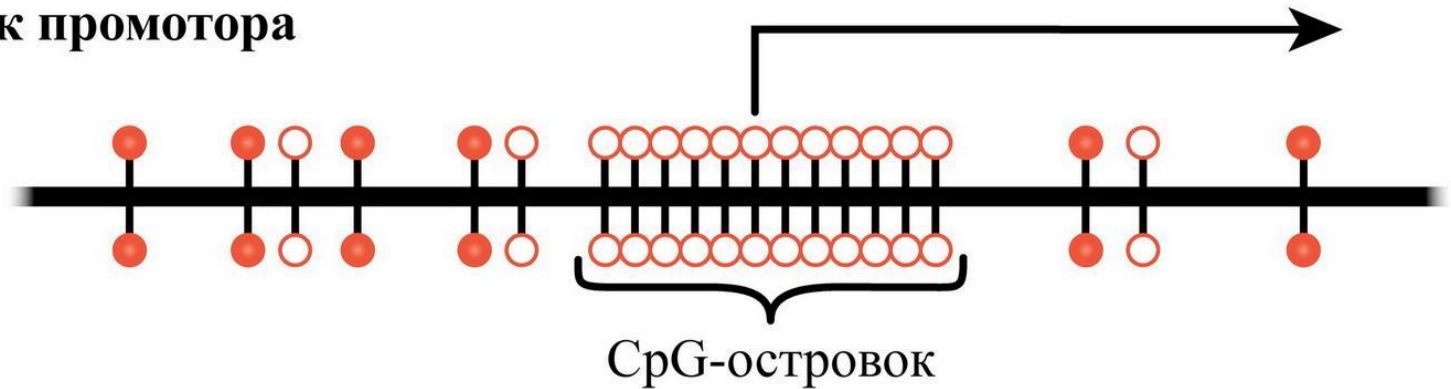
Синдром Ретта

MeCP2 /
метил-СрG/СрH
связывающий белок,
Xq28



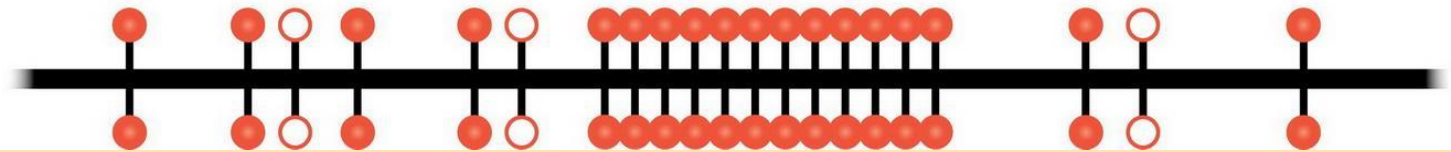
СрG-островков промотора

экспрессия



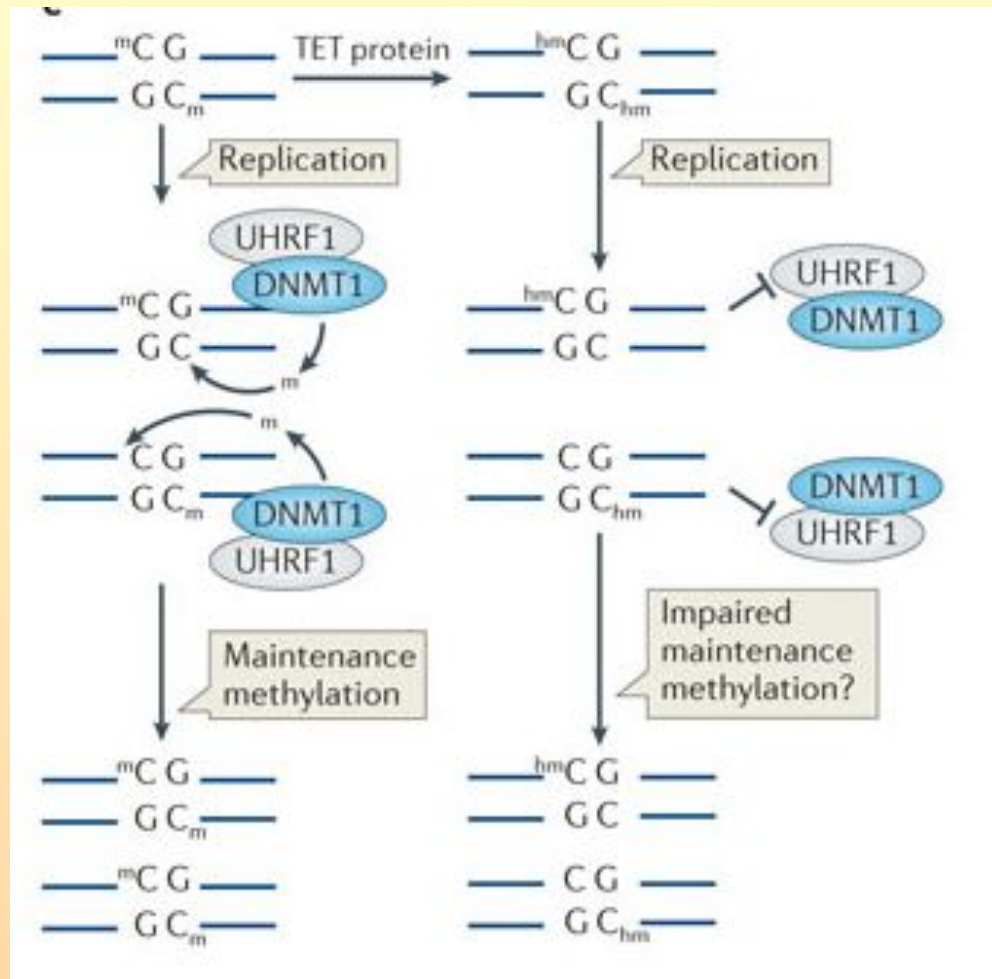
СрG-островков

инактивация



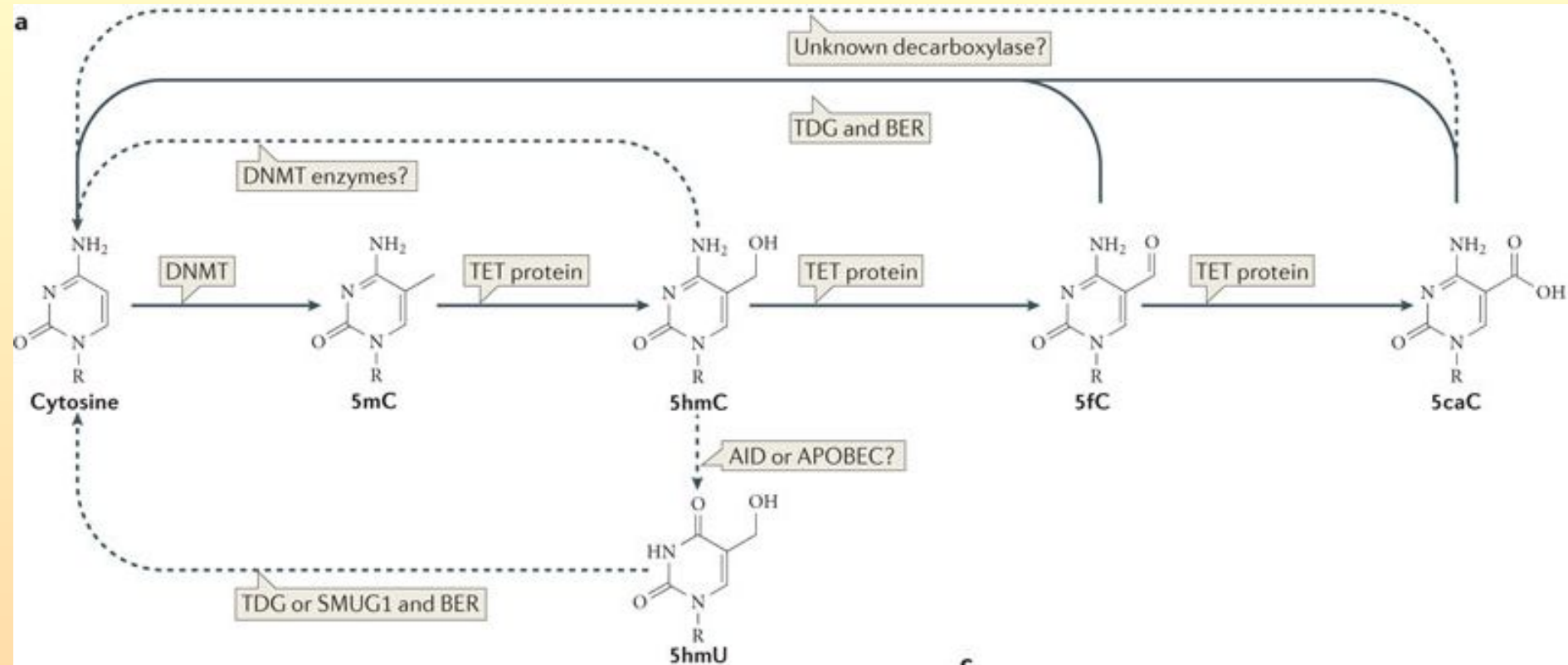
СрG-островки присутствуют в промоторных районах 60% генов, составляют от 0,5 до 1,5 т.п.н., содержание С + G превышает 60%, а соотношение СрG/GrC должно составлять не менее 0,6. За редким исключением (импринтированные гены) СрG-островки промоторных районов в нормальных тканях не метилированы, что свидетельствует о функционально нормальном состоянии гена.

Пассивное деметилирование ДНК



Белки ТЕТ получили свое название за счет ten-eleven translocation (t(10;11)(q22;q23), обнаруженной в отдельных случаях миелоидной и лимфоцитарной лейкемии и приводящей к образованию химерного гена *MLL1/TET1*. Белки ТЕТ1, 2, 3 являются Fe²⁺ и 2-оксоглутарат-зависимыми диоксигеназами окисляющими 5-mC. UHRF1 – может связываться с полуметилированной ДНК и привлекать DNMT1 для метилирования второй цепи ДНК

Активное деметилирование ДНК



Белки семейства ТЕТ могут последовательно окислять 5-метилцитозин до 5-гидроксиметилцитозина (5hmC), затем до 5-формилцитозина (5fC) и далее до карбоксилцитозина (5caC). 5fC и 5caC могут быть вырезаны тимидин ДНК-гликозилазой (TDG) и заменены на цитозин. Другие возможные механизмы деметилирования – 1) декарбоксилирование 5caC, 2) опосредованное DNMT удаление гидроксиметильной группы с 5hmC и 3) деаминирование 5hmC цитидиновыми деаминазами AID и APOBEC до 5hmU. 5hmU может вырезаться SMUG1 (урацил ДНК-гликозилаза). BER - base excision repair.

Функциональная значимость окисленных форм метильной группы в ДНК и РНК

Метил-связывающий белок MeCP2, которому достаточно одного метилированного CpG для связывания, реагирует также и на CpH. Относительная аффинность MeCP2 с mCpA схожа с mCpG, но значительно ниже с mCpT и mCpC.

Метилирование осуществляется теми же DNMT. Только механизм метилирования аденозина –6mA, пока, не выяснен.

Окисленные формы 5mC, видимо, имеют функциональное значение. Их значительно меньше в геноме, чем mCpG (80-90%), так 5hmC составляет 1-30%, а 5fC и 5caC – 8-10%, в зависимости от типа клеток. 5hmC обычно обнаруживают в районах энхансеров и сайтах гиперчувствительности к DNKазе I, 5fC – в межгенных районах, в экзонах и неработающих энхансерах, 5caC – в районах, обогащенных большими сателлитными повторами, но все они окружают районы связывания белков с ДНК: MeCP2 и TNA11 могут связываться с 5hmC, а FOXK1, FOXK2, FOXR1, FOXR4 и FOXI3 активно взаимодействуют с 5fC. Все это свидетельствует о функциональной значимости.

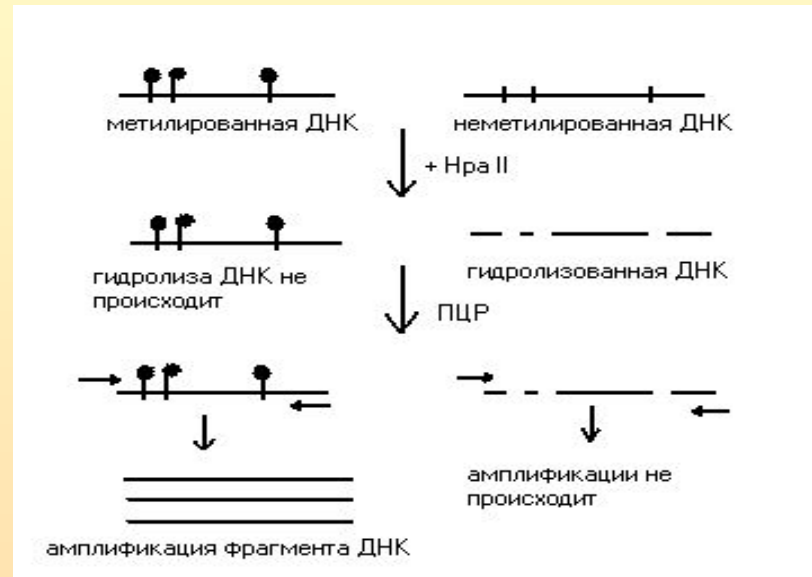
Аналогично метилированию ДНК происходит метилирование аденозина мРНК, tРНК или длинных некодирующих РНК в позиции N6 (6mA). Процесс метилирования/деметилирования РНК очень динамичный, осуществляемый комплексом РНК-метилтрансфераз и РНК-деметилазами, которые окисляют 6mA до 6hmA и 6fA. Определен ряд белков, которые взаимодействуют с 6mA. Функциональную значимость 6mA, 6hmA и 6fA еще предстоит выяснить.

Методы анализа метилирования

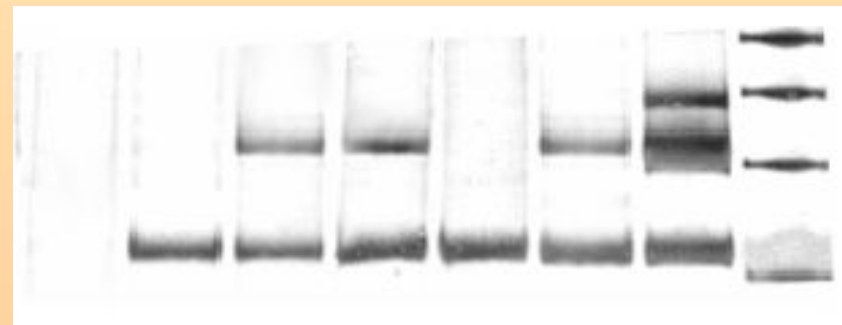
- 1. Метилчувствительная ПЦР (NotI, EagI, SacII, HpaII, HhaI)
аналитическая чувствительность - 1: 2000;**
- 2. Метилспецифическая ПЦР
Трансформация цитозина в урацил бисульфитом Na
аналитическая чувствительность - 1: 1000;**
- 3. MethylLight – метилспецифическая ПЦР в реальном
времени
аналитическая чувствительность - 1: 1000000;**
- 4. Биологические микрочипы;**
- 5. Метилспецифическое секвенирование по Сенгеру;**
- 6. Высокопроизводительное секвенирование нового
поколения (NGS)**

Метилчувствительная ПЦР

Схема МЧ-ПЦР



О 1 2 3 4 5 П М



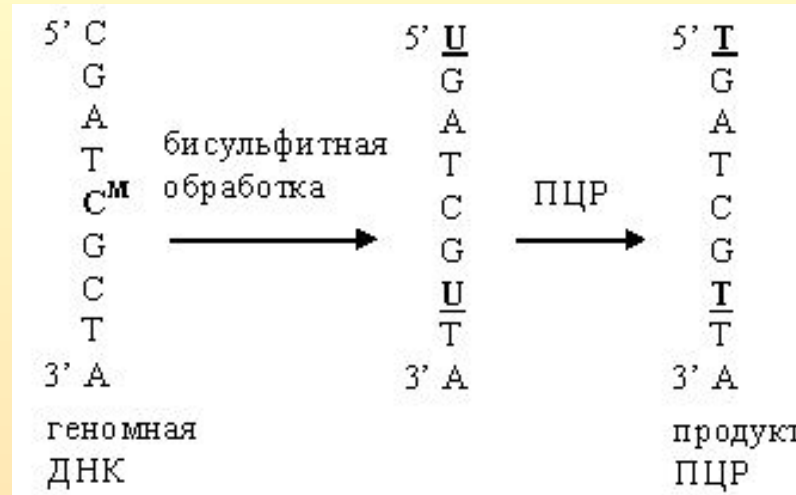
- контр. на полноту гидролиза
- *p16*

- внутр. контр.

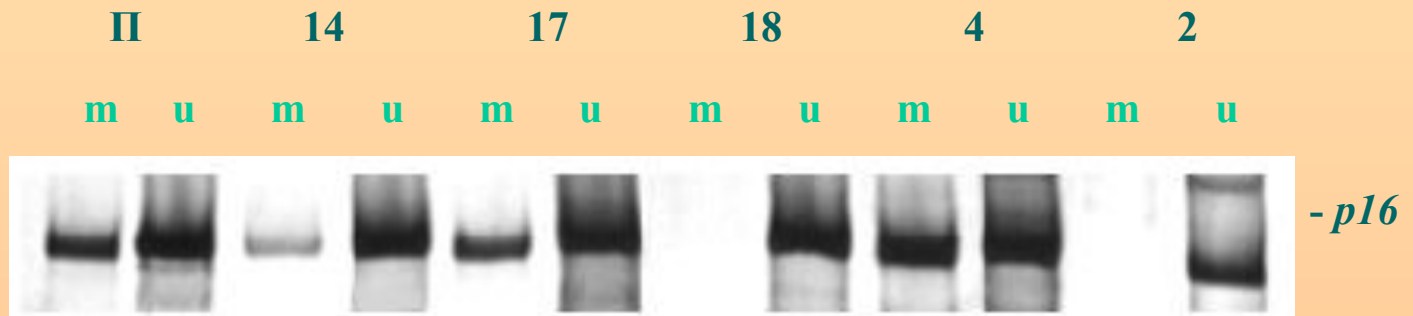
Анализ метилирования гена *p16* методом МЧ-ПЦР в образцах ОЛ.

Метилспецифическая ПЦР

Схема МС-ПЦР

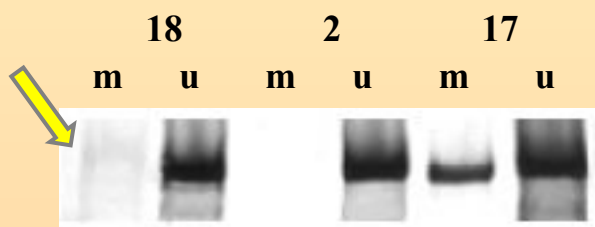


При обработке геномной ДНК бисульфитом натрия происходит дезаминирование неметилированного цитозина с образованием урацила, при этом 5-метилцитозин дезаминированию не подвергается - двухцепочечная спираль ДНК превращается в две некоплементарные одноцепочечные нити. Обработанная бисульфитом ДНК может быть использована для ПЦР-анализа, в котором урациловые и тиминовые остатки будут амплифицироваться как тимин и только 5-метилцитозиновые остатки амплифицируются как цитозин.

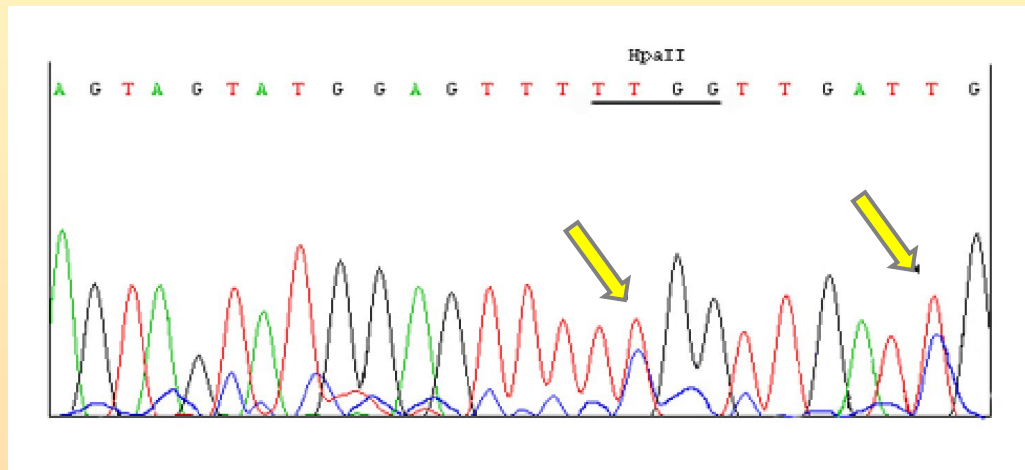


Анализ метилирования гена *p16* методом МС-ПЦР в образцах ОЛ.

