Серга С.В., Козерецька І.А., Демидов С.В., Вайсерман О.М.

Епігенетичні основи онтогенезу

Посібник для студентів біологічних, медичних та сільськогосподарських спеціальностей

Київ

ЗМІСТ

ВСТУП……..4

РОЗДІЛ 1. ЕПІГЕНЕТИКА. ІСТОРИЧНИЙ ЕКСКУРС…….6

РОЗДІЛ 2. ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ЕПІГЕНЕТИЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ……23

2.1. МЕТИЛЮВАННЯ ДНК……..24

2.2. ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНІ МОДИФІКАЦІЇ ГІСТОНІВ……..42

2.3. НЕКОДУЮЧІ РЕГУЛЯТОРНІ РНК…….67

РОЗДІЛ 3. ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ У РІЗНИХ ГРУП ОРГАНІЗМІВ……..91

3.1. БАКТЕРІЇ. ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ.....91

3.2. ОСОБЛИВОСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ МОДИФІКАЦІЙ У ДРІЖДЖІВ……99

3.3. ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ У *Drosophila*……110

3.4. ЕПІГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ У РОСЛИН……126

3.5. ОСОБЛИВОСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ МОДИФІКАЦІЙ У ССАВЦІВ…135

РОЗДІЛ 4. ЗВ’ЯЗОК МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ І ЕПІГЕНЕТИЧНИМИ ЧИННИКАМИ……..142

РОЗДІЛ 5. РЕПРОГРАМУВАННЯ ГЕНОМУ У ЕМБРІОГЕНЕЗІ……179

РОЗДІЛ 6. ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ СТАТЕВОЇ ДЕТЕРМІНАЦІЇ І ГОНАДОГЕНЕЗУ…….187

РОЗДІЛ 7. ІНАКТИВАЦІЯ Х-ХРОМОСОМИ……..198

РОЗДІЛ 8. ГЕНОМНИЙ ІМПРИНТИНГ……213

РОЗДІЛ 9. ПАРАМУТАЦІЇ……..230

РОЗДІЛ 10. ЗОВНІШНІ ФАКТОРИ ТА МОДУЛЯЦІЯ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ……...243

РОЗДІЛ 11. ПРОГРАМУВАННЯ ФЕНОТИПУ У РАННЬОМУ ОНТОГЕНЕЗІ……251

РОЗДІЛ 12. ГІПОТЕЗА ПРОГНОСТИЧНОЇ АДАПТИВНОЇ

ВІДПОВІДІ……..…266
РОЗДІЛ 13. ГІПОТЕЗА РАННЬОГО ПРОГРАМУВАННЯ ХРОНІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПІЗНЬОГО ВІКУ……..……268
РОЗДІЛ 14. КОНЦЕПЦІЯ ЕПІГЕНЕТИЧНОГО ДРЕЙФУ……...271
РОЗДІЛ 15. ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ТА ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЮДИНИ……280
15.1. ІМУННІ РОЗЛАДИ…….……..282
15.2. ЕПІГЕНЕТИКА ТА ОНКОЛОГІЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ……...293
15.3. МЕТАБОЛІЧНИЙ СИНДРОМ В КОНТЕКСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН…….306
15.4. КАРДІОВАСКУЛЯРНА ПАТОЛОГІЯ……..317
15.5. НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ…… 323
15.6. ЕПІГЕНЕТИКА ШИЗОФРЕНІЇ……..330
РОЗДІЛ 16. ЕПІГЕНЕТИКА ПОВЕДІНКИ……337
РОЗДІЛ 17. ЕПІГЕНЕТИКА ТА СТАРІННЯ…….345
РОЗДІЛ 18. ТРАНСГЕНЕРАЦІЙНЕ ЕПІГЕНЕТИЧНЕ СПАДКУВАННЯ……..354
ЗАКЛЮЧЕННЯ…….358
УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ…….360

ВСТУП

Про початок реалізації під керівництвом першовідкривача структури ДНК Джеймса Уотсона грандіозного проекту «Геном людини» було повідомлено у 1990 році. Очікування, пов'язані з його реалізацією, напевне, можна було порівняти зі сподіваннями, покладеними на розробку технології холодного термоядерного синтезу. Однак, коли в 2003 році був завершений основний обсяг секвенування, його результати виявилися досить несподіваними: з'ясувалося, що інформація про неймовірно складну будову організму людини укладена всього в ~ 25 тисячах генів. Вкрай важко було собі уявити, яким чином величезний обсяг інформації може міститися в інструкції, написаної за допомогою всього-навсього 25 000 слів. Відразу ж після завершення проекту з'явилося безліч саркастичних відгуків, основна тональність яких зводилася до того, що величезні гроші, витрачені на його реалізацію, викинуті даремно. Один з відомих в західному світі популяризаторів науки дозволив собі уїдливо зауважити, що: «Нам нарешті вдалося зазирнути в сумку сантехніка і побачити, якими розвідними ключами він орудує. І що ж, ми хоч на йоту наблизилися до розуміння того, як влаштована складна сантехнічна система будівлі?».

На тлі зростаючого скептицизму щодо достатності базисних генетичних уявлень щодо опису понадскладної картини біологічного світу, активізувався інтерес до явищ, які не можуть бути покладені в прокрустове ложе дарвінівсько-менделевскої парадигми, зокрема, до феноменів успадкування набутих ознак, парамутацій, фенотипових розбіжностей між реципрокними гібридами, негенетичної природи хронічних захворювань тощо. Ще нещодавно навіть обговорювати ці явища в академічному середовищі вважалося смертельним для наукової репутації. У наш час подібні феномени зазвичай відносять до сфери епігенетики. Ще зовсім недавно, якихось 30-40 років тому, і це слово в серйозних наукових колах вважалося лайливим. Однак якщо зараз заглянути в найбільш затребувану базу пошуку наукової літератури, PubMed, слово «epigenetic» зустрічається 46582 рази (на 04.04.2016). І кількість

публікцій, пов'язаних із запитами за ключовими словами в цій області, збільшується експоненційно, набагато швидше, ніж кількість суто генетичних робіт. У сучасному науковому середовищі вже ні в кого не викликає сумніву, що епігенетика є одним з найбільш перспективних напрямків дослідницької діяльності. Дійсно, якщо припустити, що властивості організму залежать не тільки від інформації, записаної в генетичних інструкціях, а й від епігенетичної інформаційної системи, яку, на відміну від «жорстої» генетичної спадковості ('hard inheritance'), називають «м'якою» ("soft inheritance"), стають зрозумілими багато феноменів, які не можуть знайти пояснення в рамках класичних генетичних уявлень.

Розуміння процесів, які визначають епігенетичний контроль різних аспектів онтогенезу організму, безсумнівно, відкриє нові перспективи для людства, зокрема, у сільському господарстві та медицині. Наприклад, оскільки епігенетичні зміни, на відміну від суто генетичних, зворотні, можна буде за допомогою специфічних впливів усувати ті з них, які є небажаними та можуть призвести до розвитку певних патологічних станів.

Посібник «Епігенетичні основи онтогенезу» є першою на пострадянському просторі книгою, присвяченою викладенню механізмів, які визначають контроль окремих етапів онтогенезу у різних видів, а також розвиток патологічних станів у людини. Ця книга може бути цікавою перш за все для студентів біологічних, медичних та сільськогосподарських спеціальностей, а також для всіх, хто цікавиться сферою сучасних епігенетичних досліджень.

РОЗДІЛ 1. ЕПІГЕНЕТИКА. ІСТОРИЧНИЙ ЕКСКУРС

Дослідження розвитку організмів та спадковості – довгий шлях до об'єднання підходів. У XIX столітті провідні біологи розглядали спадковість та розвиток організмів як невід'ємнимі частини однієї і тієї самої наукової проблеми. Видатний вчений Грегор Мендель (Gregor Mendel) у своїй роботі продемонстрував, що спадковість може бути окремим предметом дослідження без залучення у таке дослідження вивчення розвитку організму. Саме використанням такого підходу деякі автори пояснюють головну причину ігнорування роботи Менделя його сучасниками. І лише після перевідкриття його роботи тридцять п'ять років потому, підхід, використаний Менделем, було успішно розвинуто у новій науці генетиці. З іншого боку, проблема вивчення розвитку організмів на той час перестала бути першочерговою. Так, один з піонерів нової науки генетики Томас Хант Морган (Thomas Hunt Morgan) був за освітою ембріологом, проте його лабораторія не працювала над вивченням розвитку *Drosophila,* а відома за дослідженням матеріальних носіїв спадковості - хромосом.

В той час як генетика активно прогресувала, ембріологія та біологія розвитку використовували методи та підходи, які майже не брали до уваги гени та їх дію. Аж до середини XX століття два підходи існували окремо, і було лише декілька провідних вчених, які вважали, що генетика та біологія розвитку дійсно пов'язані між собою та мають бути об'єднані у спільну дисципліну. Перш за все, слід згадати Конрада Уоддінгтона (Conrad Waddington), відомого у обох сферах досліджень (Рис. 1.1). Саме він вперше використав термін **епігенетика**, замінивши ним грецьке слово **епігенезис** – теорія розвитку, згідно з якою ранні ембріони є недиференційованими. Проте для Уоддінгтона епігенетика не дуже відрізнялася від ембріогенезу і була визначена як **реалізація генетичної програми під час розвитку організму**. Наприклад, його робота «Епігенетика птахів» в значній мірі є викладом особливостей розвитку курей. Він також ввів термін **епігенотип**, під яким розумів **загальну**

систему розвитку, яка складається з взаємопов'язаних шляхів розвитку, через які реалізується доросла форма організму.