Сравнение методов МЧ-ПЦР и МС-ПЦР.



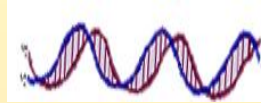
Для образца 18 методом МЧ-ПЦР показано метилирование первого экзона гена *p16*, методом МС-ПЦР метилирование в этом образце не выявлено.



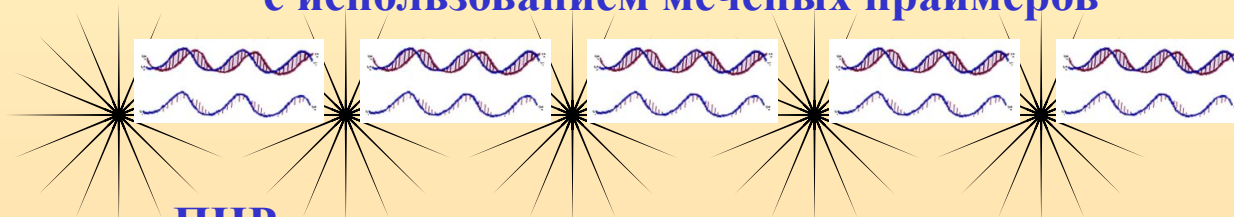
МС-секвенирование с гетерогенным характером метилирования сайта узнавания рестриктазы *HpaII* (образец 18).

Анализ метилирования на биологических микрочипах

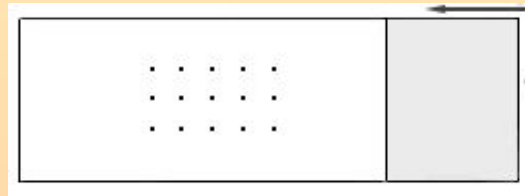
Выделение ДНК



Ассиметричная мультипраймерная ПЦР
с использованием меченых праймеров



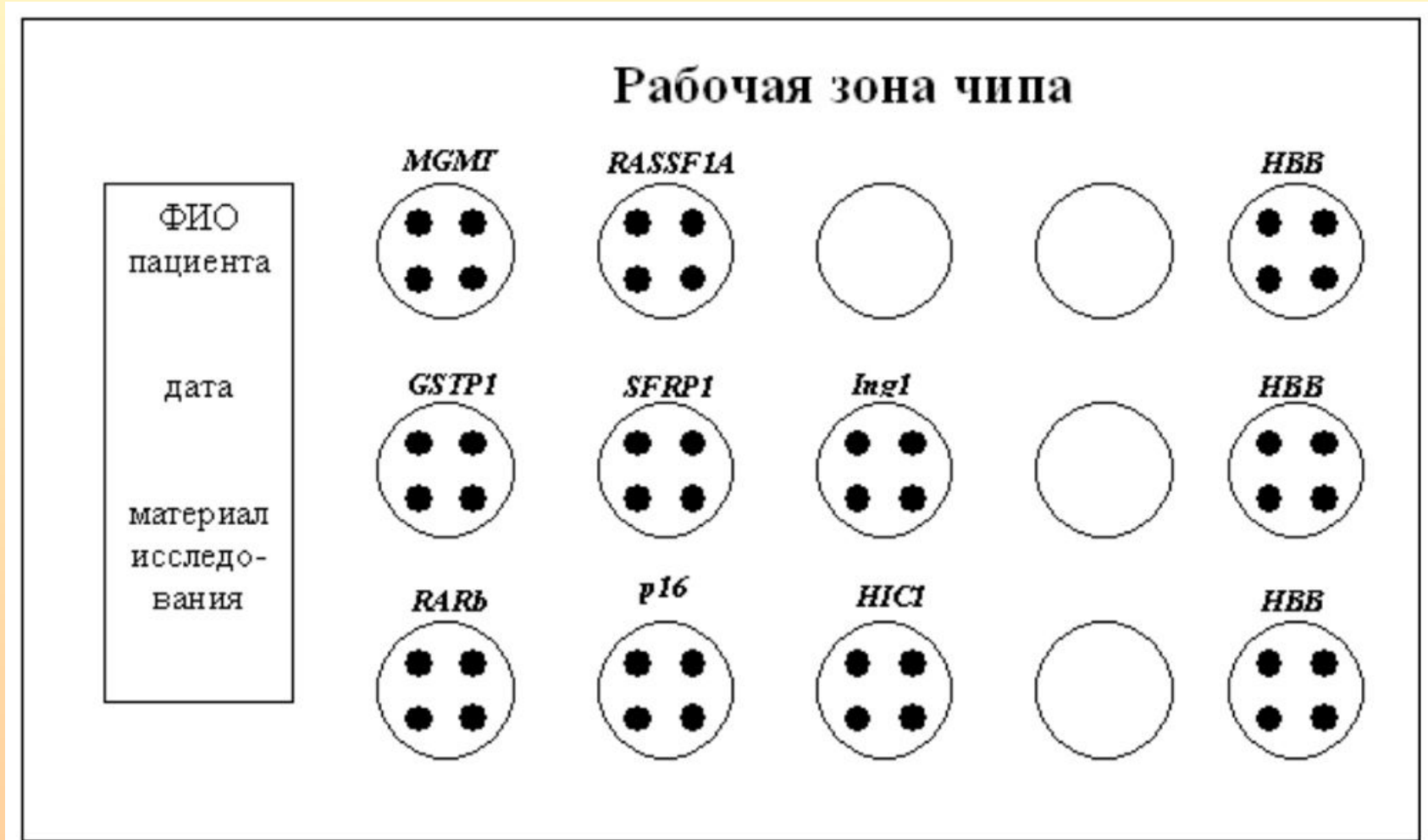
Гибридизация ПЦР-продуктов с нанесенными на стекло олигонуклеотидами

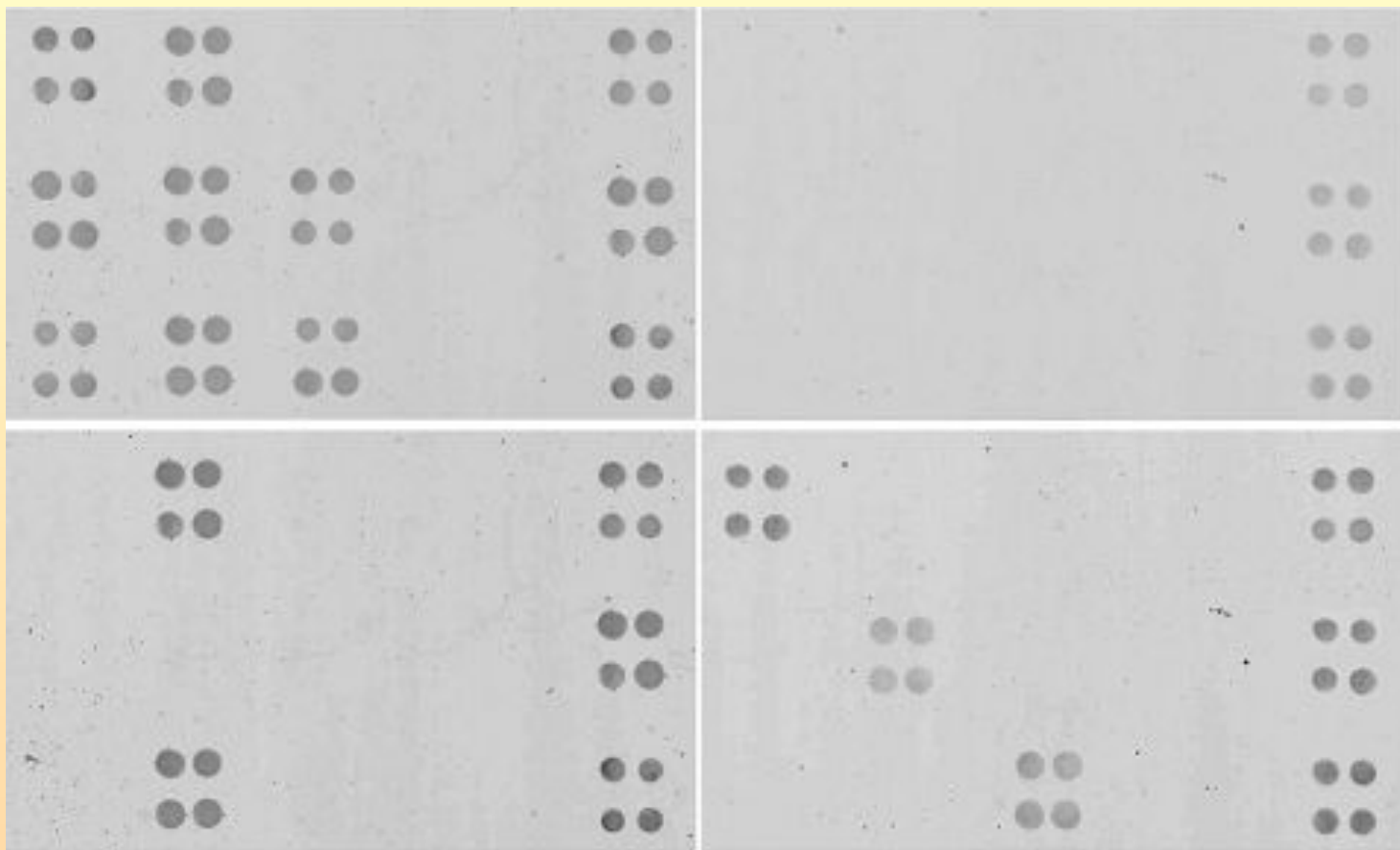


Визуализация результатов гибридизации и анализ изображения



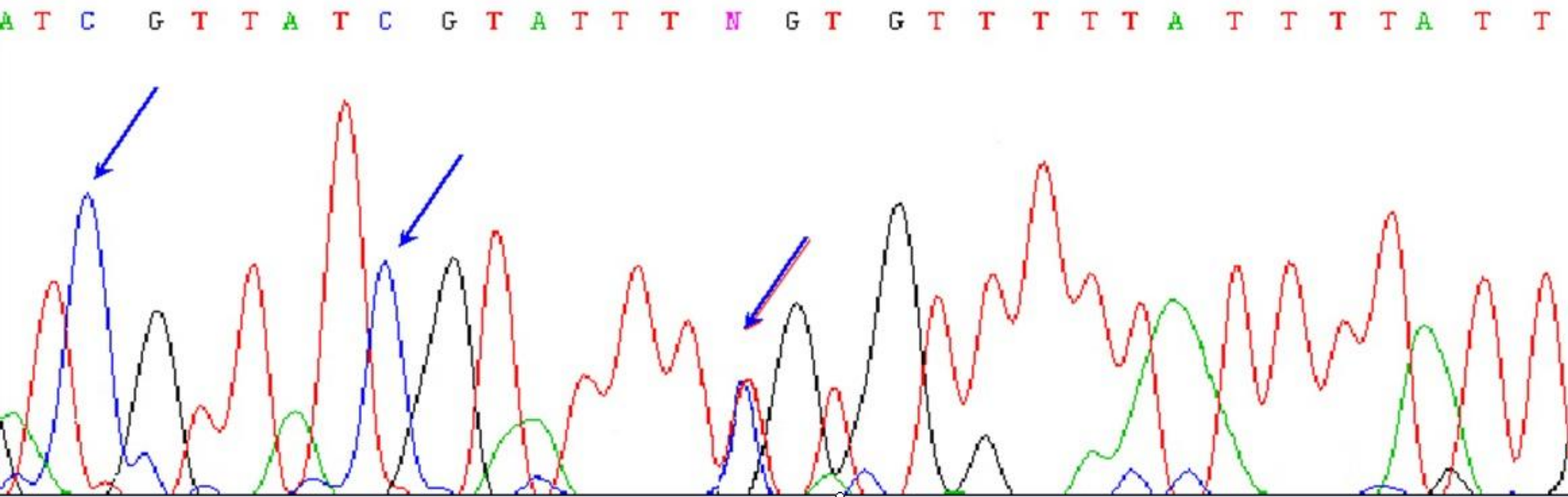
Схема чипа для определения метилирования генов, вовлеченных в канцерогенез





Гибридизация не гидролизованной метилчувствительными ферментами рестрикции ДНК; гибридизация контрольной гидролизованной ДНК; гибридизация клинических образцов

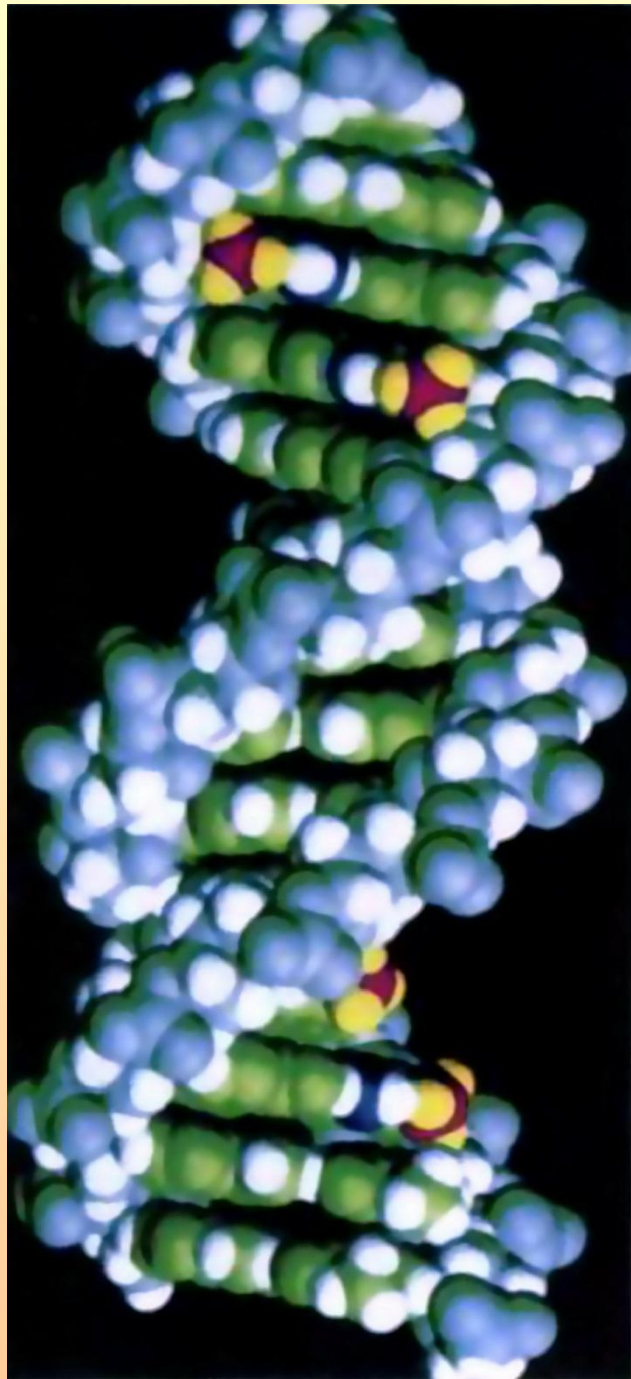
Метил-специфическое секвенирование участка CpG-островка

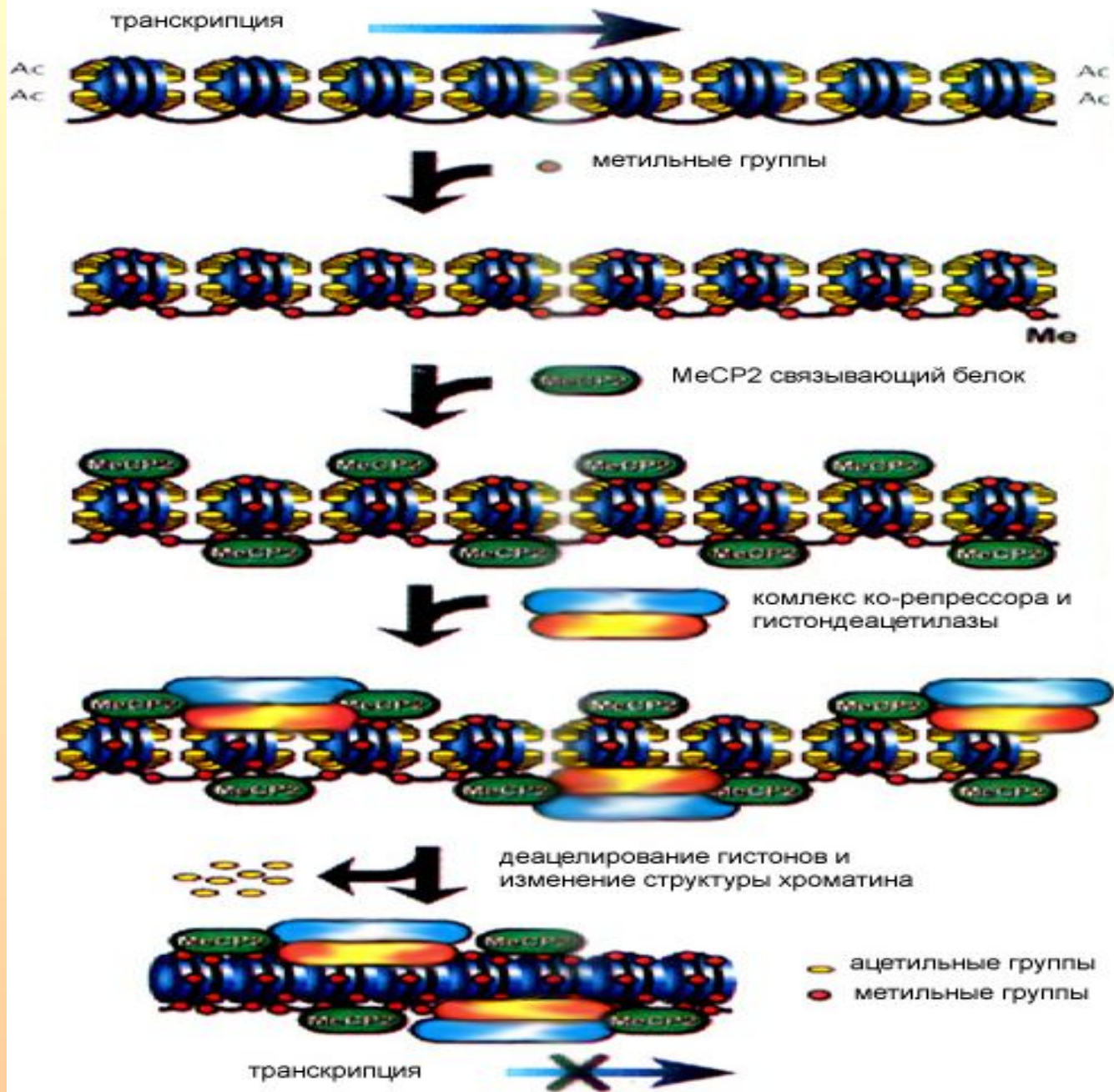


Синими стрелками указаны позиции метилированных (немодифицированных) остатков цитозина, красно-синяя стрелка указывает на гемиметилированный остаток цитозина.