Рис. 1.1. Конрад Уоддінгтон (1905-1975)

Іншим провідним біологом, якого цікавили і генетика, і біологія розвитку, був Ернст Хадорн (Ernst Hadorn). Він досліджував мутації, які впливають на розвиток *Drosophila*, та написав роботу «Генетика розвитку і летальні фактори». Також Хадорн працював протягом багатьох років над вивченням властивостей імагінальних дисків дрозофіли та відкрив явище **трансдетермінації**. В нормі окремий імагінальний диск личинки розвивається в специфічну структуру дорослої особини (наприклад, крило, антену). Клітини дисків є недиференційованими, проте можна сказати, що вони предетерміновані для подальшої диференціації. Хадорн з колегами вирощували тканини дисків у черевцях дорослих особин та пересаджували їх від мухи до

мухи. При дії на тканину диска гормоном екдізоном з неї розвивалася відповідна структура імаго дрозофіли. Здатність клітин імагінального диску розвиватися в певний орган імаго спадкувалася протягом декількох сотень поділів. Проте іноді предетермінований стан клітин міг змінюватися і з диску ноги розвивалася інша структура, наприклад, крило, що і було названо трансдетермінацією.

Серед вчених, які прагнули об'єднати генетику та біологію розвитку, можна виділити також таких видатних дослідників, як Річард Голдшмідт (Richard Goldmischmidt), Джуліан Хакслі (Julian Huxley), Джон Бердон Сандерсон Холдейн (John Burdon Sanderson Haldane) та інших.

Слід зазначити, що після Уоддінгтона час від часу деякі вчені поверталися до обговорення епігенетики, яке стосувалося, наприклад, цитоплазматичної спадковості, фенотипу культивованих клітин ссавців та перероджених клітин. Загалом же прослідковується тенденція до схильності науковців відносити до епігенетики спостереження, які не вдавалося легко пояснити у рамках генетичних понять, але які без сумніву мали спадковий компонент. Однак, кожен автор мав своє власне уявлення про визначення епігенетики та не пропонував конкретних механізмів для пояснення таких спостережень. Те саме стосується і більш ранніх робіт самого Уоддінгтона, хоча він і впровадив нові важливі концепції, наприклад, таку як **концепція каналізації**.

З плином часу стало очевидно, що фундаментальні особливості розвитку організмів потребують суттєвих пояснень. Наприклад, диференційовані клітини, такі як фібробласти та лімфоцити, стабільно підтримують початково визначений фенотип протягом численних клітинних поділів. Це означає, що у цих клітинах постійно працюють спеціалізовані гени, які визначають їх фенотип, тоді як гени, активні у інших типах клітин, репресовані. Важливо те, що такий контроль успадковується, як і детермінований стан клітин імагінальних дисків у *Drosophila*. Свого часу класична генетика традиційно розглядала спадкування генів у поколіннях організмів та не брала до уваги

спадковість у соматичних клітинах, які можуть ділитися досить довго. Крім того, стовбурові клітини вищих організмів при діленні дають початок як диференційовнимі клітинам, так і стовбуровим. Мітотичні процеси у кістковому мозку забезпечують формування декількох типів клітин крові, що безсумнівно свідчить про зміни в активності генів протягом цього процесу. Іншим прикладом перемикання активності генів може бути інактивація Х хромосоми у самок плацентарних ссавців. На ранніх етапах розвитку одна з Х хромосом випадково інактивується у кожній клітині, тоді як друга залишається активною. Обидві хромосоми містять майже ідентичні послідовності ДНК та перебувають у одних і тих же нуклеоплазмі та цитоплазмі, тому різниця у активності генів цих гоносом є результатом лише особливостей, притаманних кожній з них. Наведені приклади демонструють як здатність до зміни генної активності протягом згаданих процесів, так і можливість спадкування таких змін.

Відкриття метилювання ДНК як епігенетичного механізма. Вперше припущення, що метилювання (або деметилювання ДНК) може відігравати важливу біологічну роль, було зроблено у 1969 році Гріффітом та Малером (Griffith and Mahler), які вказували на можливе залучення цього процесу до забезпечення довготривалої пам’яті у головному мозку. У 1975 році було опубліковано дві роботи, в яких викладено молекулярну модель зміни активності генів, а також успадковуваності активного чи неактивного стану генів. Згадана модель грунтувалася саме на ферментативному метилюванні цитозину у складі ДНК, яке також відоме під терміном модифікування ДНК. Цікавим є те, що припущення, зроблені незалежно у роботах Артура Ріггса (Arthur Riggs) та Робіна Холідея і Джона П'ю (Robin Holliday and John Pugh) були дуже схожими . Згідно запропонованої моделі, метилювання ДНК суттєво впливає на експресію генів, тому активацію та репресію генної активності протягом розвитку організму можна пояснити саме змінами у патерні метилювання ДНК. Фермент, який метилює окрему ділянку ДНК, повинен бути

специфічним до послідовності саме цієї ділянки або взаємодіяти з іншим специфічним до неї білком (або білками). Також було передбачено, що патерн метилювання повинен успадкуватися, оскільки існує фермент (підтримуюча метилаза), який упізнає метильовану ДНК одразу після реплікації та не впізнає неметильовані послідовності. Таким чином, було запропоновано механізм, який забезпечує успадковуваність метильованого та неметильованого стану ДНК і, як наслідок, пояснює успадковування набутих патернів активності генів. Питання інактивації однієї з Х хромосом у ссавців розглядалося у роботі Ріггса. Справа в тому, що для інактивації хромосоми, по-перше, повинно відбутися початкове метилювання *de novo*, що має негайно виключитися, забезпечуючи маркування тільки однієї хромосоми; по-друге, повинен існувати механізм для інактивації цілої хромосоми, а не лише її певної ділянки. Оскільки легше передбачити наявність метилюючого ферменту, ніж навпаки, то метилювання ДНК повинно бути асоційовано з інактивацією генів. Це також може пояснити інактивацію ДНК аутосом у різних випадках транслокацій за участю Х хромосоми.

Було передбачено наявність так званого **годинника розвитку,** який має відігравати суттєву роль протягом розгортання генетичної програми онтогенезу організму. Це повинен бути механізм, який розраховує певну кількість клітинних поділів перед активацією або репресією тих чи інших генів. Природа такого годинника та його механізм активно обговорюються. Проте докази існування годинника розвитку є досить суперечливими, та тільки час дасть відповідь на запитання, чи насправді він є компонентом розвитку організмів.

Окрім обговорення ролі метилювання ДНК у регуляції активності генів, було висунуто припущення про можливість формування специфічних змін азотистих основ у послідовності ДНК, Наприклад, Скарано (Scarano) у 1975 році передбачив, що ферментативне дезамінування 5-метил цитидину може призводити до утворення тимідину та, як наслідок, до заміни пари G-C на A-T. На сьогоднішній день це припущення підтвердилось. Продемонстровано наявність ферменту цитидин дезамінази, яка перетворює цитидин на урацил

ДНК в імунній системі та плюрипотентних клітинах. Робота Сейгера та Кітчина (Sager and Kitchin), присвячена метилюванню ДНК, яка була опублікована у тому ж році, містила припущення, що в еукаріот існує фермент, який розщеплює не модифіковану ДНК. Ця гіпотеза також згодом знайшла своє підтвердження. Тоді ж було запропоновано концепцію онкогенезу, згідно з якою зміни метилювання ДНК можуть відігравати важливу роль у прогресії пухлин. Паралельно накопичувалися докази зміни експресії генів у ракових клітинах в результаті мутацій. Якщо модель метилювання вірна, то аберантні зміни у розподілі 5-метил-цитозинів у ракових клітинах також можуть призводити до зміни експресії генів. Примітно, що слово «епігенетика» не використовувалося у жодній з цих робіт, які стосувалися метилювання ДНК та експресії генів, можливо через його попереднє використання у дещо іншому контексті.

У 1975 році, коли була запропонована модель метилювання ДНК, були відсутні експериментальні докази, які б її підтверджували. Також не було доказів існування зв’язку метилювання ДНК з експресією генів. Однак, розповсюджена модель для пояснення інактивації Х хромосоми пропонувала саме метилювання ДНК в якості основного механізму такої інактивації. З розвитком методів клонування та секвенування ДНК було винайдено і нові методи для скринінгу сайтів метилювання ДНК. Перш за все, це використання специфічних рестриктаз, які здатні впізнавати та розрізати лише неметильовані послідовності ДНК (зазвичай 4 або 6 пар основ). У деяких випадках можна підібрати два ферменти, які впізнають однакову послідовність, але тільки одна рестриктаза здатна розрізати ДНК, якщо вона метильована. Така пара ферментів називається **ізошизомерами**, наприклад, рестриктази Hpa II та Msp I. Обидва ферменти розщеплюють ДНК у межах специфічного сайту GCGC, але тільки Msp I розрізає дану послідовність у випадку, коли внутрішній цитозин метильований (Рис. 1.2). Використання Саузерн-блот аналізу дозволило визначати, метильована чи ні конкретна послідовність, яка містить сайт GCGC. Незабаром було виявлено, що гени, промотори яких метильовані, неактивні,

тоді як промотори активних генів не містять метилювання. Вказаний метод має суттєві обмеження: вдається виявити лише частину можливих сайтів метилювання, зазвичай біля 10%. Пізніше було впроваджено більш чутливі методи, за допомогою яких можна виявити всі метильовані та неметильовані сайти у заданому фрагменті ДНК.

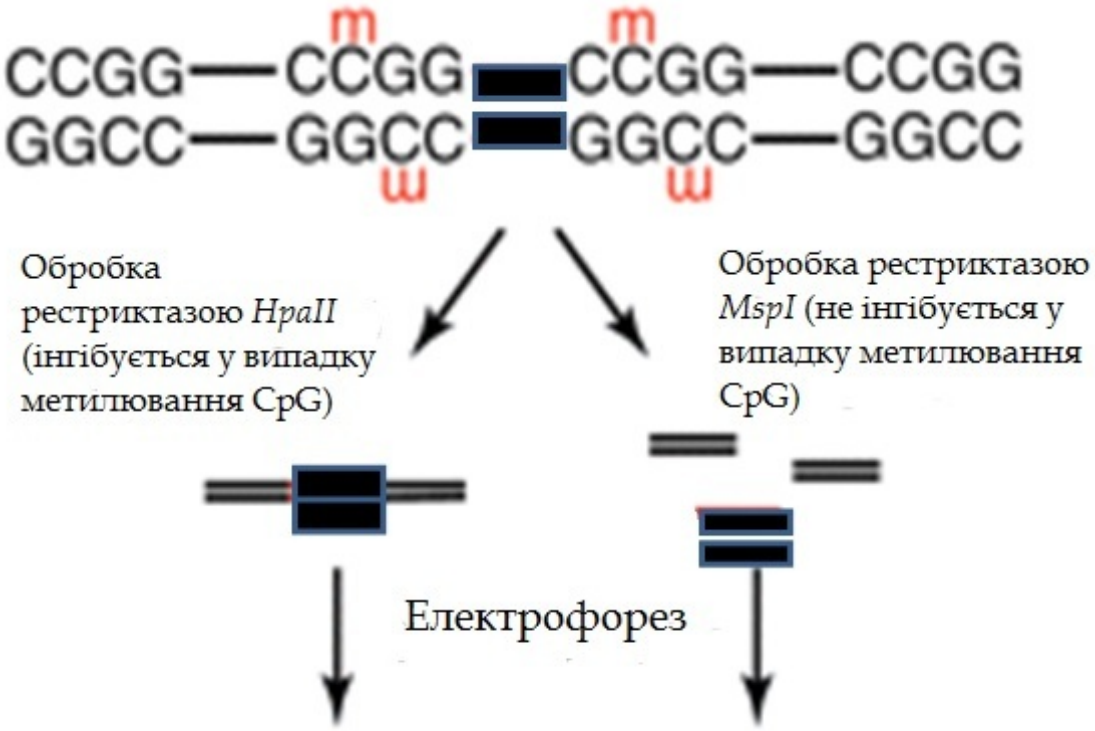


Рис. 1.2. Схема обробки ДНК рестриктазами Hpa II та Msp I для визначення рівня метилювання.

Наступні свідчення ролі метилювання ДНК вдалося отримати, використовуючи нуклеозидний аналог 5-азацитидин. Ця речовина вбудовується у ланцюг ДНК, інактивує ДНК метилтрансферази, внаслідок чого спостерігається деметилювання ДНК. Неодноразово у різних контекстах було продемонстровано, що азацитидин може відновлювати активність генів, які «мовчать». Такі результати стосуються і відновлення активності генів у інактивованій Х хромосомі.

Визначення епігенетики. Як вже зазначалося, вперше **термін епігенетика** застосував Конрад Уоддінгтон, розуміючи під ним «всі ті події, які призводять до розгортання генетичної програми розвитку організмів». У такому розумінні немає нічого помилкового, окрім того що воно не конкретне. У середині 1980-х років стало зрозуміло, що існує тип спадковості, який не пов'язаний зі змінами у послідовності ДНК. У 1987 році вийшла робота Робіна Холлідея (Robin Holliday) (Рис 1.3) під назвою «Спадкування епігенетичних дефектів». У даній роботі він заново переглянув використання даного терміна Уоддінгтоном та вжив його у ситуації, коли зміни у метилюванні ДНК також супроводжуються змінами генної активності. Крім того, були обговорені можливі епігенетичні зміни під час розвитку онкологічних захворювань та старіння. Також було висловлено припущення, що деякі трансгенераційні ефекти, які не вдається пояснити у межах основних постулатів менделівського успадкування, можуть інколи бути викликані передачею патернів метилювання ДНК через клітини зародкового шляху. У рамках цих уявлень видавалося імовірним, що деякі епігенетичні дефекти можуть розпізнаватися та репаруватися під час генетичної рекомбінації у мейозі. Тоді ж було запропоновано слово «**епімутація**» для опису спадкових змін у генах, які не пов'язані зі змінами послідовності нуклеотидів у ДНК як такими. Вважається, що дана публікація призвела до бурхливого росту використання терміну «епігенетика» у 1990-х роках.

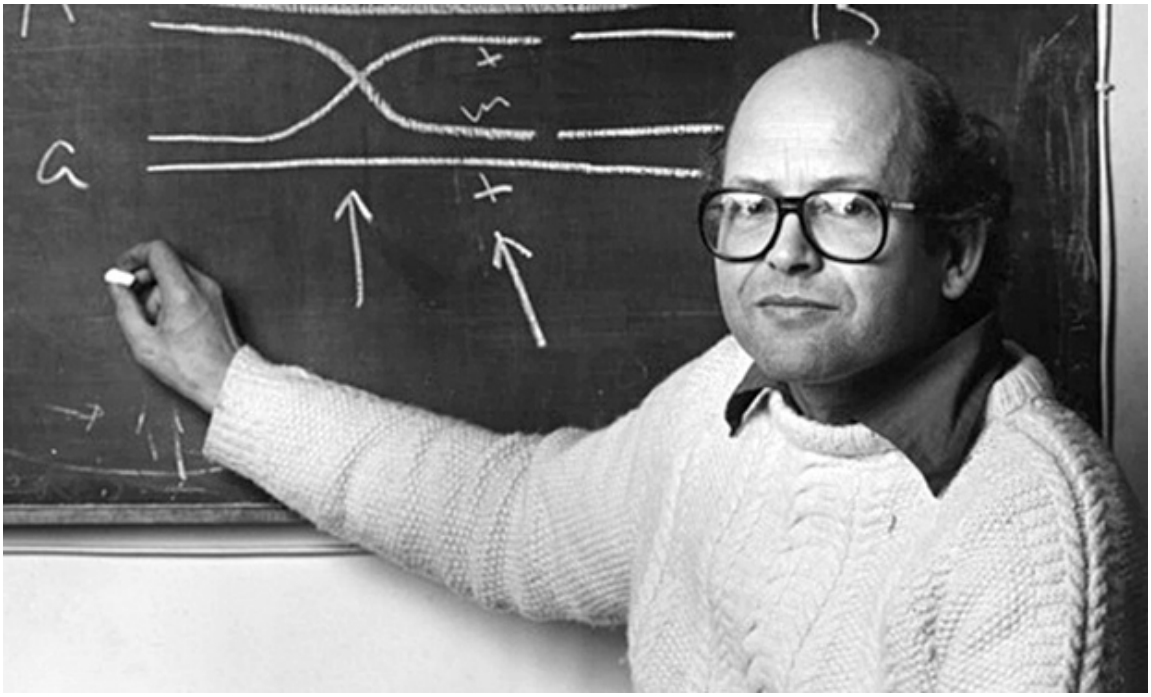


Рис. 1.3. Робін Холлідей (1932-2014).

Наступним кроком стали дослідження феномену **геномного імпринтинга**, в результаті яких стало очевидно, що його причиною є епігенетична інформація, яка може зберігатися під час мейозу та гаметогенезу. Тому постала потреба у нових визначеннях епігенетики. У 1994 році було запропоновано два нових визначення: 1) наука про зміни генної експресії, які відбуваються у організмів з клітинами, що диференціюються, та спадкування певних патернів експресії генів під час мітозу; 2) ядерна спадковість, яка не пов'язана зі змінами послідовності нуклеотидів у ДНК. Перше визначення досить широке і може включати як метилювання ДНК, так і інші механізми. Друге визначення включає імпринтинг та інші описані приклади епігенетичної спадковості, проте виключає цитоплазматичну спадковість. Таке визначення може бути частиною першого.

Слід зазначити, що обидва визначення насправді є недосконалими, але вони в змозі охопити більшість відомих епігенетичних процесів. Дані визначення не стосуються розвитку організмів безпосередньо, тому в цьому контексті краще використовувати загальне визначення Уоддінгтона, яке може стати більш конкретним, якщо у майбутньому буде отримана нова інформація.