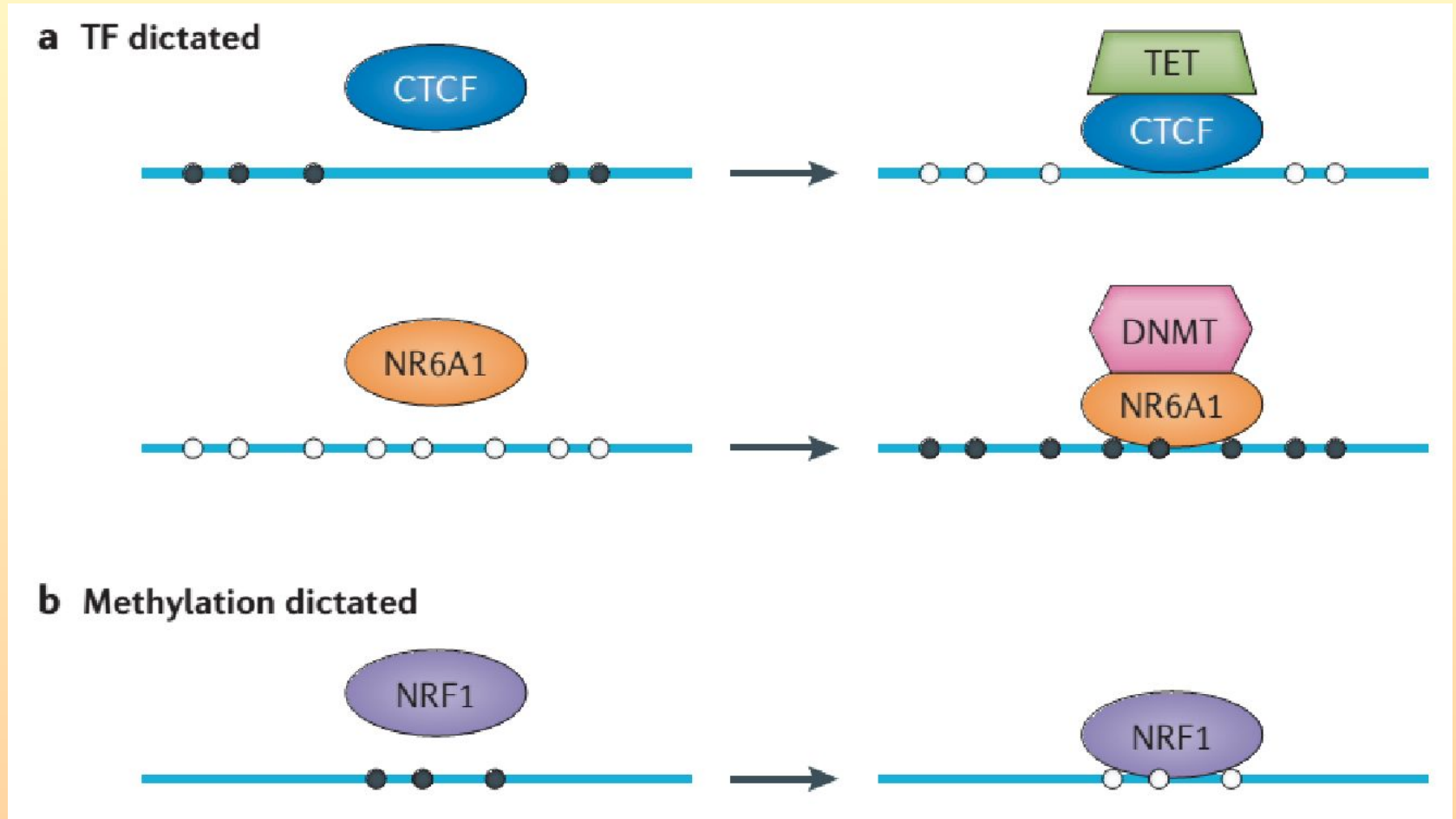
Механизмы инактивации гена в результате метилирования промоторной области

1. Метильные группы нарушают ДНК-белковые взаимодействия, выступая в большую бороздку ДНК и препятствуя связыванию специфических транскрипционных факторов, а неспецифических – не препятствуют.
2. Метилированные районы ДНК специфически связывают транскрипционные репрессоры/активаторы.
3. Метилирование ДНК влияет на структуру хроматина.

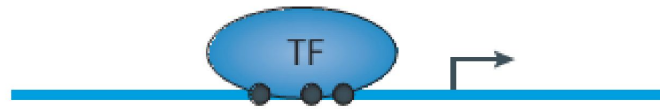




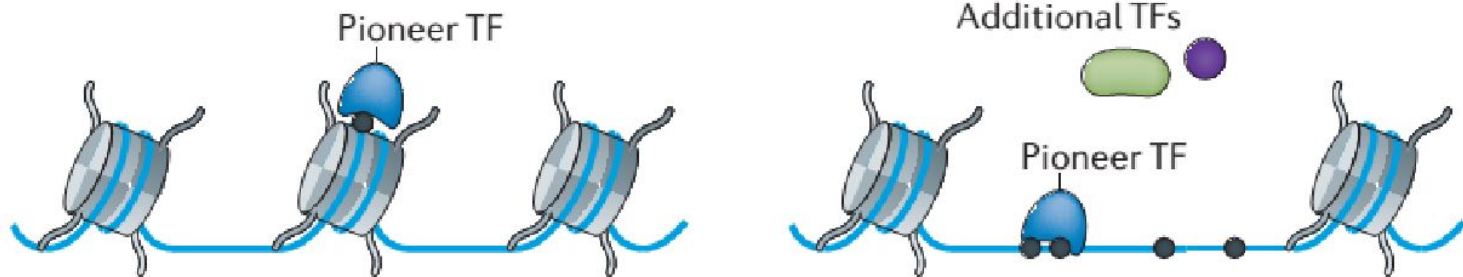
Транскрипционные факторы могут участвовать в регуляции экспрессии вне зависимости от статуса метилирования ДНК



a Gene expression activation



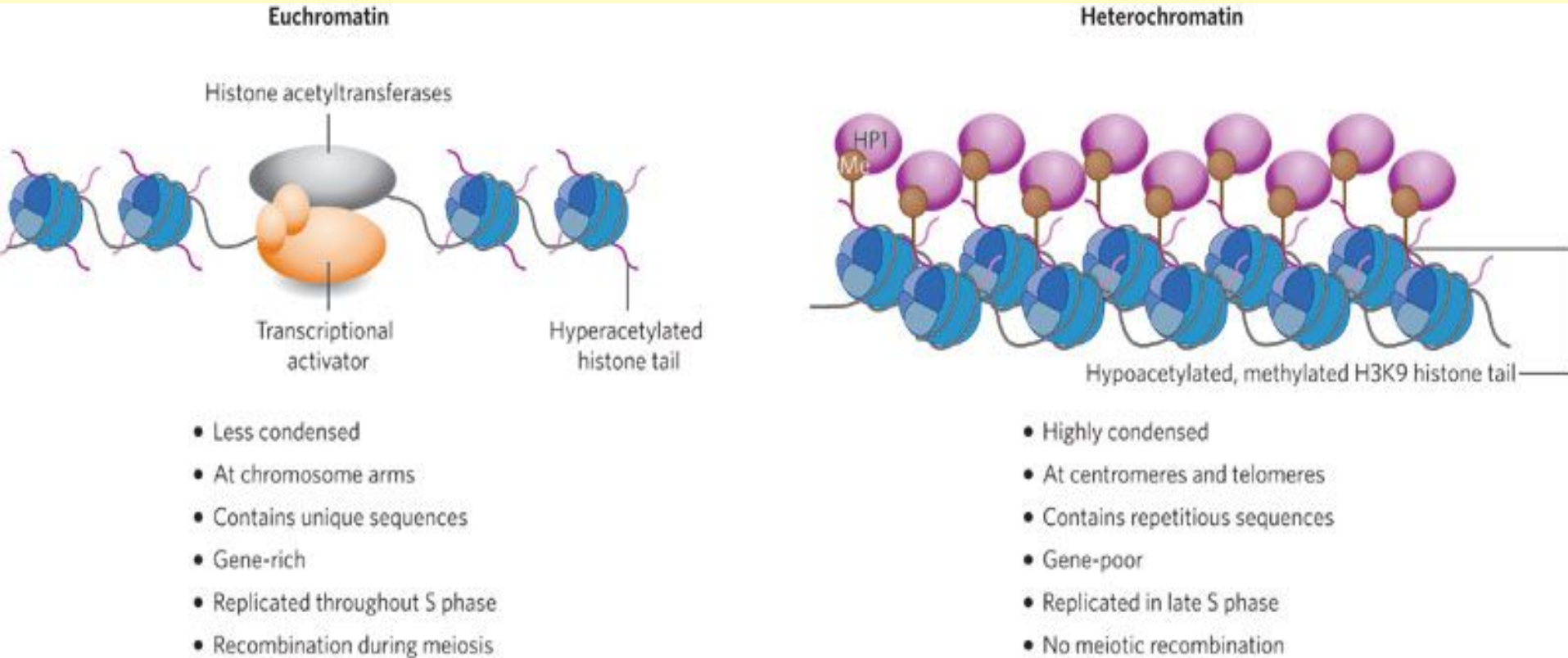
b Pioneer TFs



c Splicing regulation



Характеристики эу- и гетерохроматина



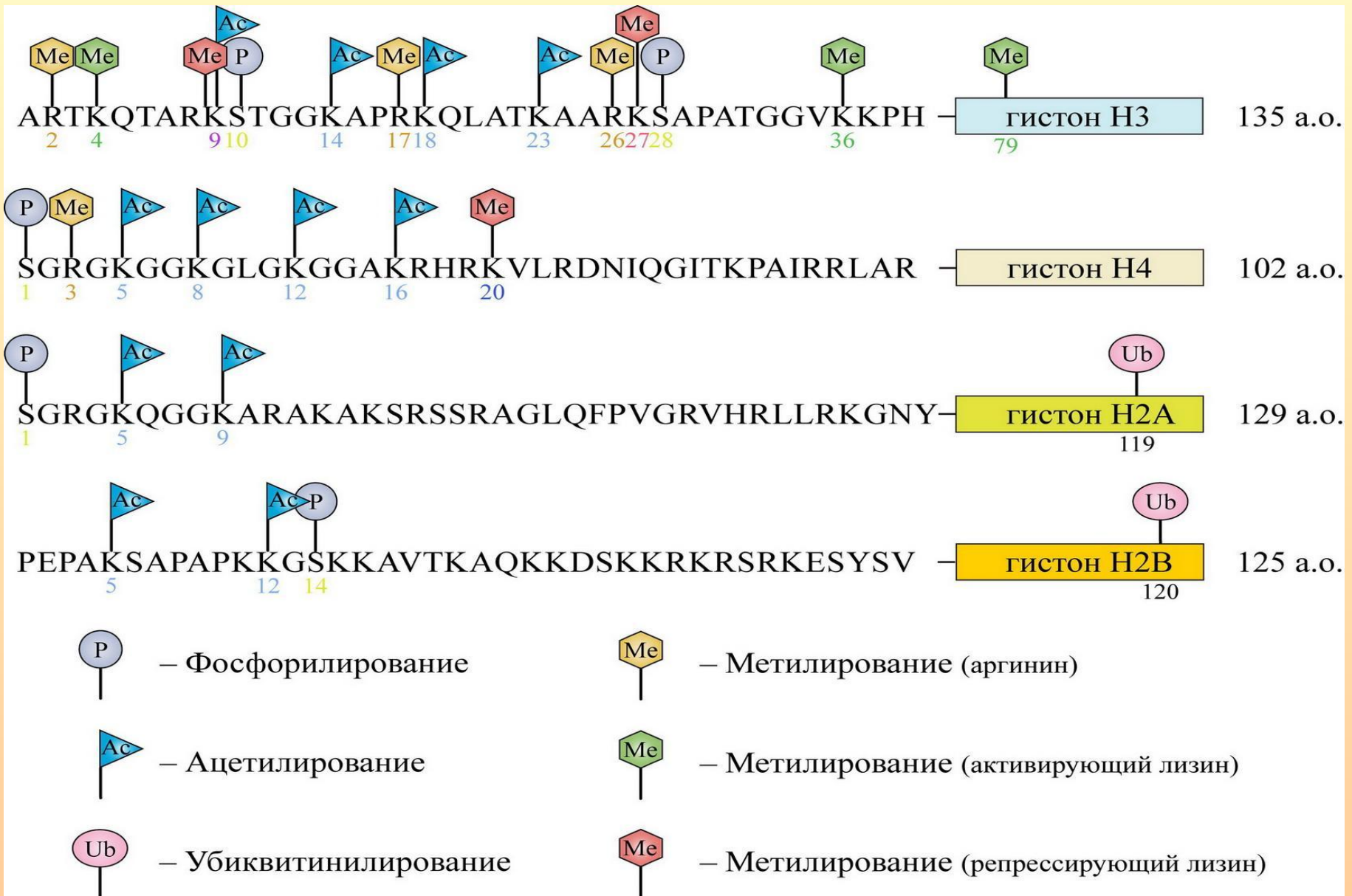
Хроматин существует в двух основных состояниях. Эухроматин деконденсирован, содержит основную массу активно экспрессирующихся генов, реплицируется в начале S- фазы клеточного цикла. Гетерохроматин конденсирован, неактивен, содержит незначительное количество генов, представлен в основном повторяющимися последовательностями, в том числе псевдогенами, и реплицируется в конце S-фазы.

Основной структурной единицей хроматина является нуклеосома. Она представляет собой белковый октамер, образованный двумя молекулами каждого из коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4), с которым связан участок ДНК длиной 147 п.н. Структура коровых гистонов эволюционно консервативна, но их N-концевые «хвосты», выходящие за пределы ядра нуклеосомы, могут претерпевать многочисленные посттрансляционные модификации, включая ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и др.

Гистоновый код - разнообразный набор модификаций N-концевых районов гистоновых белков (метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, рибозилирование, убиквитинилирование, сумоилирование), определяющий функциональное состояние гена.

Посттрансляционная модификация гистонов может модулировать структуру хроматина, ослабляя взаимодействие гистонов с ДНК и, тем самым, активировать транскрипцию. Модификации гистонов могут происходить последовательно или в комбинации друг с другом и, таким образом, привлекают хроматин-связывающие белки для выполнения специфических функций. Вместе с метилированием ДНК, ковалентные модификации гистонов определяют эпигенетическое поддержание и контроль экспрессии.

Гистоновый код

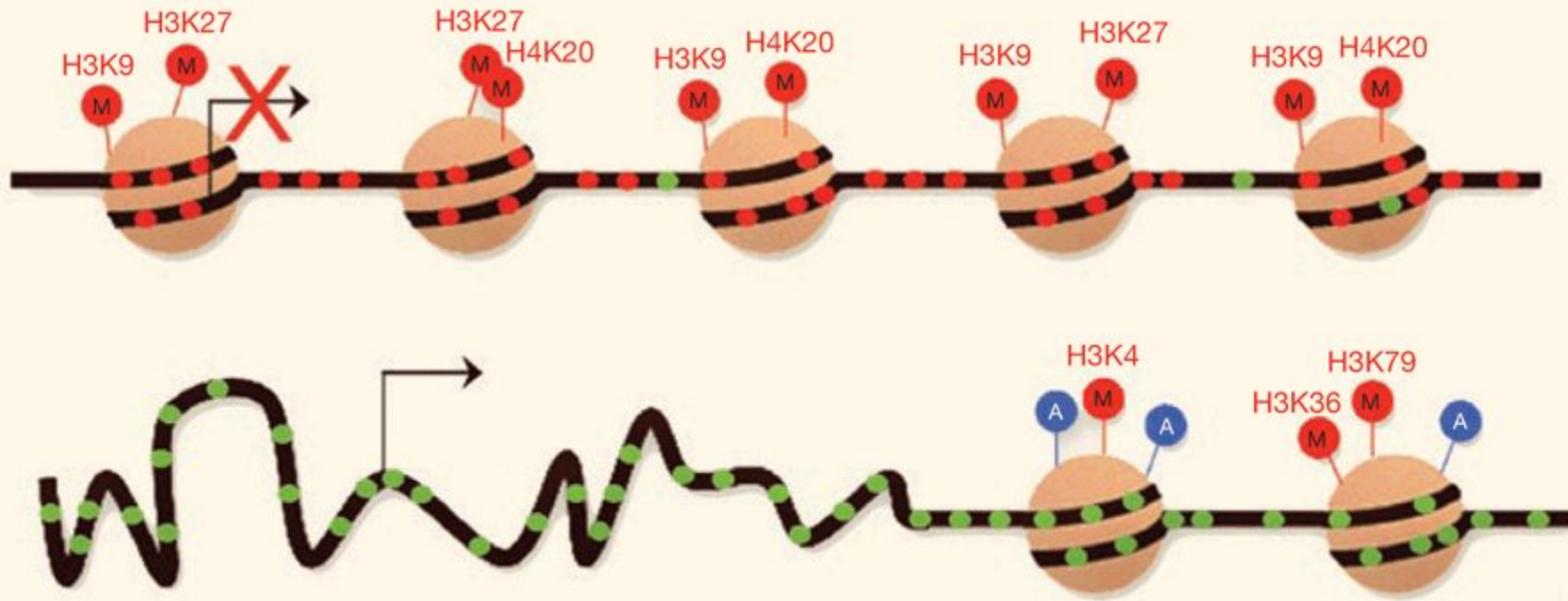


К маркерам активации гистонов, которые связаны с эухроматином и повышением генной экспрессии, можно отнести ацетилирование лизинов в гистонах H2A, H2B, H3, H4: ацетилирование 9 лизина (H3K9), 14 лизина (H3K14), 5 лизина (H4K5) и 16 лизина (H4K16); метилирование лизинов H2BK5, H3K4, H3K36, и H3K79; фосфорилирование 3 треонина в гистоне H3 (H3T3), 10 серина в H3 (H3S10), 28 серина (H3S28) и 1 серина в гистоне H4 (H4S1); и убикветинилирование H2BK120.

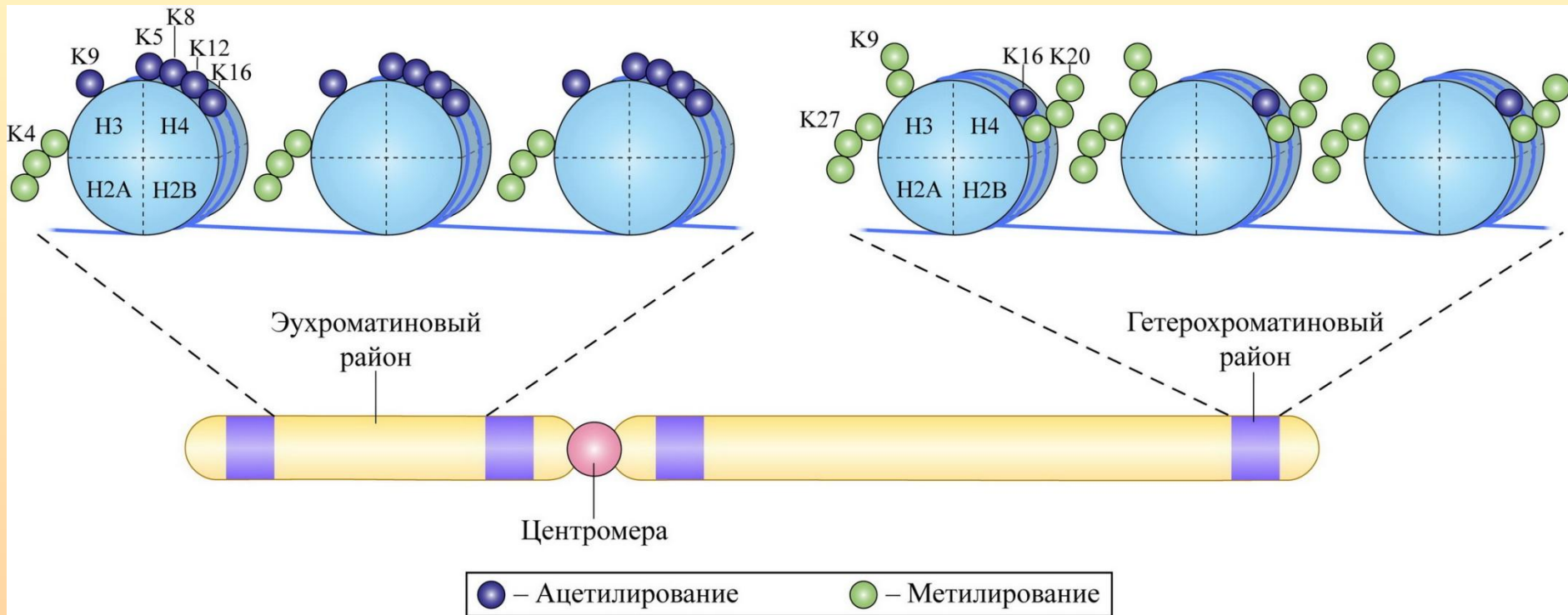
К репрессивным гистоновым маркерам, которые коррелируют с гетерохроматином и репрессией генов, относится метилирование H3K9, H3K27 и H4K20; убикветинилирование H2AK119; и сумоилирование H2AK126, H2BK6 и H2BK7.

Метилирование H3K9, H3K27 и H4K20 является основной модификацией гистонов, соответствующей гетерохроматину и крупномасштабной репрессии транскрипции. При согласованном метилировании H3-K9 и ДНК может устанавливаться долговременный статус негативной регуляции транскрипции.