Епігенетика на відміну від класичної генетики, яка базується на успадкуванні ознак у поколіннях в залежності від послідовності нуклеотидів у молекулах ДНК, на що не впливає навколишнє середовище, відводить суттєву роль середовищу клітин у епігенетичних змінах, які можуть успадковувавитись. Для пояснення таких відмінностей Мейнард Сміт (Maynard Smith) ввів термін **подвійна спадковість**. Він мав на увазі, що існує класична спадковість, яка базується на змінах у ДНК, та епігенетична спадковість, основою якої не є зміни у послідовності нуклеотидів ДНК. Це було відповіддю на припущення Єви Яблонки та Меріон Лемб (Eva Jablonka and Marion Lamb) про те, що епігенетична спадковість у клітинах зародкового шляху вказує на можливість успадковуваності впливів навколишнього середовища, які викликають зміни фенотипу (Рис 1.4).

Рис. 1.4. Єва Яблонка (1952) та Меріон Лемб (1923-2013)

На сьогоднішній день існує багато надійно задокументованих прикладів трансгенераційних ефектів з передбачувано епігенетичною природою. Подвійна спадковість була також продемонстрована в експериментах з культурами клітин ссавців. У деяких випадках порушення, які довгий час вважалися

класичними мутаціями, виявилися насправді спадковими змінами у метилюванні ДНК. Яскравим прикладом є добре відомі зміни у симетрії квітів, які на сьогоднішній день вважаються епімутаціями.

Інші епігенетичні механізми. Вивчення структури хроматину та експресії генів стали інтенсивним напрямком досліджень сьогодення. Термін «хроматин» було введено приблизно у 1880 році, а у 1884 році були відкриті гістони Альбрехтом Косселем (Albrecht Kossel). Проте більш детально вони почали досліджуватись лише з другої половини XX століття. У 1964 році вийшла піонерська робота Вінсента Олфрі (Vincent Allfrey), у якій було показано, що гістони можуть ацетилюватися. У 70-х роках була відкрита нуклеосома, а її структура описана лише у 1984 році Річмондом і колегами [із роздільною здатністю 7,0 Å, детальнішу структуру (2,8 Å) розшифрували у 1997 році]. У 1990-ті роки описані ферменти встановлення та усунення модифікацій гістонів, а також білки, які здатні впізнавати такі модифікації. А концепція гістонового коду була сформульована у 2000 роках (Рис 1.5).

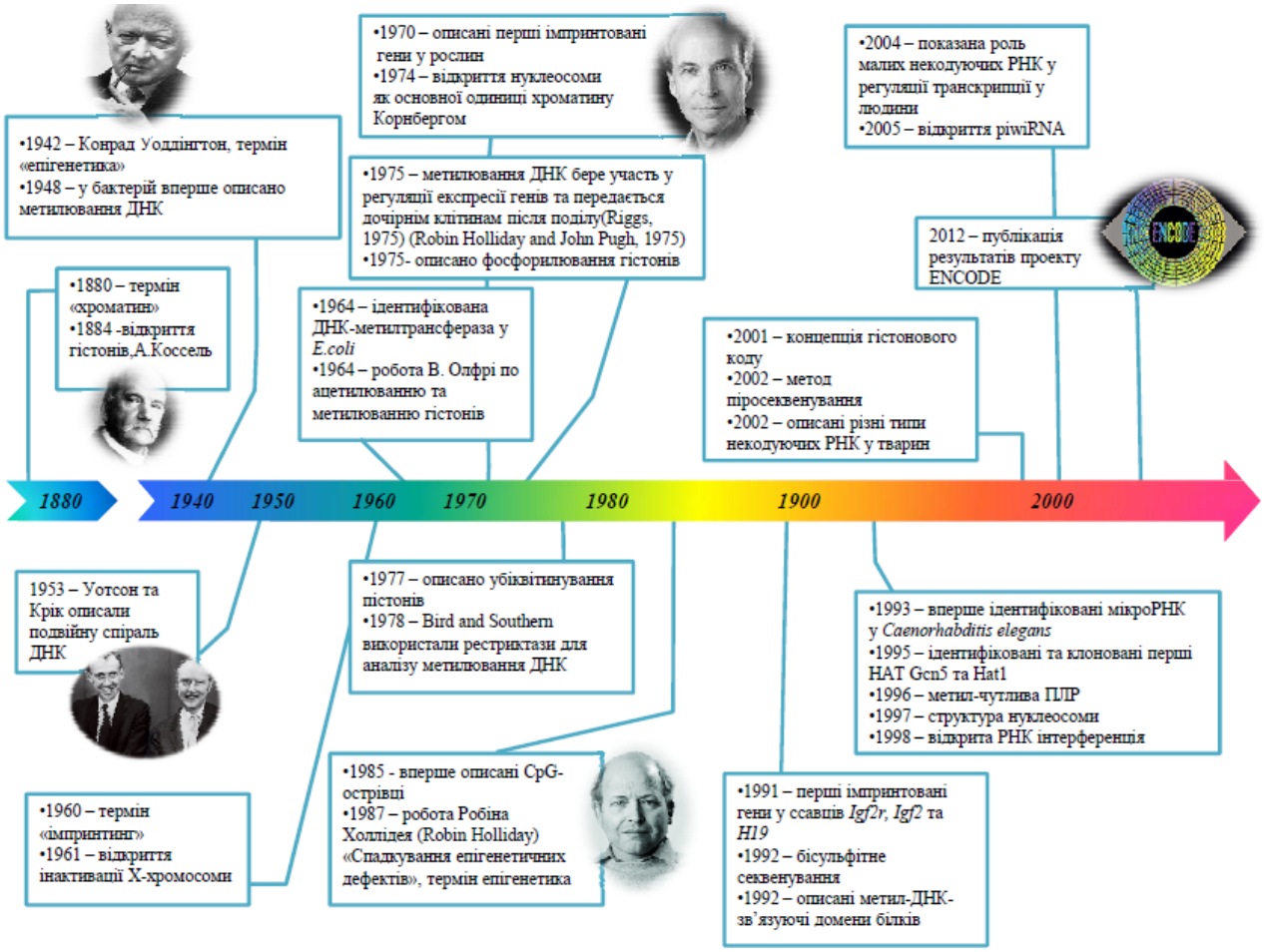


Рис 1.5. Основні етапи розвитку епігенетики.

Останнім часом приходить усвідомлення важливої ролі РНК у епігенетичних подіях. Існують переконливі докази ролі малих регуляторних РНК в клітині, а їх активність сприймають в якості одного з механізмів епігенетичного контролю. Одними з таких малих РНК є **мікро-РНК** (microRNAs; miRNA) – клас малих некодуючих РНК довжиною 18-25 нуклеотидів, які були виявлені у клітинах тварин та рослин. У 1993 мікроРНК вперше були ідентифіковані у *Caenorhabditis elegans*. На 2001 рік були відомі вже різноманітні малі регуляторні РНК у ссавців та рослин (Рис.1.5).

МікроРНК також є складовими машинерії **РНК-інтерференції** (RNA interference; RNAi), яка забезпечує посттранскрипційну регуляцію експресії генів та бере участь у різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесах, які включають регуляцію вибору часу диференціації та структуроутворення, обмеження потенціалу диференціації і клітинний

сигналінг. Також вони відіграють важливу роль у розвитку серцево-судинних захворювань та канцерогенезі. Біогенез та функції мікроРНК (а саме, як мікро-РНК утворюються та процесуються у зрілу форму, як вони регулюють експресію генів і т.і.) інтенсивно досліджувались та на сьогоднішній день добре описані. Проте деякі запитання залишаються без відповіді, зокрема, як контролюється експресія мікроРНК та які гени регулюються за участі мікро-РНК. Лише нещодавно були отримані дані, які свідчать, що експресія мікроРНК може контролюватися епігенетично.

МікроРНК є лише одним із компонентів РНКі, в ході якого відбується сайленсинг експресії генів за рахунок утворення пари змістовна-антизмістовна РНК та подальшої її деградації. РНКі була відкрита у 1998 році у рослин та *C. elegans*. Цікаво, що цим відкриттям передував опис у рослин ще одного феномену, з яким пов'язані малі регуляторні РНК, а саме **РНК-залежного метилювання ДНК** (RNA-directed DNA methylation; RdDM). Все вищеописане свідчило про наявність як **транскрипційного**, так і **посттранскрипційного** генного сайленсинга. Також було встановлено, що екзогенні **дволанцюгові РНК** (double-stranded RNAs; dsRNA) процесуються на короткі фрагменти [відомі як **малі інтерферуючі РНК** (small interfering RNAs; siRNAs)] подібного до мікроРНК розміру. Було висловлено припущення, що мікроРНК залучені у аналогічні, але ендогенні регуляторні механізми. Висловлена гіпотеза підтвердилась та були виялені ключові гени та білки, які беруть участь у їх біогензі та функціонуванні, а саме Drosha, Dicer та декілька білків Argonaute (AGO). Вважається, що мікроРНК та siRNAs функціонують посттранскрипційно у цитоплазмі, проте наявність білків AGO у ядрі та участь механізмів РНКі у епігенетичних процесах вказує на більшу складність цих процесів, ніж очікувалось раніше.

Хоча білки експресуються повсюдно та пов'язані як з мікроРНК, так і з siRNAs, існує підгрупа AGO білків, які називаються **PIWI** (P-element induced wimpy testis) та необхідні для розвитку клітин зародкового шляху. Функціонування білків PIWI та PIWI-like пов'язане з окремим класом малих

регуляторних РНК (довжиною 26-30 нуклеотидів), які називаються **PIWI-interacting RNAs** (piRNAs). piRNAs беруть участь у посттранскрипційному сайленсингу транспозонів у клітинах зародкового шляху. Білки PIWI виявлені переважно у ядрі, колокалізуються РНК-залежним чином з білками групи Polycomb, та можуть експресуватися і у інших тканинах (включаючи головний мозок), що вказує на їх можливу участь у інших процесах.

Нещодавно у тварин (але не у рослин) були відкриті два інші класи малих РНК довжиною 17-18 нуклеотидів, які пов'язані з ініціацією транскрипції і сплайс-сайтами та були названі **transcription initiation RNAs** (tiRNAs) та **splice site RNAs** (spliRNAs). Походження та функції цих класів РНК залишаються не визначеними, проте попередні дані свідчать, що вони беруть участь у позиціонуванні нуклеусом та/або у формуванні інших рівнів організації хроматина. Крім того, виявлені асоційовані з промоторами РНК, які названі **promoter-associated short RNAs** (PASRs), **transcription start site-associated RNAs** (TSSa-RNAs) та **promoter upstream transcripts** (PROMPTS), деякі з яких можуть брати участь у РНК-залежному транскрипційному сайленсингу.

У бактерій також присутня велика кількість різноманітних малих регуляторних РНК, які відіграють важливу роль у низці адаптивних відповідей. Бактеріальні малі регуляторні РНК загалом функціонують подібно до антизмістовних РНК еукаріот, регулюючи трансляцію та стабільність цільових мРНК. У 2005 році була відкрита особлива система адаптивної відповіді бактерій, яка була названа **CRISPRs** (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Виявиося, що у багатьох бактеріальних та більшості геномів архей наявні локуси, які містять регулярно повторювальні послідовності, що перемежовуються вірусними ДНК (вони і називаються CRISPRs). Такі локуси являють собою вроджену бактеріальну імунну систему, яка працює за наступною схемою 1) фрагменти вірусної ДНК вбудовуються між повторами; 2) транскрибуються у бактеріальному геномі; 3) транскрипти процесуються у невеликі guide RNAs, які зв'язуються з їх ефекторними комплексами через послідовності повторів; 4) такі комплекси впізнають вірусну

РНК або ДНК та руйнують її. Описана система нещодавно покладена в основу методу направленого мутагенезу у еукаріот (programmable sequence-specific genome manipulation).

*Геном та епігеном***.** Все вищесказане створило підгрунтя для формулювання концепції **епігенотипу**. Епігенотип – це фактичний патерн активності генів у спеціалізованому типі клітин. Клітини мають ферменти та білки «домашнього господарства» (house-keeping), які необхідні для нормального метаболізму клітин різних типів, та білки «розкоші» (luxury), які мають спеціалізовані функції. Таким чином епігенотип - це функціональний стан всіх генів клітини, необхідних і для домашнього господарства, і для виконання спеціалізованих функцій. Отже, фібробласти та лімфоцити мають один і той самий генотип, успадкований від запліднeної яйцеклітини, проте вони мають різні епігенотипи.

У послідовності ДНК людини присутні тільки чотири типи нуклеотидів, з урахуванням цитозину, який може бути або метильованим, або неметильованим, їх п’ять. Проект «Епігеном людини» («Human Epigenome Project»), започаткований у 1999 році International Human Epigenome Consortium, має на меті визначити патерн метилювання цитозину у різних типах клітин. Він базується на техніці бісульфітного секвенування, яку було впроваджено у дослідження у 1992 році. З того часу методика була значно удосконалена, проте хімічний принцип залишився незмінним. Він полягає у тому, що бісульфіт здатен дезамінувати цитозин, перетворюючи його на урацил, тоді як 5-метилцитозин не деамінується. Після проведення дезамінування послідовність ампліфікується та секвенується. Всі 5-метилцитозові залишки прочитуються як цитозини, якими вони і лишаються, а неметильовані цитозини перетворюються на тиміни. Хоча завершення проекту «Епігеном людини» займе тривалий час, можна очікувати, що у ході його виконання буде отримана цікава інформація. Передбачувано, що деякі регіони ДНК будуть мати однаковий або дуже схожий патерн метилювання у всіх типах

клітин. Такі послідовності мають включати повтори та мобільні генетичні елементи (МГЕ), які колись потрапили у геном та репресуються за допомогою метилювання ДНК. Важлива інформація буде отримана стосовно генів, які активні у одному типі клітин та неактивні у іншому.

Іншим великим проектом, результати якого було опубліковано у 2012 році, є Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) (Рис 1.5). Метою даного проекту було визначення всіх функціональних елементів у геномі людини. При цьому під **функціональними елементами** розуміють дискретні сегменти геному, які кодують певні продукти (білки або некодуючі РНК), або характеризуються певними біохімічними властивостями, наприклад, зв'язуванням з конкретними білками або певною структурою хроматину. Більш детально про результати проекту буде йти мова у інших розділах.

Еукаріотичний транскриптом. Було помічено, що розмір та густина інтронів (та. як стало зрозуміло пізніше, і міжгенних ділянок ДНК) підвищуються зі збільшенням складності організму. У 1994 році Маттік (Mattick) передбачив, що інтрони повинні еволюціонувати у напрямку збільшення кількості *транс*-регуляторних РНК. Він стверджував, що деякі гени еволюціонують таким чином, що експресується або тільки інтронні, або тільки екзонні регуляторні РНК, і така система регуляції за допомогою РНК є важливою передумовою появи складних організмів. Згодом розвиток технологій секвенування РНК дозволив продемонструвати, що на десятках тисяч локусів ссавців експресуються довгі транскрипти, які не несуть інформацію про білок та можуть локалізуватися у міжгенних проміжках, інтронах або бути антизмістовними до кодуючи ділянок. Такі попередні дані були підтверджені у рамках результатів, отриманих в ході проекту ENCODE. Зокрема, було виявлено, що більшість послідовностей (принаймні 80%) генома людини та мишей диференційно транскрибуються у одному чи іншому контексті. У інших дослідженнях на різних організмах було отримано подібні результати. Отже, на сьогоднішній день зрозуміло, що більшість міжгенних

ділянок та інтронів транскрибуються та розмір транскриптому залежить від складності організму.

Слід зазначити, що не всі реальні транскрипти сьогодні вдається виявити існуючими методами. Крім того, багато транскриптів не поліаденілюються та являють собою великий клас різноманітних РНК, роль у розвитку організмів деяких з яких підтверджена експериментально. Більше того, близько 95% сайтів початку транскрипції в геномі людини не асоційовані з транскрипцією мРНК як такою, але вони повязані з транскрипцією неполіаденільованих некодуючих РНК. Ці не поліаденільовані транскрипти більшою мірою не охарактеризовані з причини застосування класичних підходів до дослідження РНК з використанням поліаденільованого хвоста для видалення рРНК зі зразків РНК.

РОЗДІЛ 2. ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ЕПІГЕНЕТИЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ

Усі клітини тіла людини вміщають один і той самий набір ДНК, який походить лише з однієї єдиної клітини при заплідненні. Саме тонко налагоджені епігенетичні механізми сприяють формуванню складного візерунку шляхів, необхідних для забезпечення нормального розвитку організму, та стабільній регуляції відповідних патернів експресії генів у різних типах клітин. Епігенетичні механізми визначають різницю у генній експресії клітин, які мітотично діляться без зміни початкової послідовності ДНК. Ці механізми відповідно регулюються великою кількістю білків, які ідентифікують, зчитують та знімають специфічні епігенетичні модифікації, за допомогою чого визначають, де і коли буде мати доступ до первинної послідовності ДНК машинерія транскрипції, що забезпечує нормальноий ріст та диференціацію клітин у ембріоні, який розвивається. Всі ці процеси успішно відбуваються внаслідок узгодженої взаємодії декількох типів епігенетичних міток, які визначають експресію відповідних генів. До таких міток належать метилювання динуклеотидів CpG у ДНК, ковалентні модифікації гістонових білків, некодуючі РНК та інші додаткові механізми, які відповідають за організацію хроматину у клітинному ядрі (Рис.2).

Деякі епігенетичні мітки є стабільними у конкретних тканинах, тоді як інші демонструють пов’язану з розвитком пластичність. Епігенетичні зміни або «епімутації», які виникають внаслідок низки різноманітних механізмів, можуть призводити до багатьох патологічних станів. На епігенетичні мітки впливають як генетичні, так і середовищні фактори, формуючи фенотипові варіації від «нормального фенотипу» і до захворювань людини. Було показано, що фактори оточення, такі як материнське харчування та використання допоміжних репродуктивних технологій, впливають на епігеном ембріону. Деякі епігенетичні зміни, пов’язані з материнським харчуванням у зародковий період

життя, зберігаються до повноліття, імовірно спричиняючи порушення з пізнім початком, такі як серцево-судинні захворювання та діабет 2 типу.