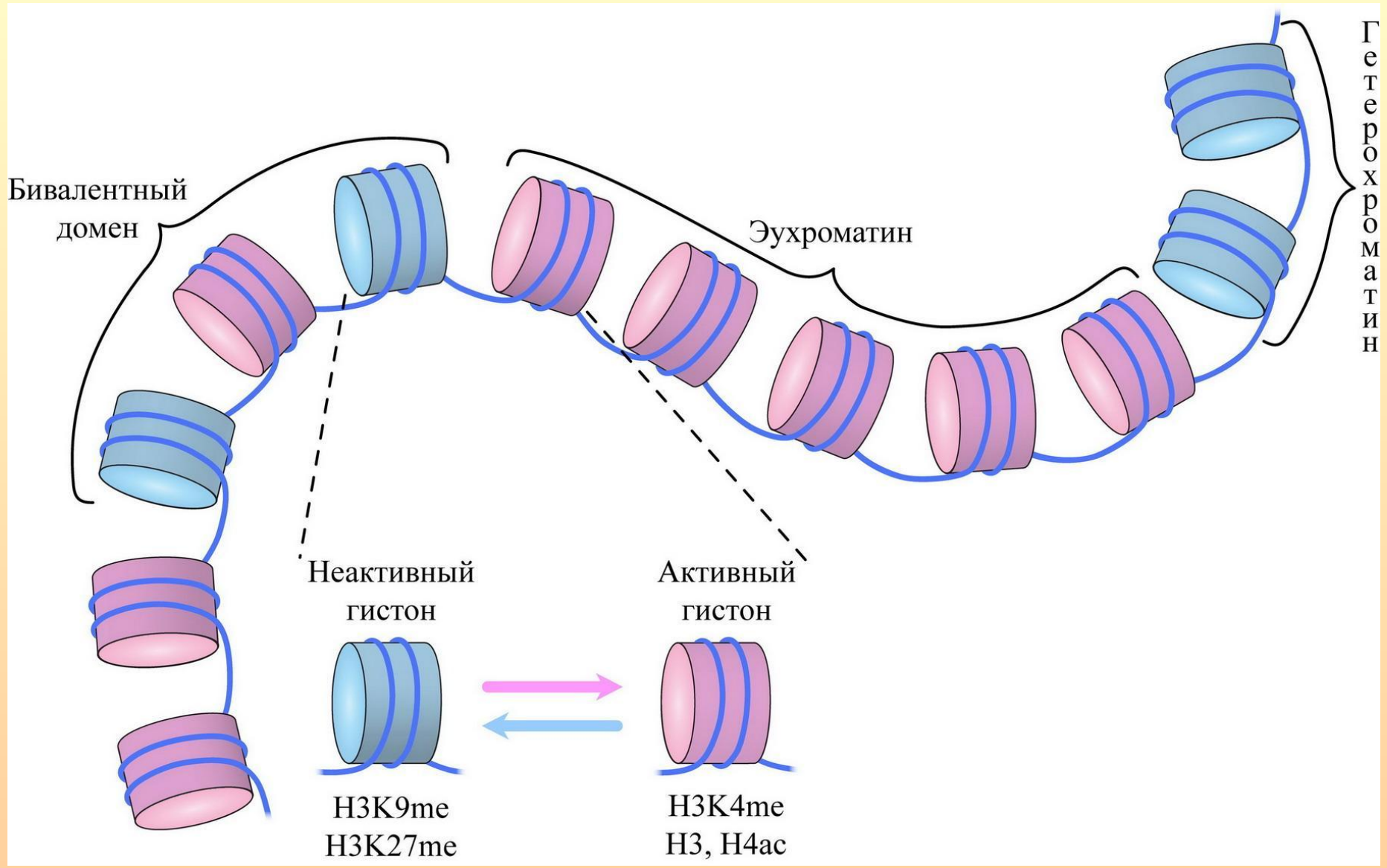
Триметилированный H3K4me3 служит глобальной эпигенетической меткой эухроматина, метилирование лизина H3K79 препятствует образованию гетерохроматиновых районов, H3K36 обнаружен в районах, где транскрипция благополучно идет или только что завершена.



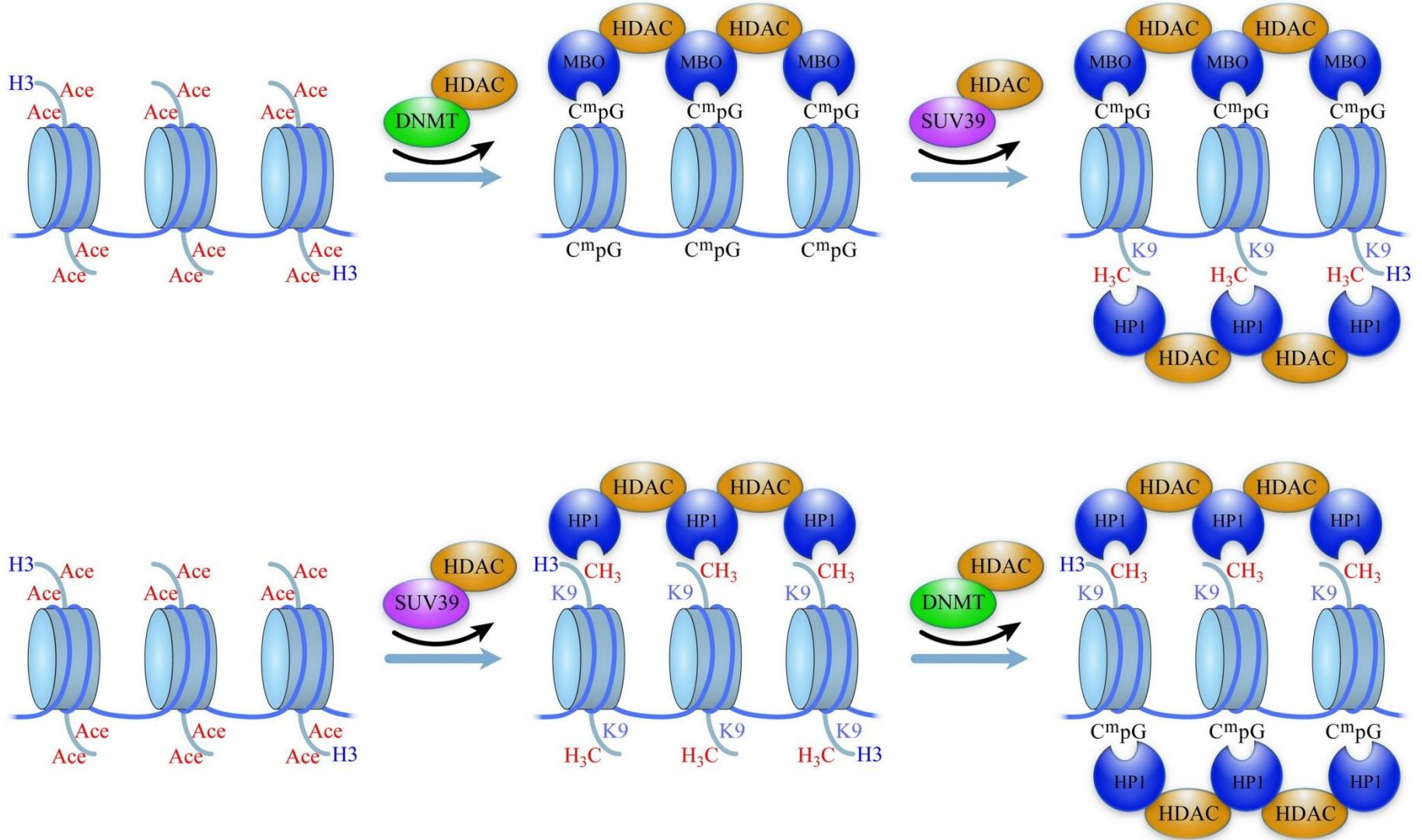
Модификации гистонов в нормальной клетке



Повышенный уровень ацетилирования гистонов стимулирует транскрипцию, а деацетилирование приводит к полной инактивации генов. Ацетилирование/деацетилирование может быть прямо связано с отдельными стадиями транскрипции генов через взаимодействие с комплексами, ремоделирующими хроматин. Совместное функционирование деацетилаз (HDAC) и ацетилаз (HAT) гистонов сопровождается динамическими переходами хроматина из одной структуры в другую и приводит к переключению активных и неактивных состояний.



Метилирование гистонов, опосредованное метилированием ДНК



Метилирование ДНК, опосредованное метилированием гистонов

Модификатор	Функция	Мутантный фенотип у мышей
Модификация гистонов		
Ehmt1	Гистоно́вая метилтрансфера́за	Отставание в развитии, летальность на сроке E9,5, снижение H3K9me1 и H3K9me2 в эмбрионах.
Ehmt2	Гистоно́вая метилтрансфера́за	Потеря метилирования H3K4 в эухроматине, остановка роста и развития на сроке E8,5
Eset	Гистоно́вая метилтрансфера́за	Пери-имплантационная летальность (E3,5-E5,5)
Suv39h	Гистоно́вая метилтрансфера́за	Потеря метилирования H3K9 в гетерохроматине, нарушение спаривания хромосом во время сперматогенеза, летальность на сроке E14,5
Ezh2	Гистоно́вая метилтрансфера́за	Патология роста примитивной эктодермы, пери-имплантационная летальность
Mll	Гистоно́вая метилтрансфера́за	Аномалии скелета, потеря метилирования H3K4me1, аномальное метилирование ДНК, морфогенетические аномалии, эмбриональная летальность
Gcn5	Гистоно́вая ацетилтрансфера́за	Летальность на сроке E7,5-E8,5
HDAC1	Гистоно́вая деацетилтрансфера́за	Дефекты пролиферации, отставание в развитии, эмбриолетальность на сроке E10,5

ВИДЫ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК

Вид нкРНК	Англоязычное название	Число генов в геноме человека	Примеры	Длина (нукл.)	Год открытия
Все гены: 58 288					
Транспортные РНК (тРНК)	Transfer RNA, tRNA	387 = 0,7%	tRNAPhe, tRNAala...	76–90	1965
Рибосомные РНК (рРНК)	Ribosomal RNA, rRNA	544 = 0,9%	28S, 5.8S, 18S, 5S	200–5000	1980
Малые ядерные РНК (мяРНК)	Small nuclear RNA, snRNA	1 900 = 3,3%	U1, U6, U12...	100–150	1966
Малые ядрышковые РНК (мякРНК)	Small nucleolar RNA, snoRNA	943 = 1,6%	SNORD13, SNORD22, SNORD118...	70–120	1996
Длинные некодирующие РНК (днРНК)	Long non-coding RNA, lncRNA	15 778 = 27,1%	XIST, ANRIL, HOTAIR, H19, TUG1	200–15 000	≈1990
Малые некодирующие РНК: 9 534 = 15,8%					
МикроРНК	MicroRNA, miRNA, miR	1881 = 3,2%	miR-21, miR-143/145	19–25	1993
Короткиеинтерферирующие РНК (киРНК)	Small interfering RNA, siRNA	Не имеют собственных генов!	киРНК вирусного происхождения	21–25	1998

Таблица составлена по источникам [1, 3, 5, 6].

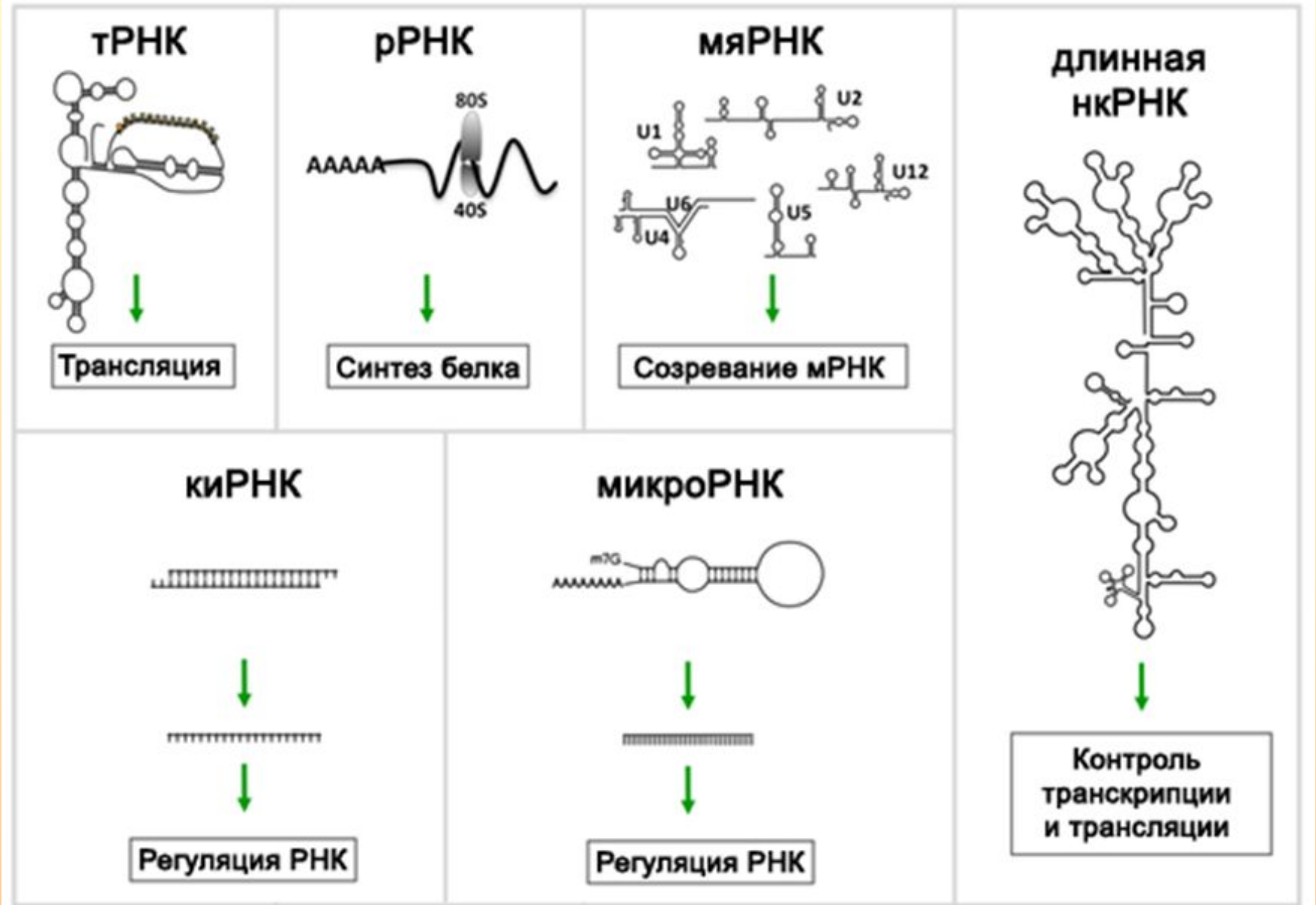
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ НЕКОДИРУЮЩИХ БЕЛОК РНК

Выявлен и охарактеризован целый ряд функциональных классов некодирующей РНК:

- рибосомальная (r),
- транспортная (t),
- малая ядерная (sn),
- малая ядрышковая (sno),
- микро (mi), малая интерферирующая (si),
- Рiwi-взаимодействующая (pi),
- длинные некодирующие транскрипты (lncРНК) и др.

Некоторые функции некодирующих РНК уже определены: активация транскрипции, инактивация генов, импринтинг, компенсация дозы генов, мозаичный эффект положения, альтернативный сплайсинг, инактивация трансляции, модулирование функции белков и, видимо, многое другое.

ВИДЫ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК



МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ БЕЛОК РНК

snРНК – малые ядерные РНК (или сплайсосомная РНК) являются ключевой составляющей процесса сплайсинга (14 различных вариантов, выполняющих свои функции).

snoРНК – малые ядрышковые РНК участвуют в метилировании и псевдоуридилровании rРНК, tРНК, snРНК, дифференциально экспрессируются в мозге.

scaРНК (small Cajal body-specific RNAs) – малые РНК, обнаруженные в тельцах Кахала, участвуют в процессинге теломеразной РНК.

piРНК – PIWI-взаимодействующая РНК (26-30 н.) эпигенетически и пост-транскрипционно инактивирует транспозоны преимущественно в половых клетках, экспрессируются в мозге.

tiРНК – РНК, ассоциированные с сайтами инициации транскрипции (17-18 н.), участвуют в распределении нуклеосом и/или организации хроматина?

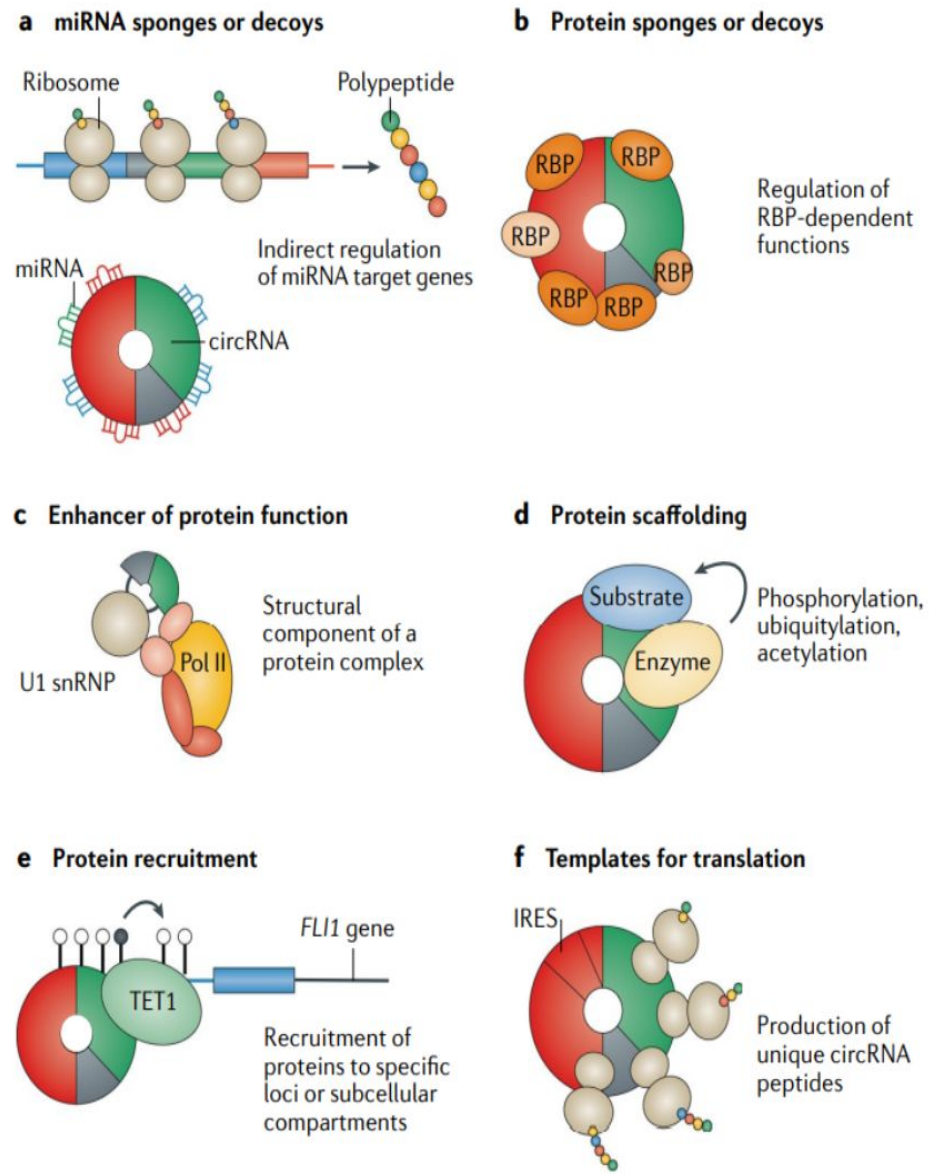
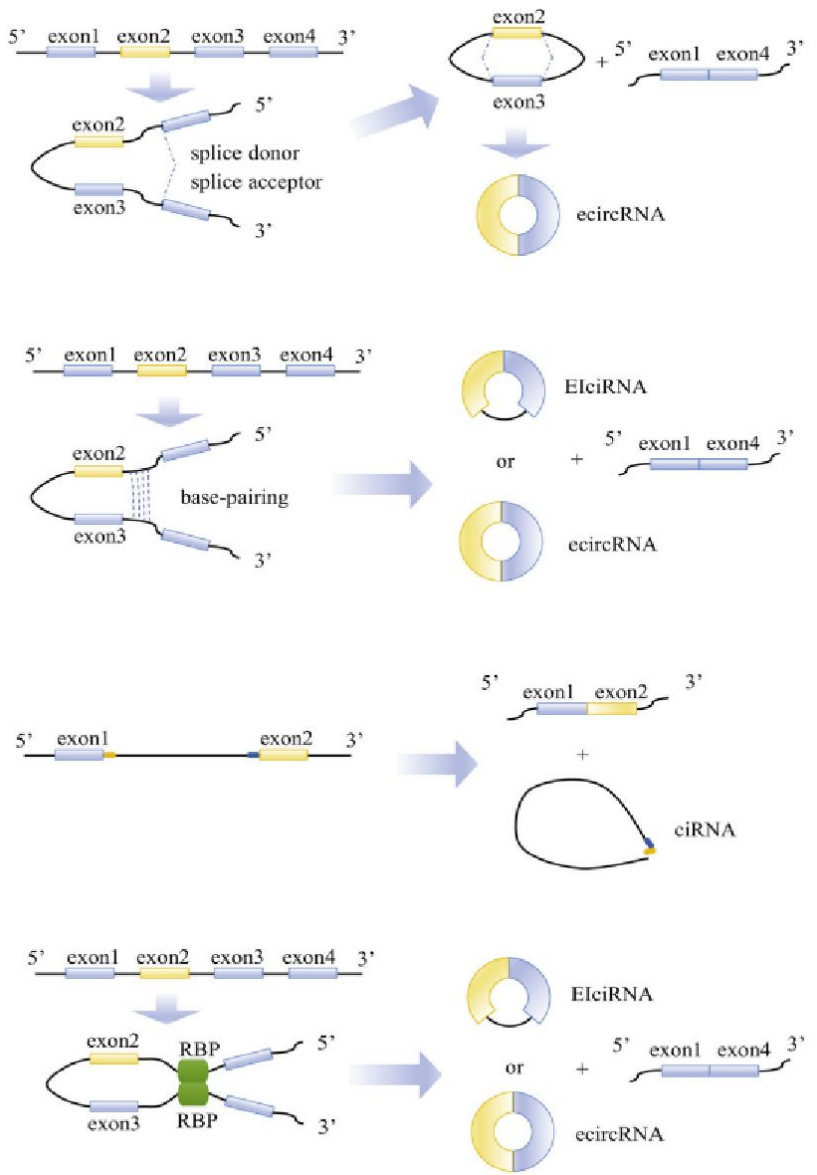
spliРНК – РНК, ассоциированная с сайтами сплайсинга (17-18 н.), участвуют в распределении нуклеосом и/или организации хроматина?

PASRs – малые РНК, ассоциированные с промоторами. РНК-опосредованная инактивация/активация транскрипции?

TSSa – малые РНК, ассоциированные с сайтом старта транскрипции. РНК-опосредованная инактивация/активация транскрипции?

PROMPTS – (promoter upstream transcripts) пред-промоторные транскрипты. РНК-опосредованная инактивация/активация транскрипции?

Кольцевые РНК, 3' -> 5' транскрипция! Генез и функции



днРНК (>200 н.). Интронные, межгенные, антисмысловые, не имеют длинной открытой рамки считывания (>200 кодонов) и поли А-хвоста.

Имеют большую клеточную специфичность, чем белки. Могут альтернативно сплайсироваться, а некоторые изоформы могут кодировать белки. В геноме человека описано 58648 генов днРНК (2019 г.).

днРНК действуют как на уровне транскрипции, так и посттранскрипционно. На уровне транскрипции днРНК рекрутируют факторы транскрипции или эпигенетические модификационные комплексы, действуя при этом *in cis* или *in trans*, в зависимости от расположения относительно сайта транскрипции генов-мишеней.

днРНК могут функционировать, как молекулярные каркасы, объединяющие белки в комплексы и иницирующие разные биологические процессы; как проводники, направляющие белки к местам их функционирования; или как ловушки, связывающие белки и препятствующие их присоединению к генам-мишеням. В случае образования хроматином петель днРНК могут действовать как транскрипционные энхансеры.

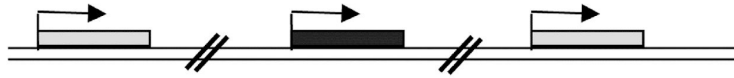
Посттранскрипционно днРНК могут регулировать трансляцию мРНК, а также модулировать альтернативный сплайсинг и деградацию мРНК.

днРНК часто служат предшественниками коротких нкРНК, таких как микроРНК и piwiРНК.

днРНК может служить так называемой губкой для микроРНК, если содержит комплементарные им последовательности, что позволяет связывать микроРНК, препятствуя взаимодействию с геном-мишенью.

Классификация днРНК

а Межгенные днРНК



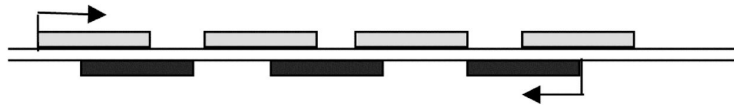
 Белоккодирующие гены

 Гены днРНК

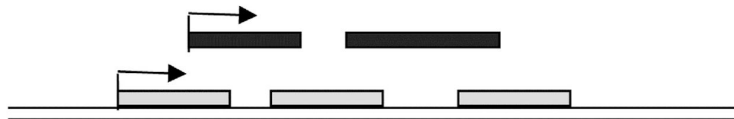
б Интронные днРНК



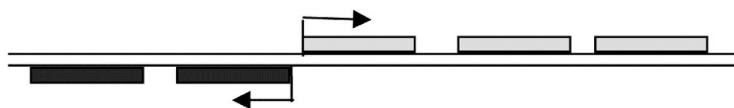
в Антисмысловые днРНК



г Перекрывающиеся смысловые днРНК

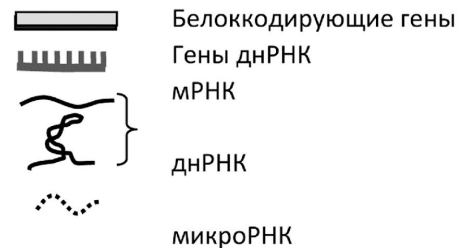
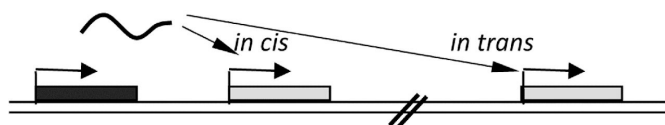


д Двухнаправленные днРНК

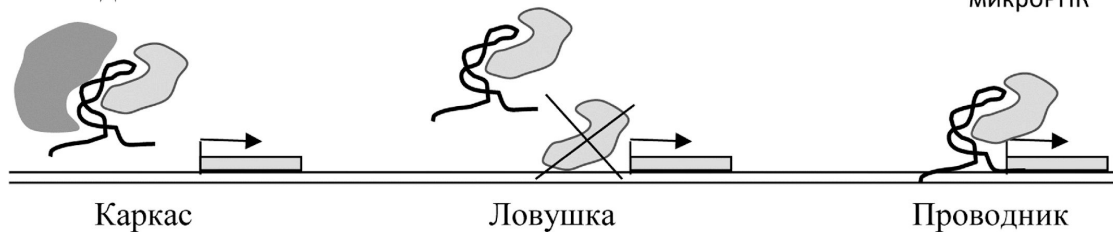


Механизмы и функции днРНК

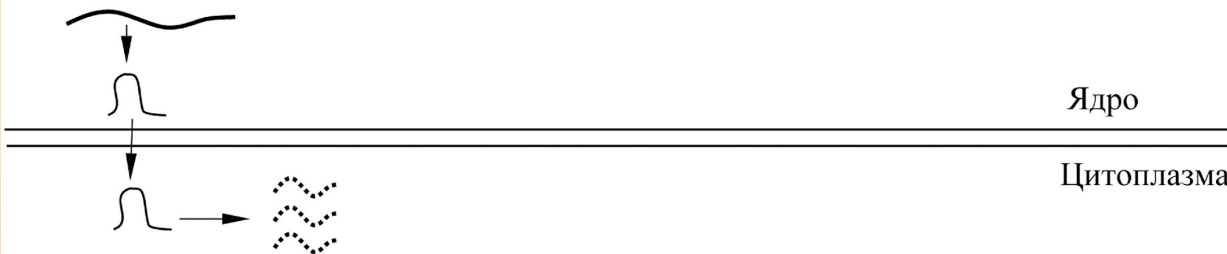
1 Регуляция транскрипции



2 Взаимодействие с белками



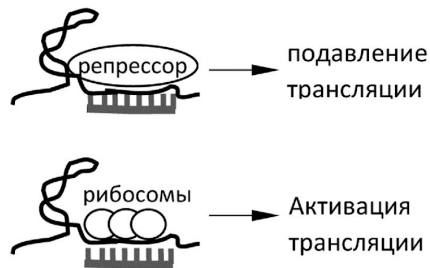
3 Предшественники микроРНК



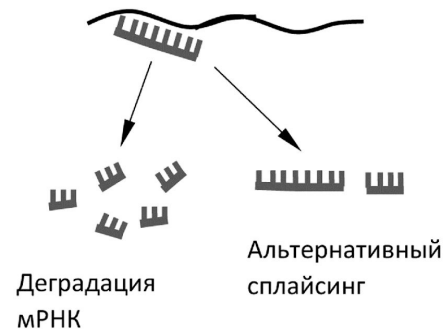
4 Губка для микроРНК



5 Регуляция трансляции



6 Гибридизация с мРНК



НЕКОДИРУЮЩИЕ БЕЛОК РНК

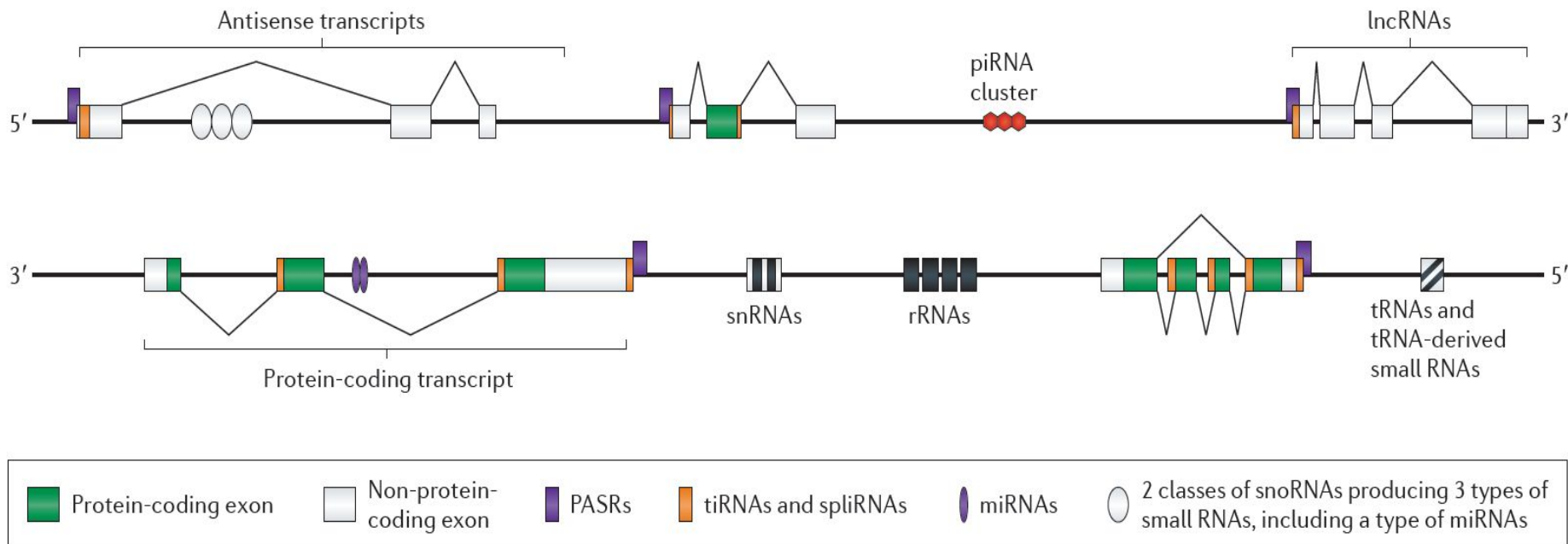


Figure 2 | **Complex expression of the genome and examples of non-coding RNA expression.** The mammalian transcriptional landscape is represented graphically with genes expressing ribosomal RNAs, tRNAs, small nuclear RNAs (snRNAs), small nucleolar RNAs (snoRNAs), various protein-coding and non-coding genes (which encode mRNAs and long non-coding

RNAs (lncRNAs), respectively), as well as genes expressing small regulatory RNAs such as microRNAs (miRNAs), PIWI-interacting RNAs (piRNAs), promoter-associated short RNAs (PASRs), transcription initiation RNAs (tiRNAs) and splice site RNAs (spliRNAs), snoRNA-derived small RNAs and tRNA-derived small RNAs. The transcriptional units are not depicted to scale.

Некодирующие РНК

Длинные РНК



Промежуточные РНК



Малые РНК



ХАРАКТЕРНЫЕ ПРИЗНАКИ miРНК И siРНК.

Величина - 19-25 н.

miРНК образуются из коротких (70-100 н.) шпилечных структур эндогенного происхождения. Высоко консервативны.

siРНК образуются из длинных двухцепочечных или шпилечных структур экзогенного и эндогенного происхождения.

Основная функция miРНК - репрессия трансляции, а siРНК еще и инактивирует ген-мишень.

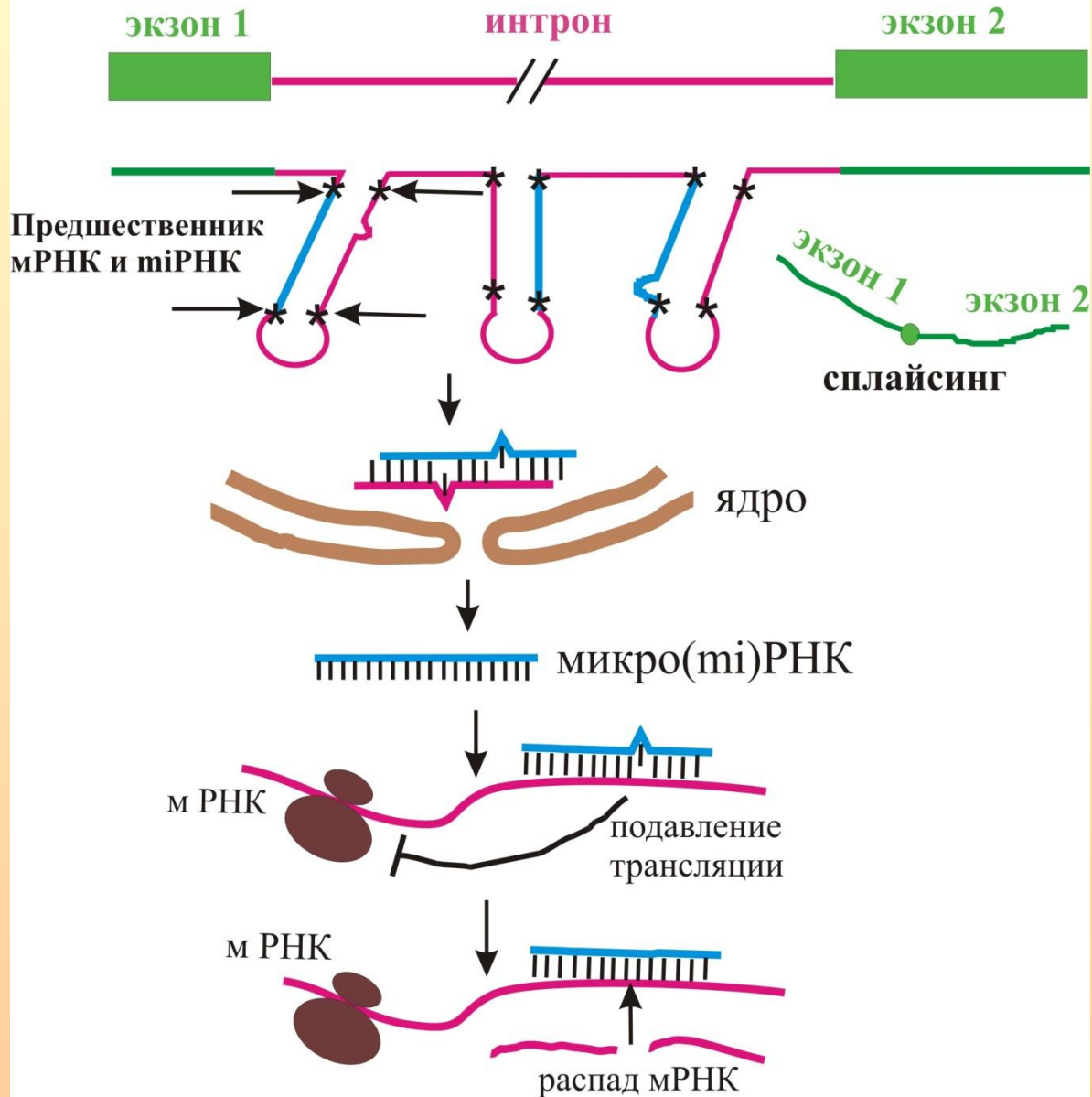
miРНК вовлечены в процессы развития, а основная роль siРНК - антивирусная защита и инактивация транспозонов.

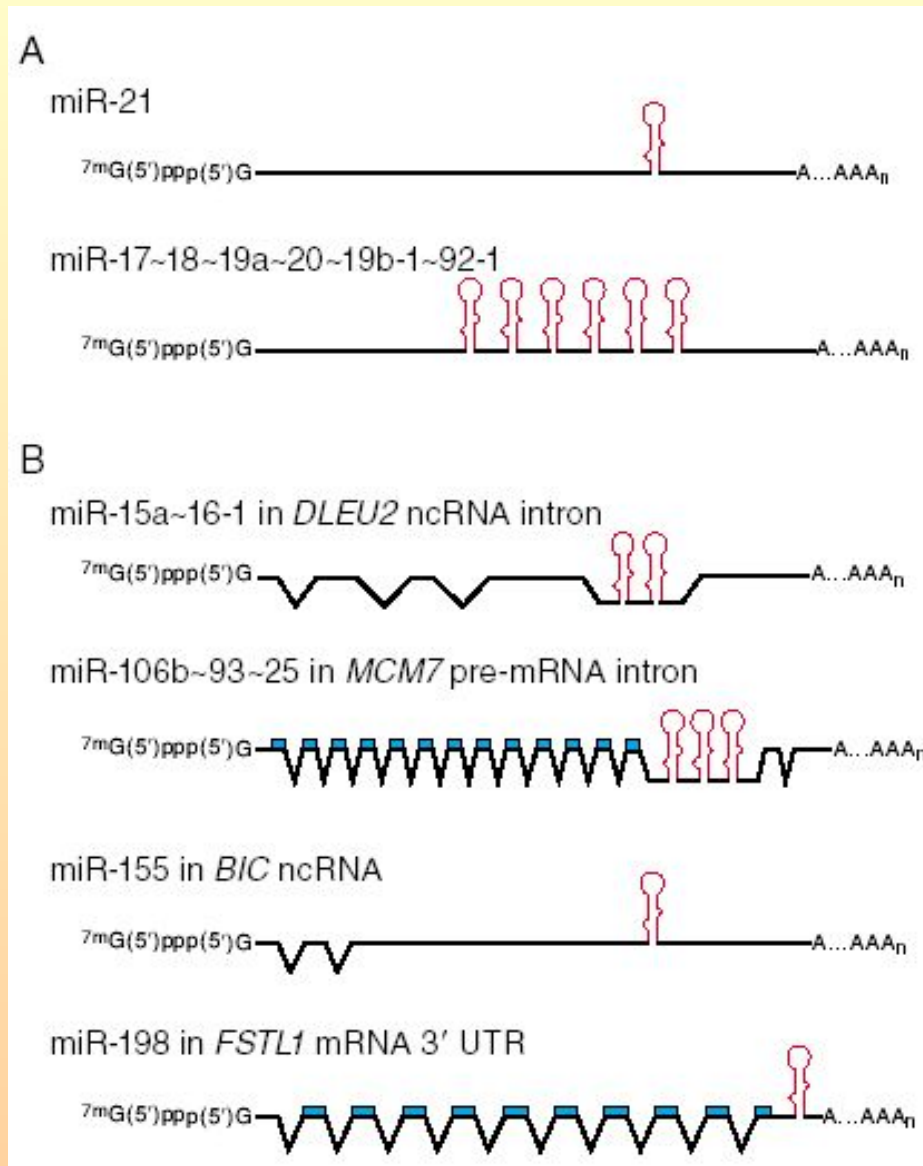
В биогенезе miРНК и siРНК задействованы одинаковые ферментативные системы.

Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции и на уровне хроматина.

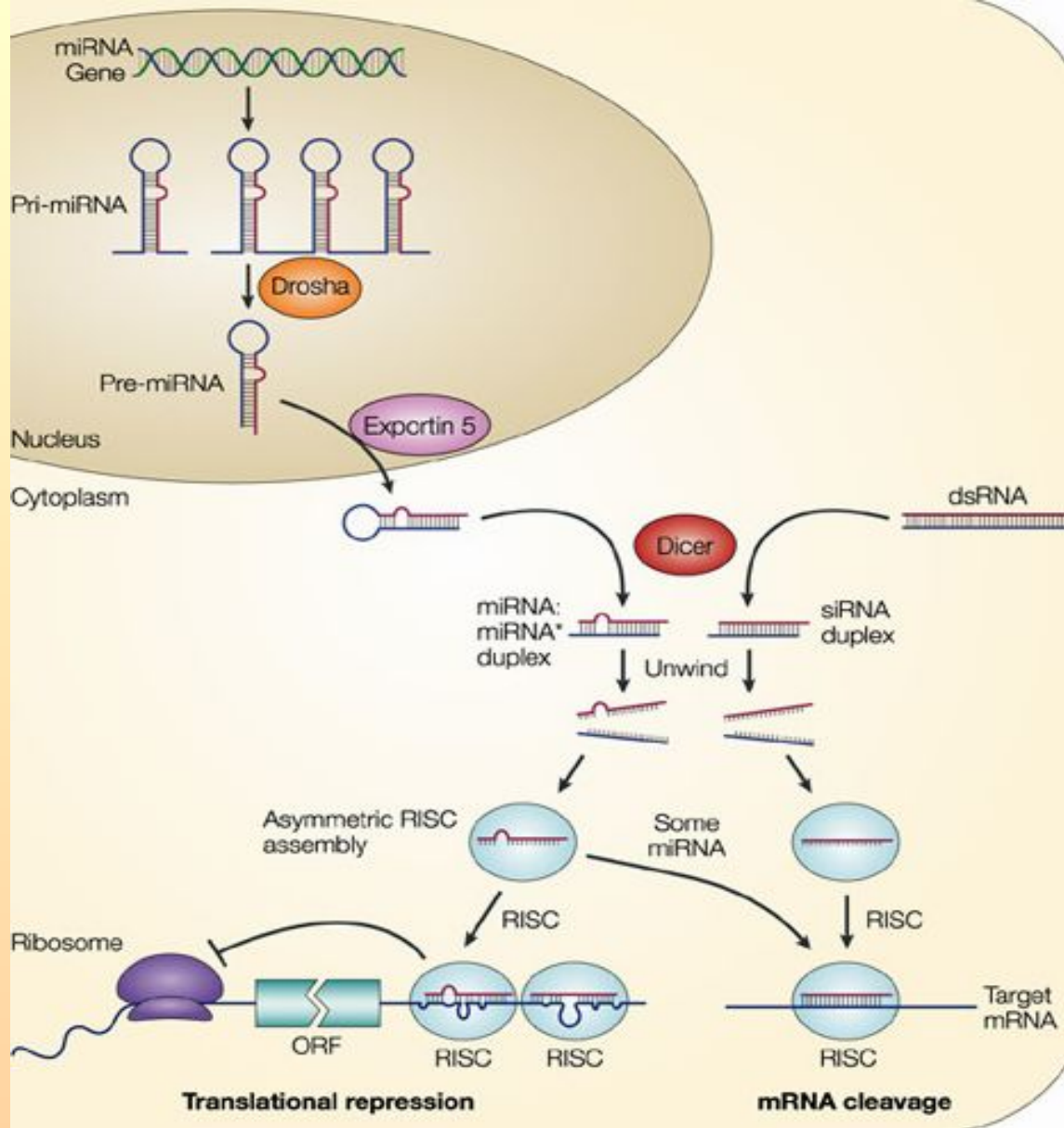
Около 1-4% генома кодирует miРНК, в свою очередь, эти РНК регулируют трансляцию не менее 30% мРНК.