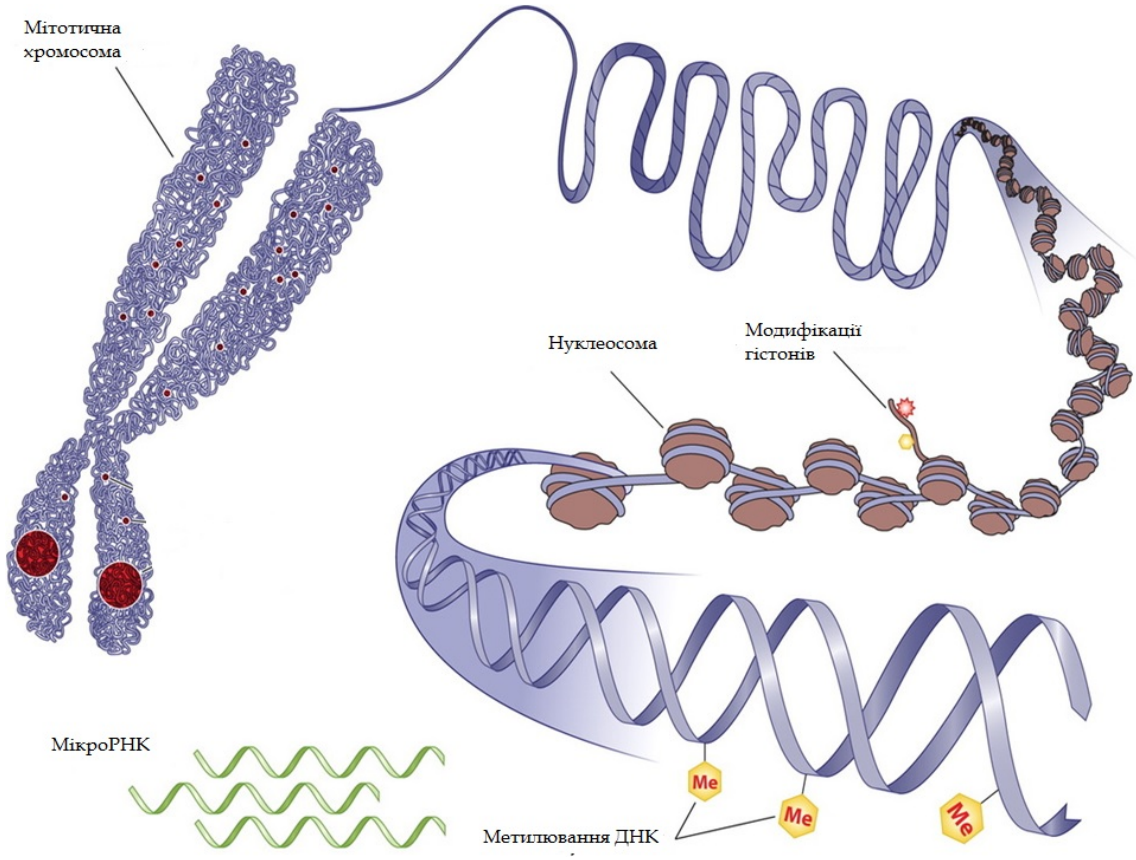


Рис. 2. Основні епігенетичні механізми (відтворено зі змінами http://aboutepigeneticwiping.weebly.com).

Як вже було зазначено, метилювання ДНК, модифікації гістонів та некодуючі РНК є незалежними механізмами, проте важливо вказати, що між цими різними епігенетичними мітками існує взаємозв’язок в процесі регуляції епігеному.

2.1. МЕТИЛЮВАННЯ ДНК

Як відзначалося вище, у 1975 році були незалежно опубліковані дві ключові роботи, в яких висувалося припущення, що метилювання цитозинових залишків у послідовності динуклеотиду CpG може служити епігенетичною міткою у хребетних тварин. У цих статтях автори висловили припущення, що

послідовності ДНК можуть бути метильовані *de novo* і таке метилювання може спадкуватися у поколіннях соматичних клітин завдяки механізму, який активує фермент, що впізнає напівметильовані паліндроми CpG. Присутність метильної групи здатна розпізнаватися ДНК-зв'язуючими білками, а метилювання ДНК безпосередньо визначає репресію генів. Хоча пізніше окремі ключові положення були визнані не точними, загалом зв'язок між метилюванням ДНК промоторів генів та їх репресією (сайленсингом) виявився справедливим.

Більшість робіт на тваринах були зосереджені на дослідженні метилювання 5-метилцитозину (5-methylcytosine; 5mC) у контексті послідовності CpG. Метилювання інших послідовностей, яке широко поширене у рослин та грибів, було тільки нещодавно описане у ссавців і досліджене не так повно. Слід відмітити, що функції такого метилювання поза послідовністю CpG у ссавців залишаються невизначеними, тому даний розділ буде присвячений переважно метилюванню ДНК у контексті послідовності CpG.

Для з'ясування **функцій метилювання ДНК** необхідно розглянути розподіл метильованих послідовностей у геномі. Більше половини генів у геномах хребетних тварин містять короткі (від 200 пн до кількох кілобаз) CpG-збагачені регіони, які відомі як **CpG-острівці** (CpG islands; CGIs), інша ж частина геному зазвичай збіднена на послідовності CpG. Вважається, що втрата геномних CpG відбувається шляхом дезамінування метильованих послідовностей у клітинах зародкового шляху, оскільки 5mC може перетворюватись на тимін завдяки спонтанному або ферментативному дезамінуванню. Вважається, що CGIs не піддаються дезамінуванню через те, що вони імовірно ніколи не бувають (або тільки тимчасово бувають) метильовані у зародковій лінії. CGIs зазвичай розміщені у промоторах генів домашнього господарства, які активно транскрибуються, і генах-супресорах пухлин, та неметильовані у диференційованих клітинах. І, навпаки, CGIs неактивних генів переважно метильовані у таких клітинах (рис 2.1.1). До недавнього часу, багато робіт по метилюванню ДНК фокусувались саме на CGIs у **сайтах початку транскрипції** (transcriptional start sites; TSSs).

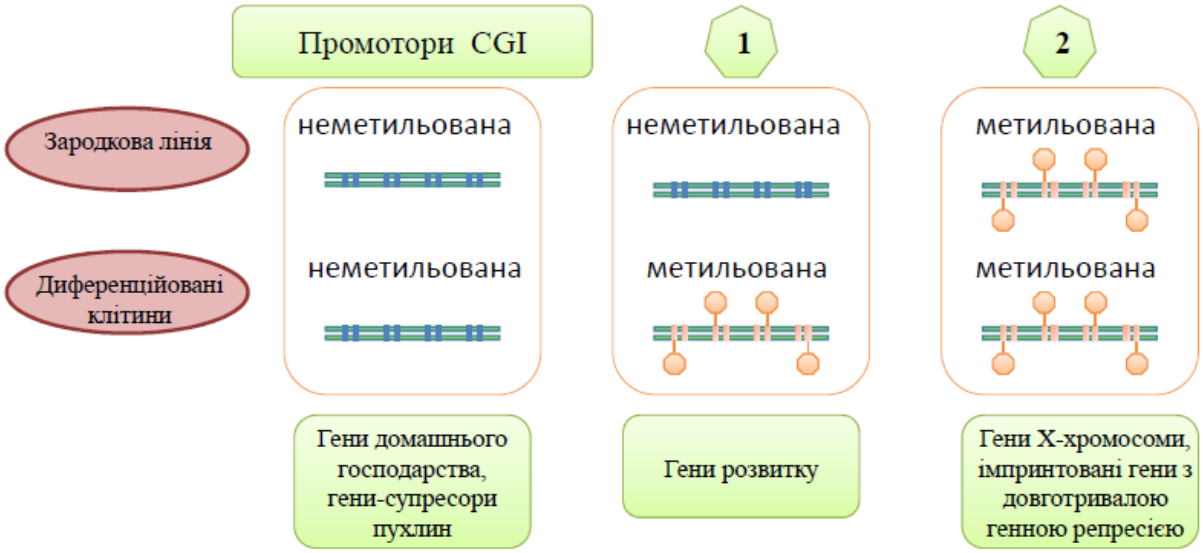


Рис 2.1.1. Схематичне зображення метилювання промоторів різних генів у різних типах клітин.

Сучасні підходи, які включають повногеномні дослідження **метилому**, наприклад, з використанням бісульфітної обробки ДНК (що дозволяє детектувати 5mC та гідрометилцитозин), наголошують, що розміщення метильованого нуклеотиду у транскрипційній одиниці визначає його вплив на регуляцію гена. Наприклад, метилювання у безпосередній близькості до TSS призводить до блокування ініціації транскрипції, але метилювання кодуючої частини гена не має такого ефекту, а може навіть стимулювати елонгацію транскрипції. Крім того, існують нові докази, які вказують на можливість впливу метилювання кодуючої частини гена (gene body) на його сплайсинг. Метилювання послідовностей, які повторюються, таких як центромери, відіграє важливу роль у стабільності хромосоми (наприклад, при розділенні хромосом в мітозі) та також, вірогідно, у пригніченні експресії мобільних генетичних елементів (МГЕ), тим самим відіграючи роль у стабілізації геному. Роль метилювання у зміні активності енхансерів, інсуляторів та інших регуляторних елементів тільки починає усвідомлюватись. Хоча існують беззаперечні докази того, що метильовані CGIs та TSSs пов’язані з неактивним станом генів, вибір часу метилювання *de novo* стосовно сайленсингу генів тільки починають з’ясовувати.