Гены микроРНК



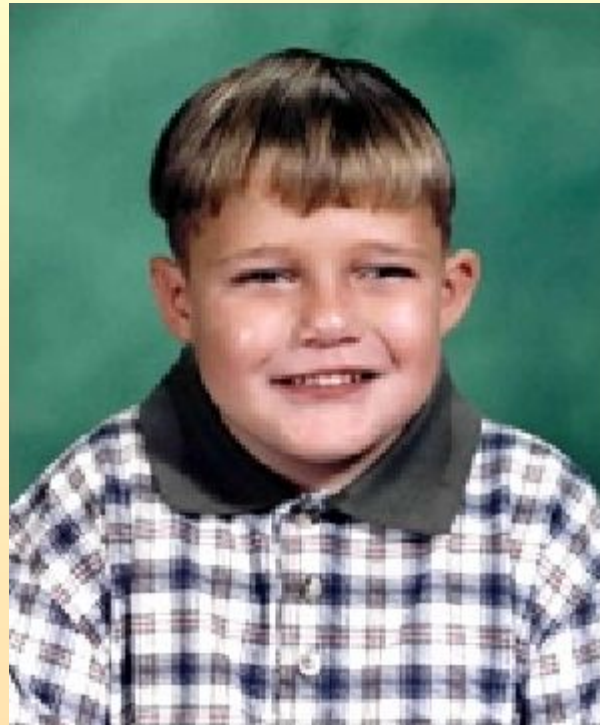


Около 40% miR человека кластерировано и экспрессируется совместно



miРНК в составе RISC інгібують трансляцію в результаті: 1) інтерференції с факторами ініціації трансляції; 2) порушення функції полі-А; 3) формування стабільного комплексу с полірибосомами.

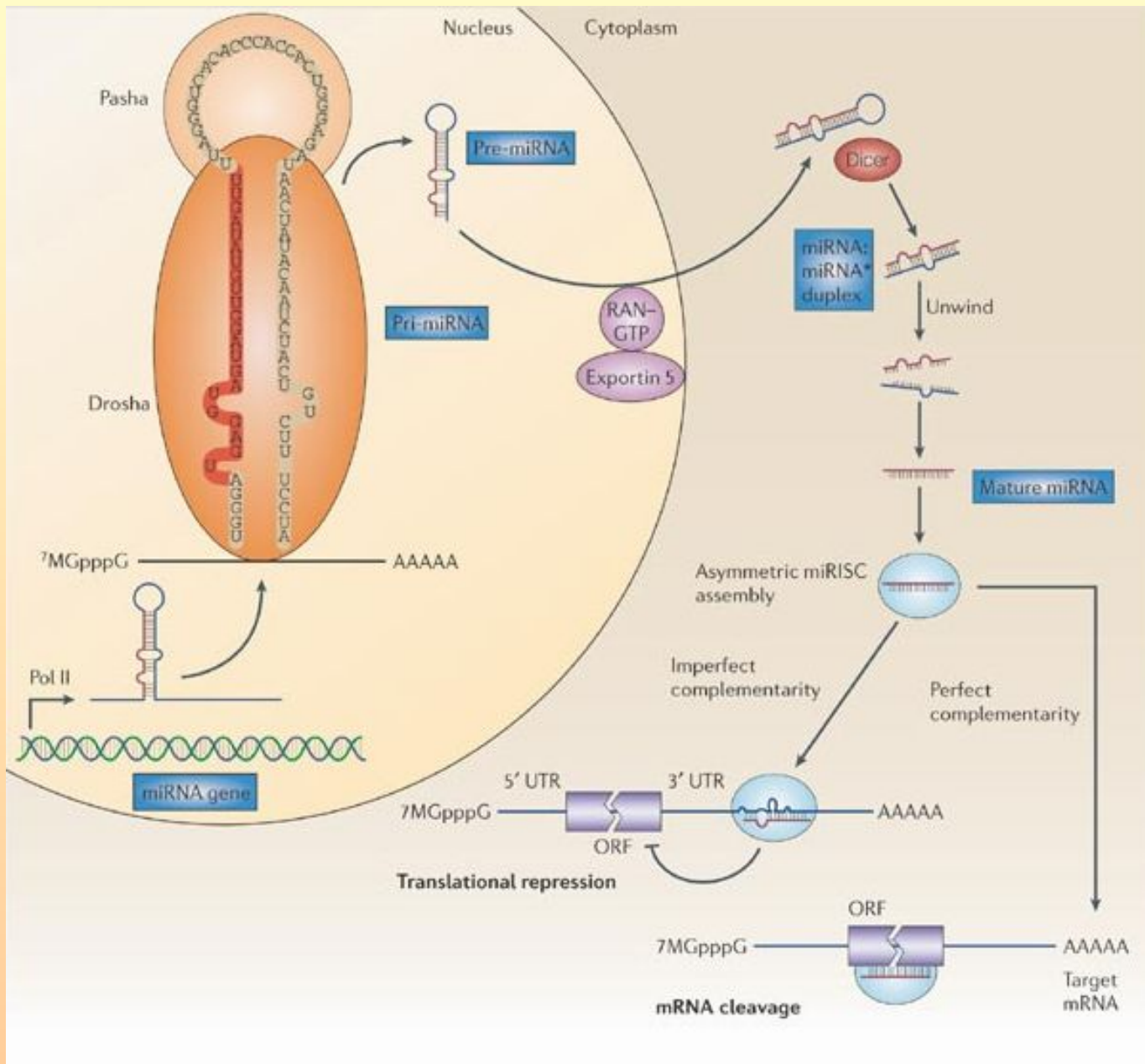
РНКаза III, называемая Drosha расщепляет шпильки РНК, содержащие большие (≥ 10 нуклеотидов) концевые петли и вырезает предшественники длиной 65–75 нуклеотидов, называемые пре-миРНК. Drosha обнаружена в ядре в составе двух комплексов. Большой включает РНК-хеликазы, белки, связывающие двунитевую РНК, гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды и белки семейства саркомы Юинга. Меньший состоит из Drosha и белка, связывающего двунитевую РНК — DGCR8, называемого Pasha и являющегося продуктом гена, делеция которого приводит к синдрому ДиДжорджи.



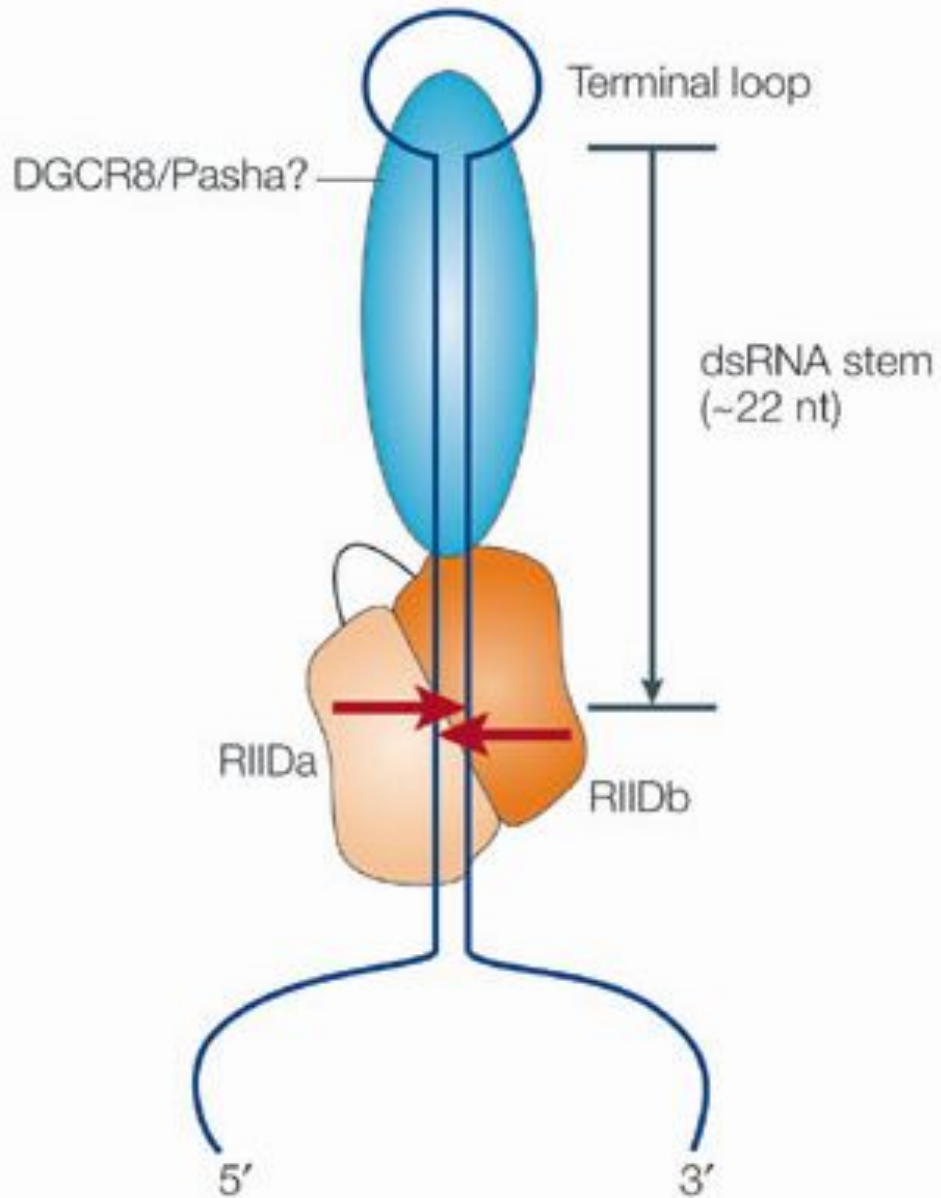
Синдром ДиДжорджи

Мутации/делеции
DGCR8 - белка,
связывающего dsРНК
в комплексе с
РНКазаШ (Drosha)



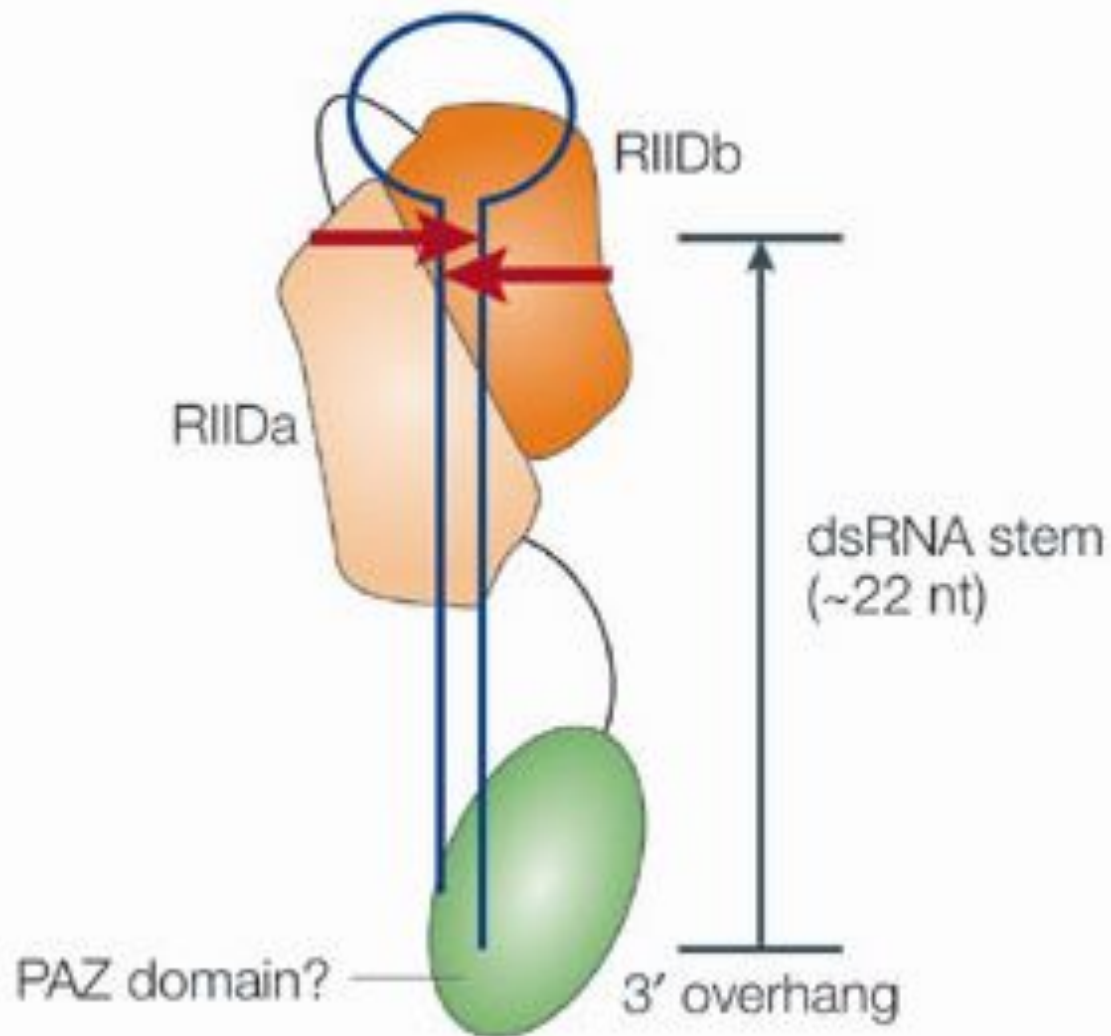


Pri-miRNA processing by Drosha

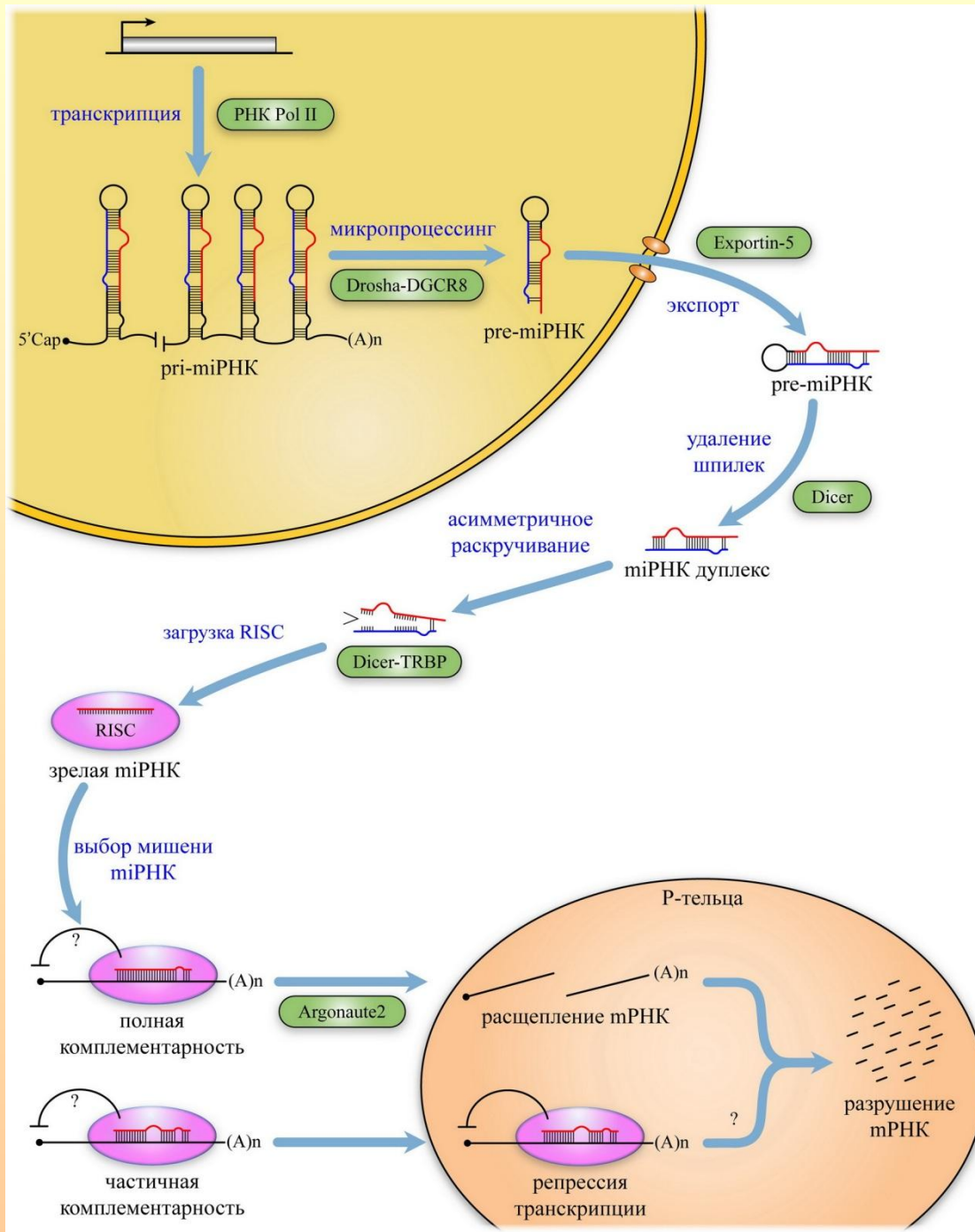


Цитоплазматическая РНКаза III — Dicer осуществляет дальнейший процессинг. После расщепления нуклеазой Dicer короткие дуплексы РНК встраиваются в рибонуклеопротеиновый комплекс RISC. Выбор одной из цепей определяется стабильностью разных концов дуплекса: предпочтение отдается той цепи, 5'-конец которой, конъюгирован менее прочно. В комплекс RISC входит один из белков семейства Argonaute. Эндонуклеазная активность внутри комплекса RISC опосредована РНКаза-Н-подобным доменом (piwi) Argonaute. Мутации Argonaute нарушают самые разнообразные процессы развития, такие, как созревание половых клеток, пути дифференцировки стволовых клеток, а также участвуют в развитии рака и аномалий развития у человека. Белковый продукт гена *FMR1* - FMRP так же ассоциирован с комплексом RISC и Dicer.