Функції метилювання ДНК пов'язані з механізмами встановлення, підтримки та усунення метильних груп. Метилювання ДНК здійснюється ферментами, які називаються **ДНК-метилтрансферази** (DNA-methyltransferase; DNMT). Їх поділяють на ДНК-метилтрансферази *de novo* (у ссавців DNMT3A та DNMT3B), які встановлюють метильні групи на взагалі неметильованій ДНК, та підтримуючі (DNMT1 у ссавців), які встановлюють метильні групи на напівметильованій ДНК (метильований лише один з ланцюгів) (Рис 2.1.2).

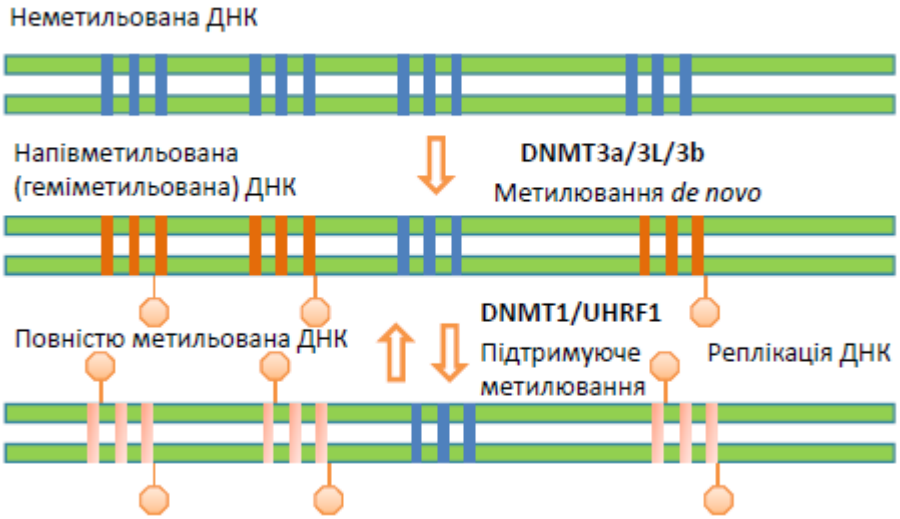


Рис. 2.1.2. Схема встановлення та підтримання метилювання ДНК.

Досить давно відомо, що дані ферменти (включаючи метилтрансферази *de novo*) необхідні для створення патерну метилювання ДНК під час раннього розвитку організму. Проте залишалось дискусійним як саме *de novo* метилтрансферази впізнають місця майбутнього метилювання. Розуміння цих процесів було суттєво покращено завдяки усвідомленню того, що субстратом для них є нуклеосомна ДНК, та що модифікації гістонів у нуклеосомі суттєво впливають на здатність цих ферментів виконувати метилювання *de novo* (Рис 2.1.3). Раніше вважалося, що DNMT1 безпосередньо може підтримувати встановлений патерн метилювання ДНК (Рис. 2.1.4), але зараз вже зрозуміло, що це не так, оскільки постійна участь DNMT3A та DNMT3B необхідна не тільки для встановлення, але і для підтримання метилювання. Крім того, функціонування кожної з трьох метилтрансфераз необхідно для ембріонального

та неонатального розвитку, а повна відсутність метилювання несумісна з життям як соматичних, так і ракових клітин, тоді як на життєздатність ембріональних стовбурових клітин (ЕСК) це не впливає. Нещодавно було продемонстровано, що DNMT3A необхідна для диференціації кровотворних стовбурових клітин, що також свідчить про фундаментальну роль 5mC у диференціації клітин хребетних тварин. Час метилювання ДНК *de novo* в процесі репресії генів досі є предметом дискусій.

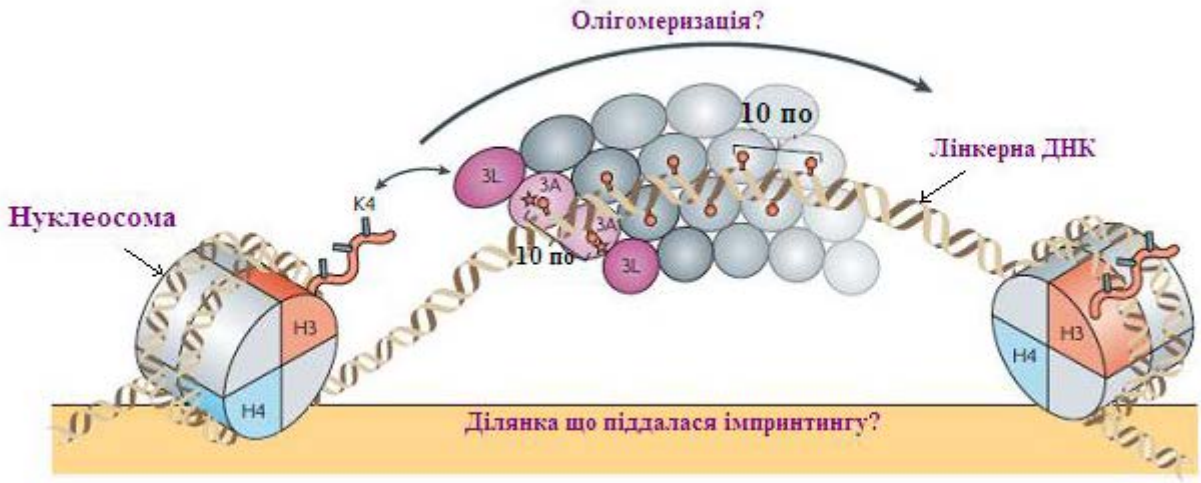


Рис. 2.1.3. Модель залучення машинерії метилювання ДНК *de novo* за участі неметильованого лізину 4 (К4) гістону Н3 (відтворено зі змінами з Law and Jacobsen, 2010). *N-кінцевий домен DNMT3L (на малюнку зображена як 3L) взаємодіє з неметильованими H3K4, що призводить до активації DNMT3A (зображена як 3A). Білки DNMT3L та DNMT3A формують тетрамерний комплекс. Червоними зірочками позначені активні сайти метилювання, які розміщені приблизно на відстані одного витка спіралі один від одного (тобто приблизно 10 по). Після рекрутування до цільового сайту відбувається олігомеризаія комплексу.*

Метилювання ДНК *de novo*, як припускали ще Ріггс, Холідей та П'ю, не є основним шляхом **сайленсингу генів**. Справа в тому, що для встановлення задовільного стану подальшої експресії гену 5mC повинні підлягати деметилюванню завдяки процесам, пов‘язаним з активним або пасивним

усуненнями метильних груп. Пошук ДНК деметилаз був достатньо довгим та сповненим багатьох фальстартів, але на сьогодні вже широко визнано, що такі ферменти дійсно існують.

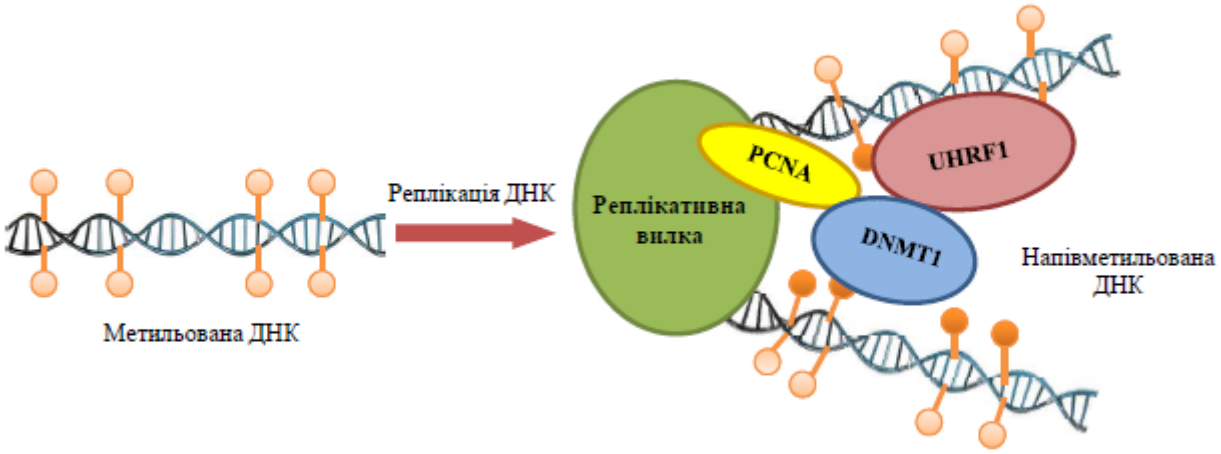


Рис. 2.1.4. Модель, яка описує підтримуюче метилювання CpG у тварин (відтворено зі змінами з Law and Jacobsen, 2010). *DNMT1 рекрутується до ре плікативної вилки за рахунок взаємодії з UHRF1 (Ubiquitin-like with PHD and Ring finger domains 1), який здатен зв'язуватись з напівметильованою ДНК, та з PCNA (Proliferating cell nuclear antigen). Після рекрутування DNMT1 метилює другий ланцюг ДНК, перетворюючи геміметильований стан у повністю метильований.*

У низці публікацій було продемонстровано, що у диференційованих клітинах активне деметилювання може відбуватись, але скоріше за все воно є лишень етапом входження клітини в процеси поділу та репарації ДНК, ніж самостійним процесом. Крім того, було продемонстровано, що такі ферменти, як **TET** (ten-eleven translocation; TET), **метилцитозин діоксигеназа, індукована активацією цитидин дезаміназа** (activation-induced cytidine deaminase; AID) та **тимін ДНК-глікозилаза** (thymine DNA glycosylase; TDG) залучені до активного (Рис. 2.1.5) та пасивного деметилювання та активації генів. Дійсно, інактивація TET3 призводить до відсутності деметилювання сайтів CpG у ключових генах розвитку, таких як *Oct4* (*Octamer-4* також відомий як *Pou5f1;* транскрипційний фактор, який бере участь у самовідновленні

ембріональних стовбурових клітин; широко використовується як маркер недиференційованих клітин) або *Nanog* (основний фактор плюрипотентності, забезпечує статус ембріональних стовбурових клітин) у батьківському геномі, що призводить до затримки ембріонального розвитку.