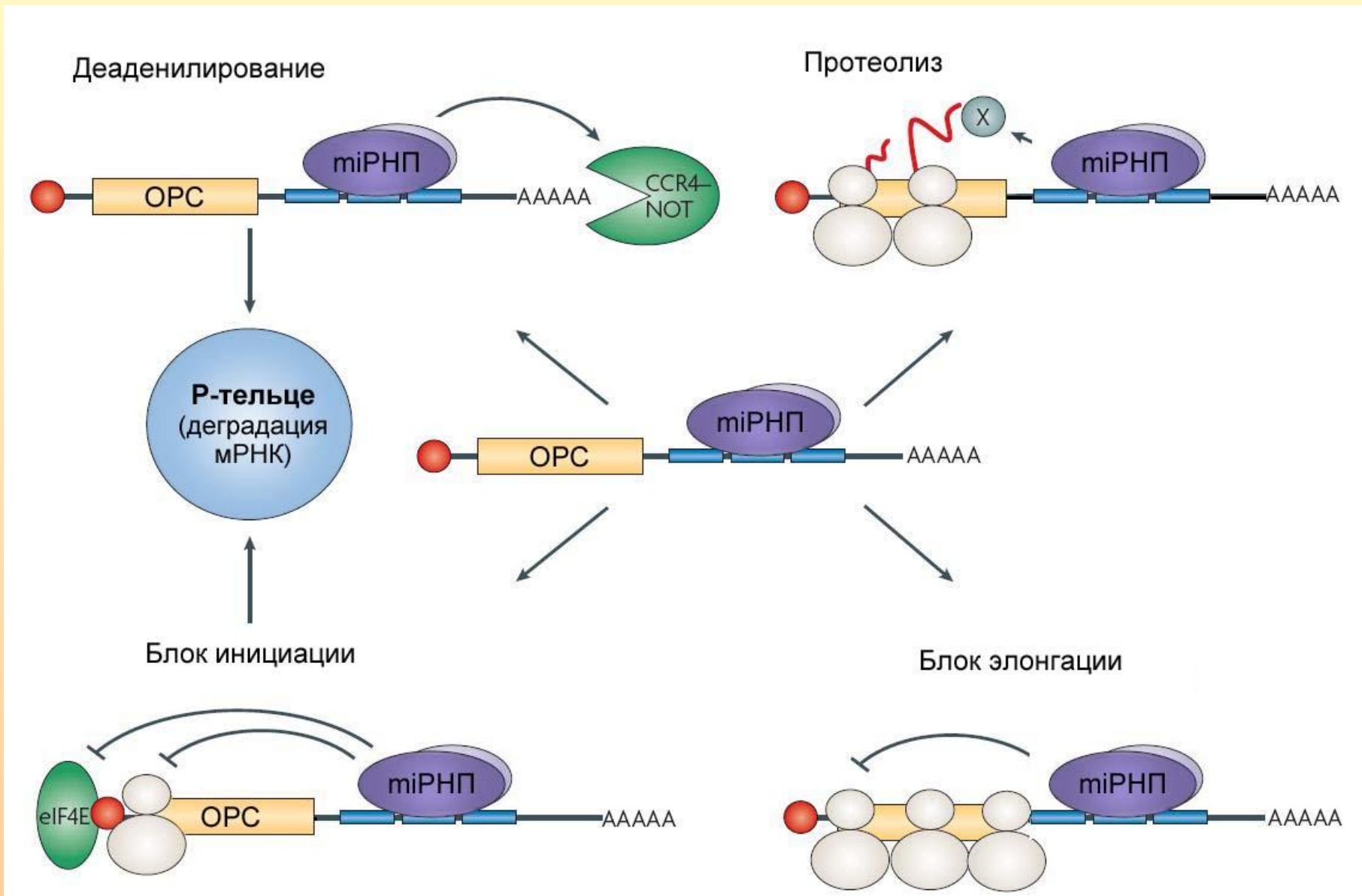
Pre-miRNA processing by Dicer



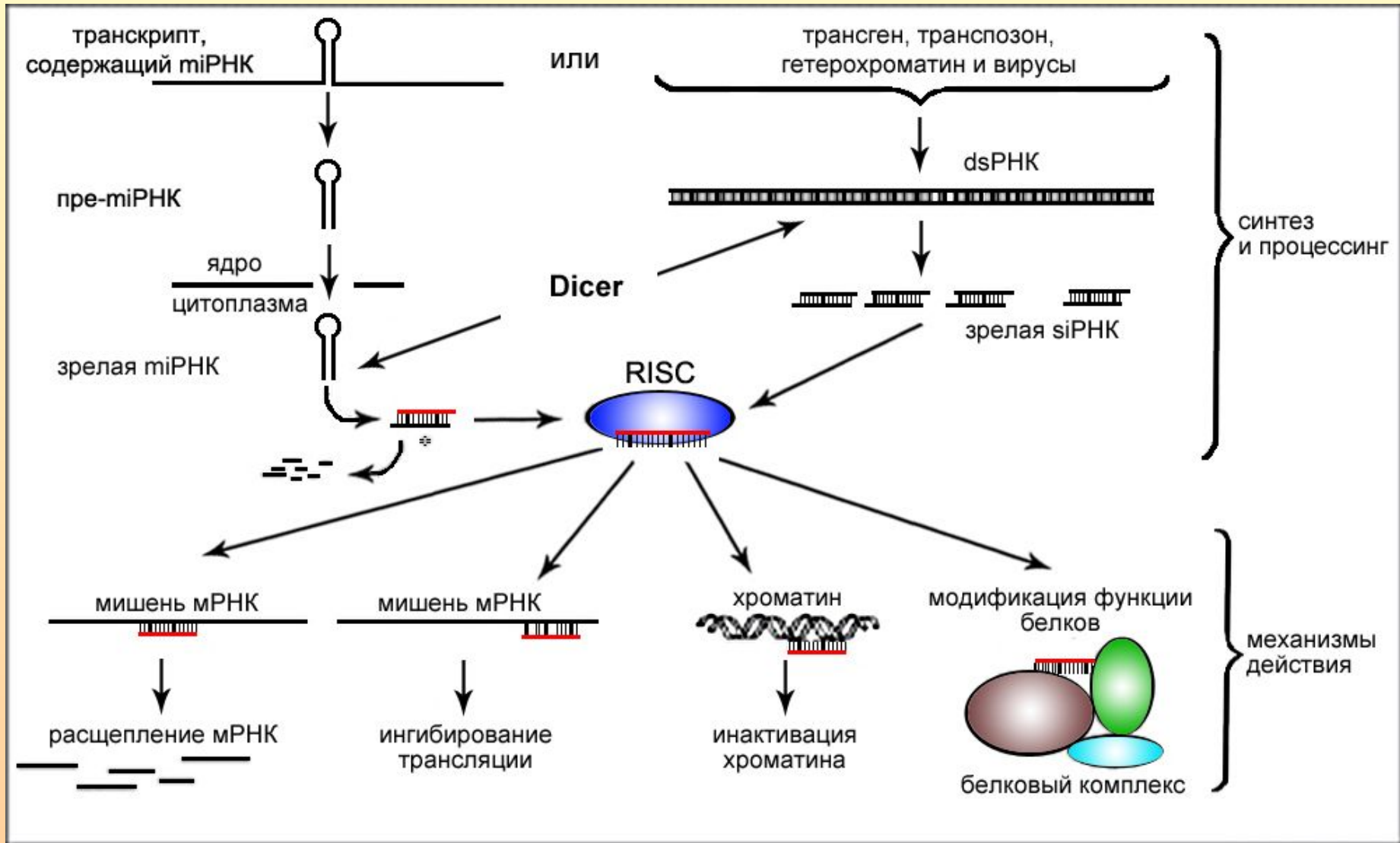
Образованный дуплекс miРНК раскручивается с помощью хеликаз, одна из его цепей входит в состав РНК-зависимого комплекса репрессии (RISC), включающего в качестве основного компонента эндонуклеазу семейства Argonaute (Ago2) и связывающий белок (TRBP), а комплементарная цепь (микроРНК*), как правило, деградирует. Тем не менее, в случае некоторых микроРНК обе цепи объединяются с комплексом RISC и в таком случае их обозначают как “5p” и “3p” в зависимости от того, с какого конца шпильки они транскрибировались. Комплекс RISC, содержащий функциональную цепь микроРНК, связывается с 3'-нетранслируемым районом (3'-НТР) гомологичной матричной РНК (мРНК) гена-мишени. Результат зависит от степени комплементарности между участком 2-8 нуклеотидов на 5'-конце микроРНК и 3'-НТР матричной РНК. Полная комплементарность приводит к деградации мРНК посредством РНК-интерференции, наличие 2–3 неспаренных нуклеотидов – к репрессии ее трансляции.

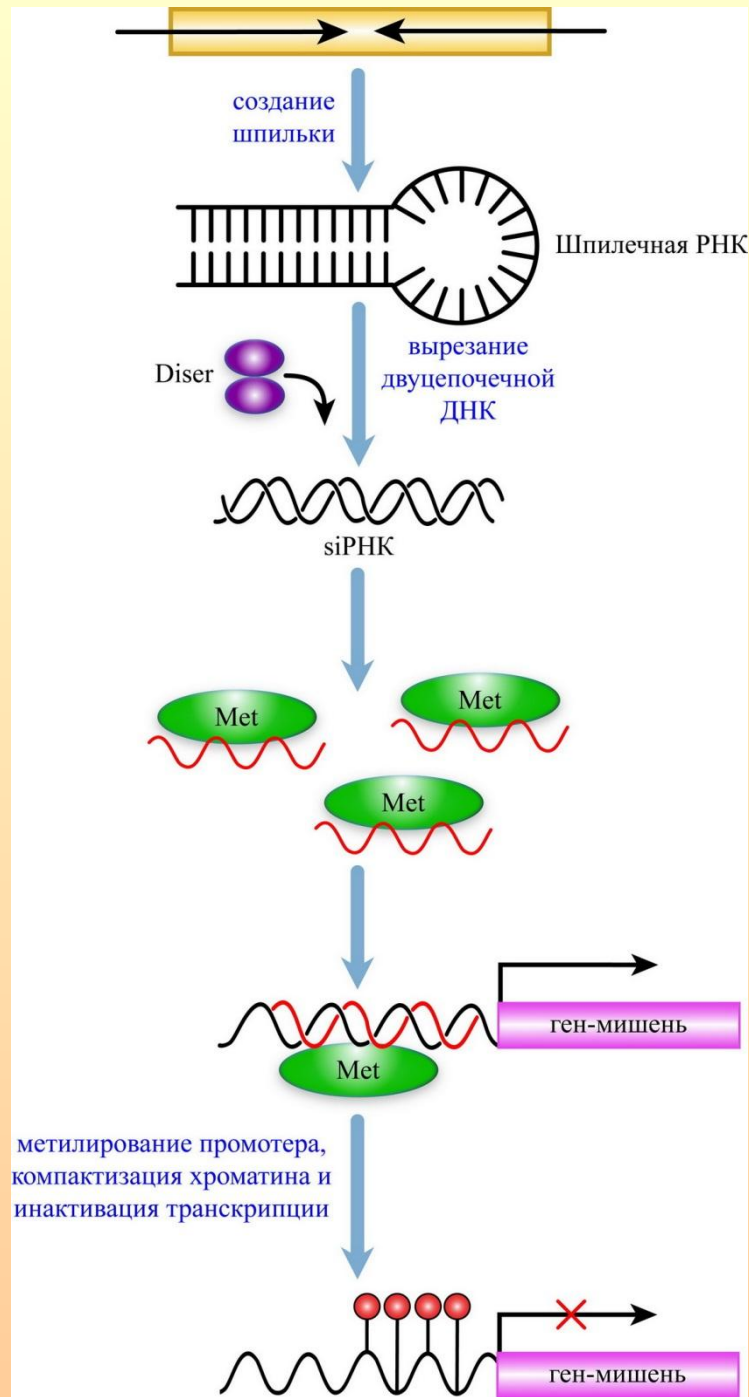


Возможные механизмы инактивации трансляции с использованием miРНП комплексов

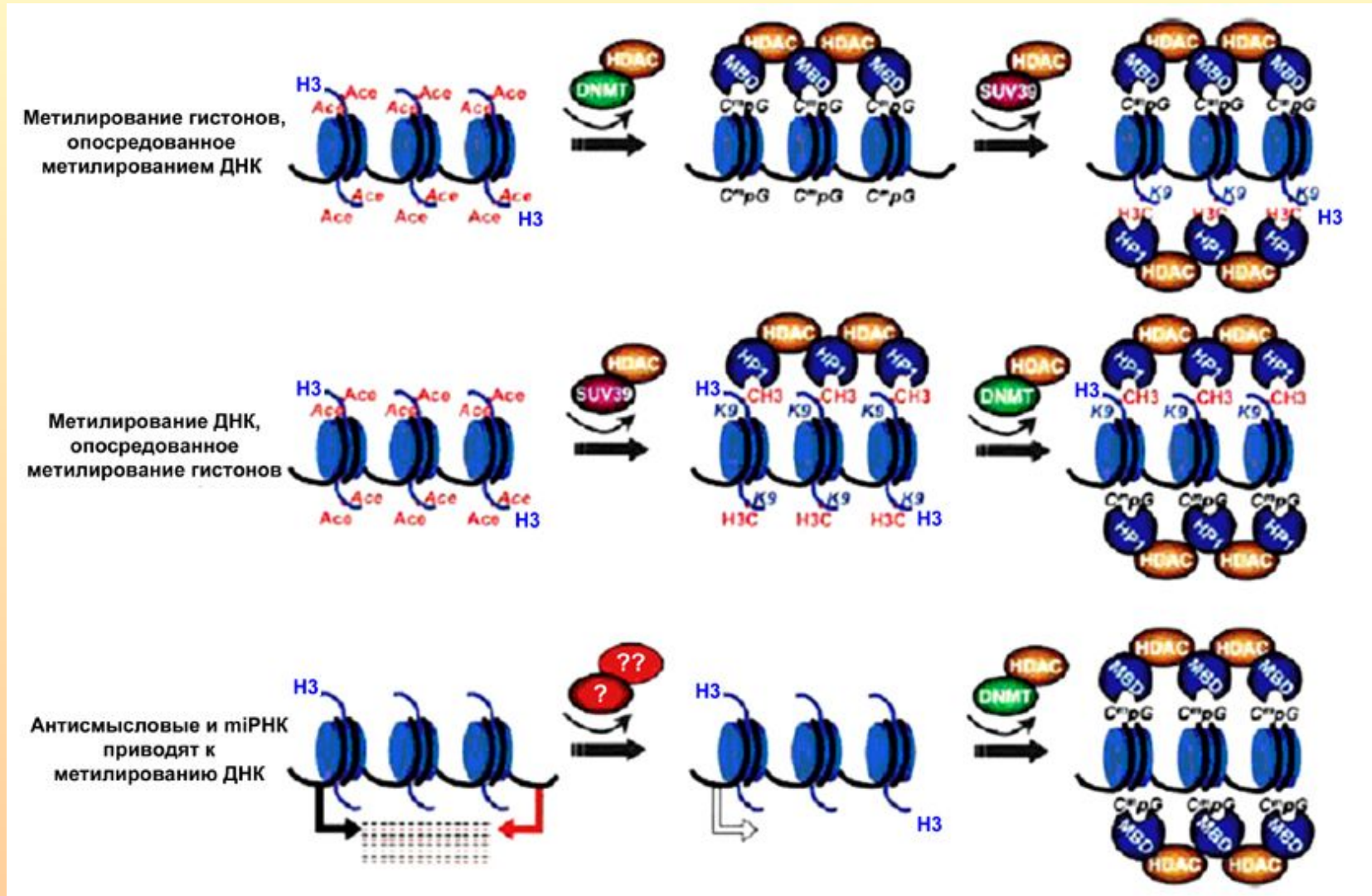


Механизмы действия miРНК и siРНК





Интегральная схема эпигенетической инактивации экспрессии гена



miРНК и siРНК - инструмент избирательного временного подавления экспрессии гена. Потенциальная терапия социально значимых заболеваний (инфекционных, онкологических, генетических и др.)

Около 2000 miРНК человека охарактеризовано. Еще порядка 2500 являются кандидатами на роль miРНК. С помощью биоинформатики предсказано не менее 5000 miРНК у человека.

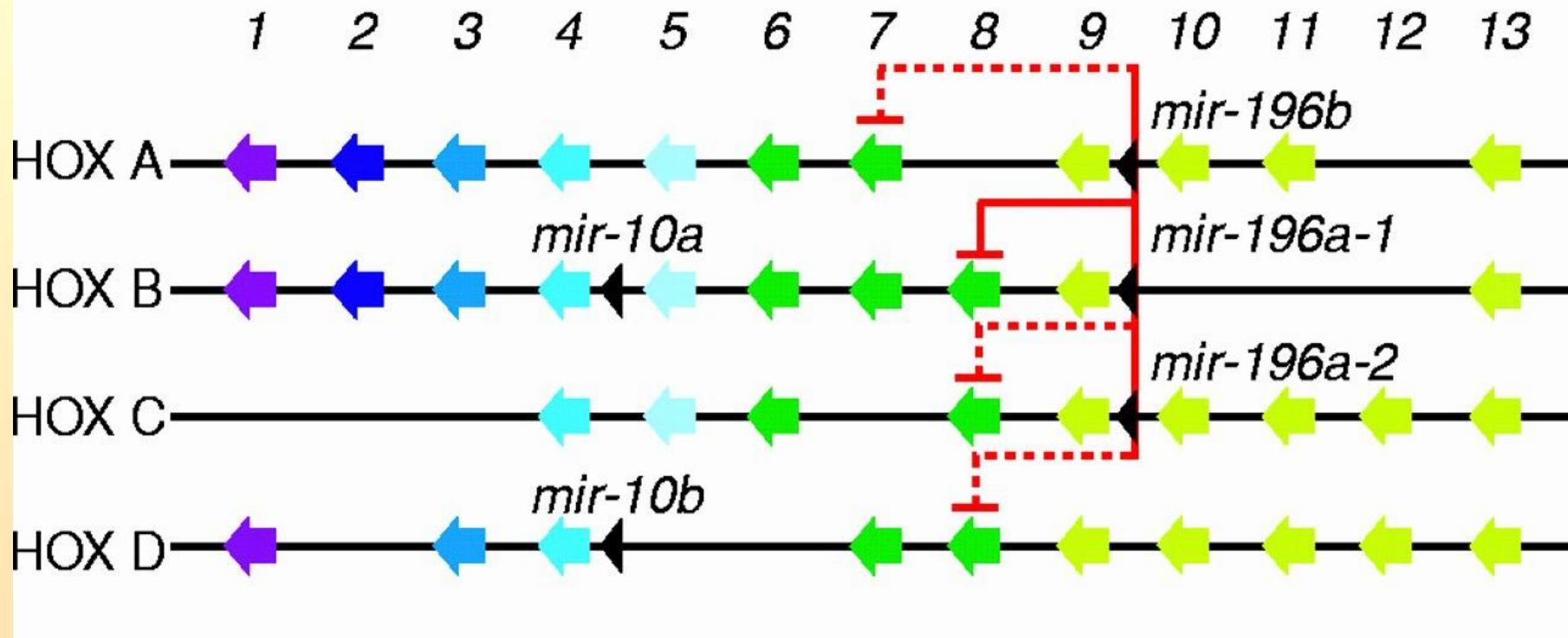
От 10 до 30% всех генов белков регулируется miРНК.

Каждая РНК может регулировать до 200 генов. Многие гены имеют сайты связывания для нескольких разных miR

miРНК участвуют в процессах развития

miРНК активно участвуют в эмбриональном развитии. В процессе **формирования конечностей** участвуют miРНК *lin-41*, *let-7* и *miR-196*; в **адипогенезе** принимает участие *miR-143*; в **миогенезе** – *miR-1-1*, *miR-1-2* и *miR-181*; в **гематопоезе** – *miR-181*, *miR-142s* и *miR-223*; в **нейрогенезе** – *miR-9*, *miR-142a*, *miR-124b*, *miR-135*, *miR-153*, *miR-183*, *miR-219*, *miR-125a*, *miR-125b*, *miR-128*, *miR-132*, *miR-137* и *miR-139*.

Mammals



миРНК обнаружены в Нох-кластерах. В *miR-196* выявлена протяженная консервативная последовательность,

комплементарная *НохА7*, *НохВ8*, *НохС8* и *НохD8*. Показано, что она осуществляет отрицательную регуляцию *НохВ8* и других *Нох*-генов. Это свидетельствует о наличии механизма РНКи для посттранскрипционного ограничения экспрессии *Нох*-генов в ходе развития позвоночных. *miR-10*, возможно, выполняет такую же функцию.

Эктопическая гиперэкспрессия *miR-181* у мыши в гемопоэтических стволовых клетках/клетках-предшественниках увеличивает процент клеток В-лимфоцитарной линии как *in vitro*, так и *in vivo*.

Снижение уровня *miR-143*, одна из мишеней которой — мРНК MAP-киназы *BMK1/ERK5*, приводит к угнетению дифференцировки адипоцитов в культуре.

***miR-1* и *miR-133* кластерированы, транскрибируются совместно, но выполняют разные функции в процессе развития мышечной ткани. *miR-1* запускает миогенез путем инактивации *HDAC4* – транскрипционный репрессор генов в мышечной ткани. *miR-133* усиливает пролиферацию миобластов инактивируя ген *SFR*.**

Тиксельская порода овец (Бельгия) знаменита своей мясистостью. Причиной этого признака является полиморфный вариант +6723G - A в 3' НТР гена миостатина *GDF8*. Эта замена создает сайт связывания для *miR-1* и *miR-206*, высоко экспрессирующихся в скелетных мышцах. В результате происходит инактивация трансляции гена.



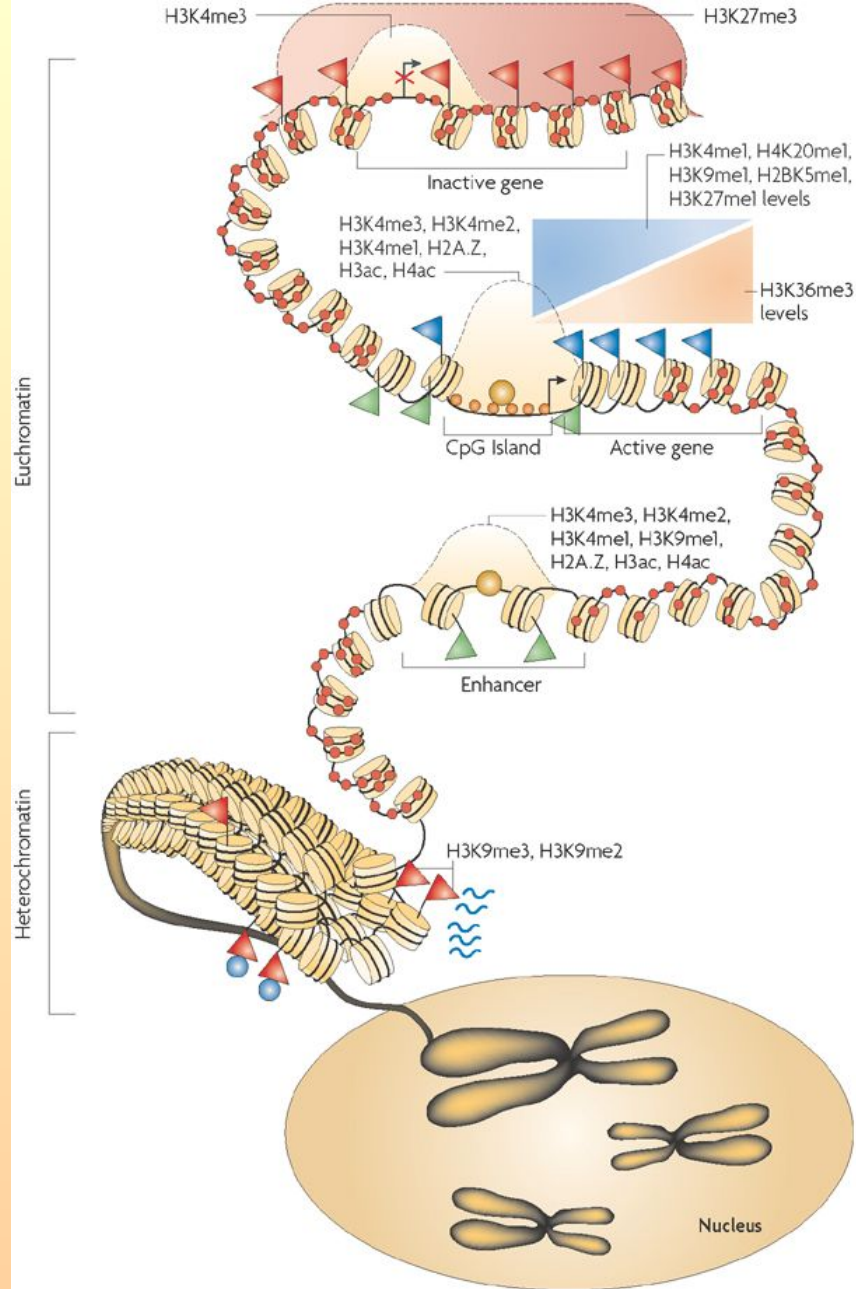
Возможное использование miРНК и siРНК

Практическое:

- могут являться маркерами какого-либо патологического процесса (злокачественного, неврологического, аутоиммунного и др.);
- могут быть использованы в терапии широко распространенных и социально-значимых заболеваний (инфекционных, онкологических, нейропсихических, эндокринных и др.);
- синтетические олигонуклеотиды могут быть использованы для инактивации малых РНК, участвующих в патологических процессах.

Фундаментальное:

- с использованием синтетических miРНК и siРНК можно исследовать функции генов, некодирующих транскриптов, малых РНК и их регуляторные взаимосвязи.



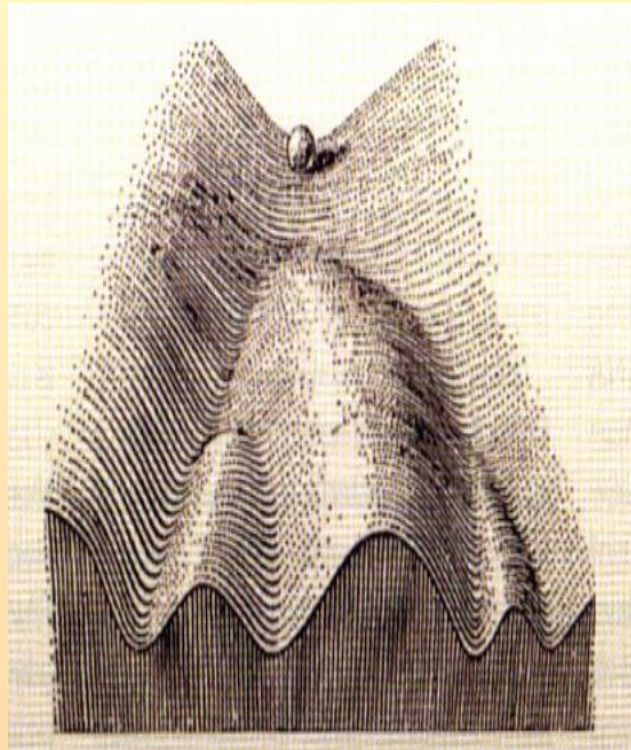
Euchromatin

Heterochromatin

	Transcribed		Active		Repressive		DNA-binding proteins
	DNA methylation		Small RNAs		HP1		

Развитие как эпигенетический процесс:

генотип+эпигенотип+внешняя среда = определенный фенотип



«эпигенетический фон лежит в основе развивающегося организма и представляет собой весь комплекс взаимодействий между ДНК, белками, внешними и внутренними стимулами»

Сегодня все это больше похоже на многоуровневую 3D «стрелялку». Возможны ли 4D и 5D?

- Если вы хотите использовать термин «эпигенетика» для описания клеточной памяти, поддержания гомеостаза при отсутствии внешних воздействий или влияния на клеточную судьбу, не связанных с изменениями последовательности ДНК, то это будет вполне соответствовать Уоддингтону.

- Если вы хотите описать более высокий уровень информации, который существует над геномом и регулирует экспрессию/инактивацию генов в соответствующие время и месте, то для этого есть термин - «регуляция транскрипции».

- Если вы обнаружили разницу в метилировании ДНК при сравнении двух образцов, но не учитываете дополнительные факторы, такие как пропорции различных подтипов клеток, полиморфизм последовательности ДНК, возможность деметилирования или, что это причина, а не следствие, то это тоже не соответствует термину «эпигенетика».

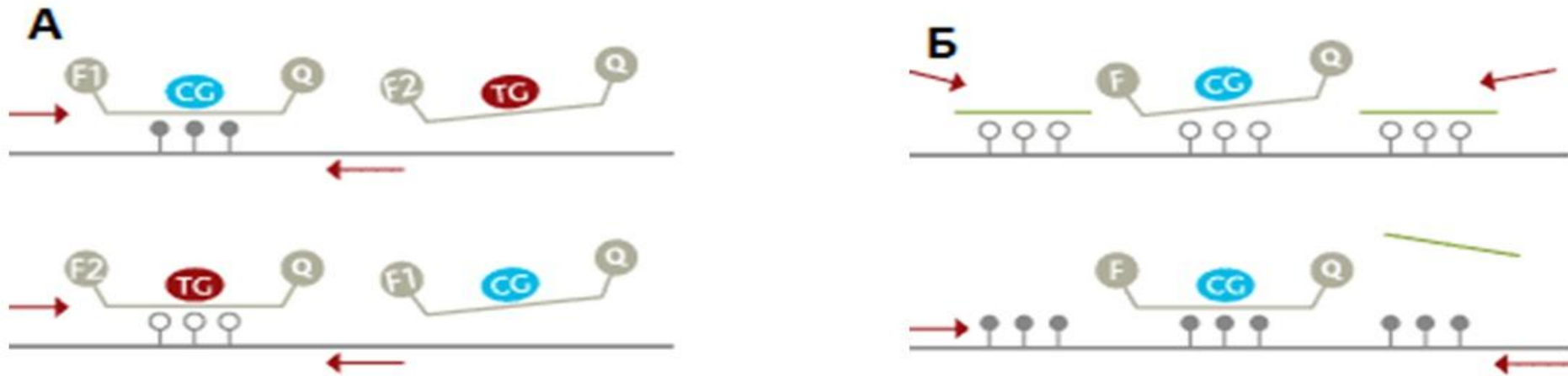
- Если вы считаете, что нормально смешивать маточное молочко с вазелином и продавать его как «эпигенетический крем для лица» доверчивым и не очень знающим ребятам – продолжайте, но мы больше не друзья.

Использование термина «эпигенетика» уже не может быть оправдано с учетом его многочисленных интерпретаций, поэтому нам должно быть ясно, что именно мы под этим подразумеваем. Предлагаю зарезервировать этот термин для описания свойств, связанных с состоянием клеток (клеточное репрограммирование) и их судьбой (траектории), которые опосредуются, но не эквивалентны многим эпи-+ генетическим регуляторам транскрипции.

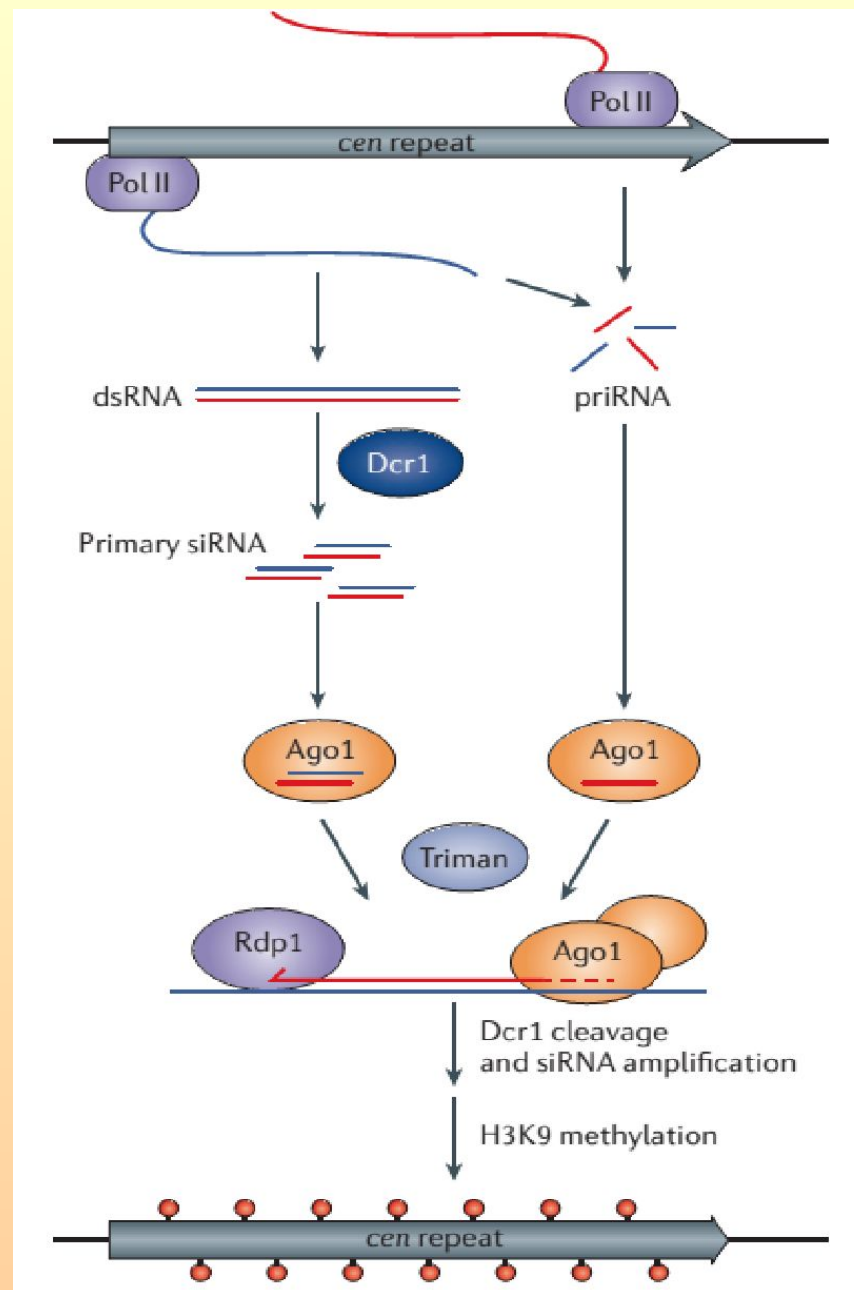
Да здравствует функциональная геномика!

Варианты метилспецифической ПЦР в реальном времени.

MethyLight - область анализируемых CpG-динуклеотидов амплифицируется с праймеров, индифферентных к метилированию, а зонды, специфичные к метилированным и неметилированным участкам, позволяют осуществлять одновременное количественное определение метилированных и неметилированных копий исследуемого участка. **Heavy Methyl** предполагает использование специфических блокаторов амплификации неметилированной ДНК, а амплификация метилированной последовательности определяется по свечению флуоресцентной метки зонда, специфичного к метилированным CpG-динуклеотидам.



А – MethyLight. **Б** – Heavy Methyl. CG – зонд, специфичный к метилированной ДНК, TG – зонд, специфичный к неметилированной ДНК, F, F1 и F2 – флуоресцентные красители, Q – гаситель флуоресценции, красные стрелки – праймеры, зеленым обозначены блокаторы амплификации неметилированной ДНК.



Rdp1 - РНК-зависимая РНК полимераза, Dsr1 – Дайсер, Pol II – РНК полимераза, Ago1 – Аргонафт, Triman – 3' экзонуклеаза.

днРНК действуют как на уровне транскрипции, так и посттранскрипционно. На уровне транскрипции днРНК рекрутируют факторы транскрипции или эпигенетические модификационные комплексы, действуя при этом *in cis* или *in trans*, в зависимости от расположения относительно сайта транскрипции генов-мишеней.

Посттранскрипционно днРНК могут регулировать трансляцию мРНК, а также модулировать альтернативный сплайсинг и деградацию мРНК.

днРНК могут функционировать, как молекулярные каркасы, объединяющие белки в комплексы и иницирующие разные биологические процессы; как проводники, направляющие белки к местам их функционирования; или как ловушки, связывающие белки и препятствующие их присоединению к генам-мишеням. В случае образования хроматином петель днРНК могут действовать как транскрипционные энхансеры.

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ БЕЛОК РНК

snРНК – малые ядерные РНК (или сплайсосомная РНК) являются ключевой составляющей процесса сплайсинга (14 различных вариантов, выполняющих свои функции).

snoРНК – малые ядрышковые РНК участвуют в метилировании и псевдоуридилровании rРНК, tРНК, snРНК, дифференциально экспрессируются в мозге.

scaРНК (small Cajal body-specific RNAs) – малые РНК, обнаруженные в тельцах Кахала, участвуют в процессинге теломеразной РНК.

piРНК – PIWI-взаимодействующая РНК (26-30 н.) эпигенетически и пост-транскрипционно инактивирует транспозоны преимущественно в половых клетках, экспрессируются в мозге.

tiРНК – РНК, ассоциированные с сайтами инициации транскрипции (17-18 н.), участвуют в распределении нуклеосом и/или организации хроматина?

spliРНК – РНК, ассоциированная с сайтами сплайсинга (17-18 н.), участвуют в распределении нуклеосом и/или организации хроматина?

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ БЕЛОК РНК

PASRs – малые РНК, ассоциированные с промоторами. РНК-опосредованная инактивация/активация транскрипции?

TSSa-РНК – малые РНК, ассоциированные с сайтом старта транскрипции. РНК-опосредованная инактивация/активация транскрипции?

PROMPTS – (promoter upstream transcripts) пред-промоторные транскрипты. РНК-опосредованная инактивация/активация транскрипции?

lncРНК – длинные некодирующие РНК (>200 н.). Интронные, межгенные, антисмысловые, не имеют длинной открытой рамки считывания (> 200 кодонов) и поли А-хвоста. Имеют большую клеточную специфичность, чем белки. Возможная функция – регуляция архитектуры ткани. Могут альтернативно сплайсироваться, а некоторые изоформы могут кодировать белки. Функция: метилирование ДНК, регуляция сплайсинга, транс-регуляторные РНК. Нокаут lncРНК может приводить к аномалиям развития и когнитивным нарушениям.

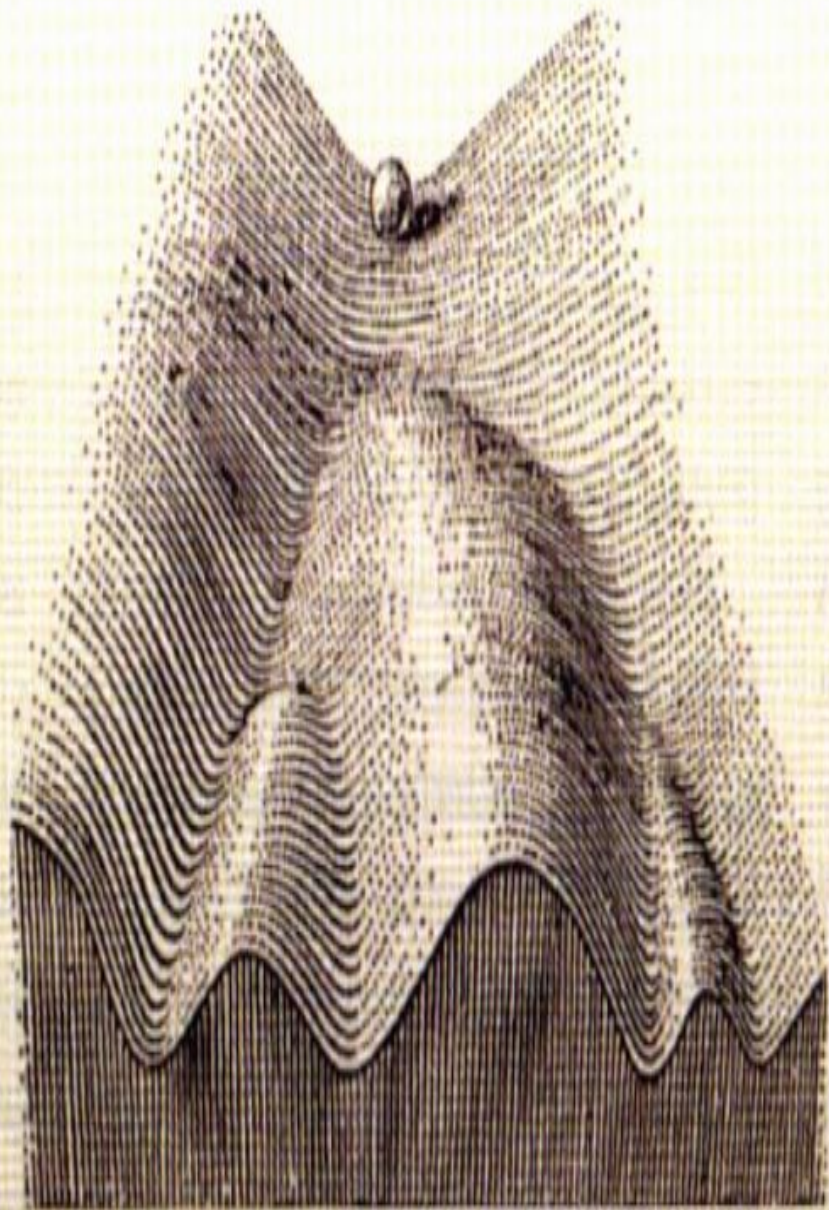
днРНК действуют как на уровне транскрипции, так и посттранскрипционно. На уровне транскрипции днРНК рекрутируют факторы транскрипции или эпигенетические модификационные комплексы, действуя при этом *in cis* или *in trans*, в зависимости от расположения относительно сайта транскрипции генов-мишеней.

днРНК могут функционировать, как молекулярные каркасы, объединяющие белки в комплексы и инициирующие разные биологические процессы; как проводники, направляющие белки к местам их функционирования; или как ловушки, связывающие белки и препятствующие их присоединению к генам-мишеням. В случае образования хроматином петель днРНК могут действовать как транскрипционные энхансеры.

Посттранскрипционно днРНК могут регулировать трансляцию мРНК, а также модулировать альтернативный сплайсинг и деградацию мРНК.

днРНК часто служат предшественниками коротких нкРНК, таких как микроРНК и piwiРНК.

днРНК может служить так называемой губкой для микроРНК, если содержит комплементарные им последовательности, что позволяет связывать микроРНК, препятствуя взаимодействию с геном-мишенью.







**Профессор фармакологии
Моше Сциф (Монреаль/
Канада) одним из первых
связал эпигенетические
маркеры
(гипометилирование и
гиперметилирование
генетической матрицы -
ДНК) с болезнями, в
частности с
онкологическими.**