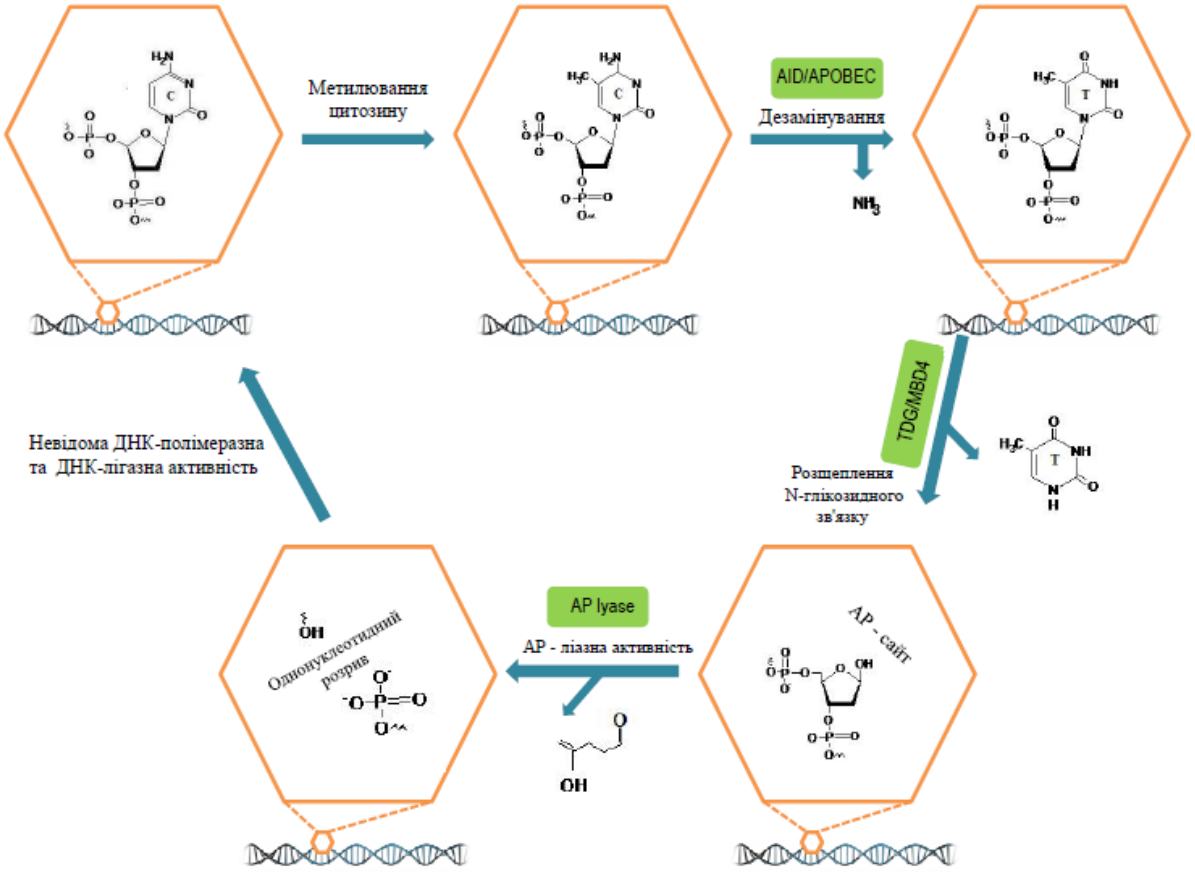


Рис. 2.1.5. Активне деметилювання у тварин за участі ДНК-глікозилазної активності та шляху репарації азотистих основ (відтворено зі змінами з Law and Jacobsen, 2010).

Метилювання сайтів початку транскрипції

Особливості TSSs, які містяться в CpG-острівцях. Більшість CGIs у соматичних клітинах перебувають у неметилованому стані. За умови розташування сайтів старту транскрипції генів, які активно експресуються, в CGIs, їх промотори зазвичай характеризуються збідненими на нуклеосоми регіонами (nucleosome-depleted regions; NDRs). В свою чергу NDRs часто

фланковані нуклеосомами, які містять різновид гістону H2A.Z та марковані триметилюванням гістону H3 у положенні лізин 4 (H3K4me3) (Рис.2.1.6). Відомо, що рівні експресії генів контролюються транскрипційними факторами. Промотори, які містять CGI, інактивуються із залученням різноманітних механізмів, зокрема, завдяки репресії, опосередкованій **білками групи Polycomb**. Наприклад, гени, які кодують головні регулятори ембріонального розвитку, такі як *myogenic differentiation 1* (MYOD1) або *paired box 6* (PAX6), інактивуються комплексом Polycomb у ембріональних стовбурових та диференційованих клітинах. Вище згадані гени характеризуються наявністю нуклеосоми у районі TSS, в якій гістон H3 модифікований до H3K27me3, що зазвичай пов'язано з інактивацією генів.

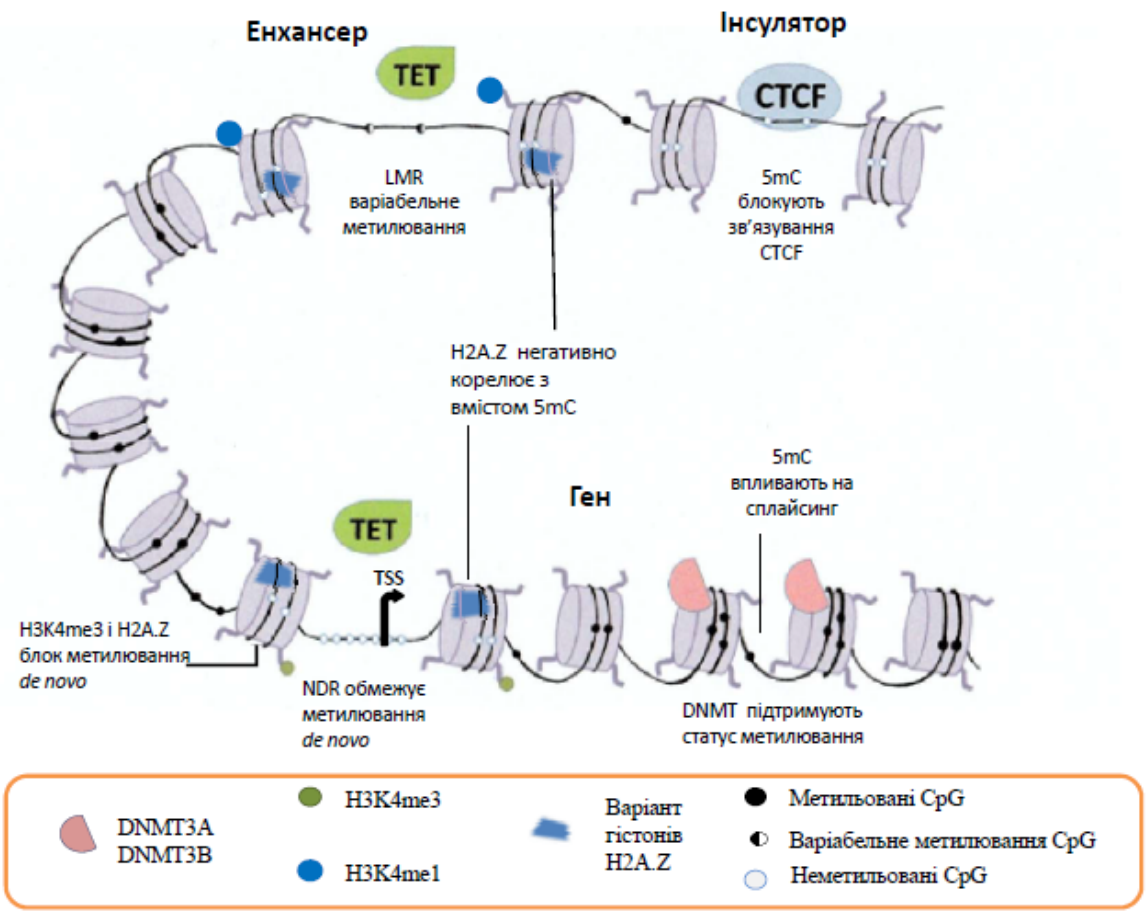


Рис. 2.1.6. Роль метилювання CpG у регуляції експресії генів (відтворено зі змінами з Jones, 2012).

В той же час, у промоторах деяких репресованих генів наявні метильовані CpG-острівці. Така ситуація притаманна генам, які довгий час перебувають у репресованому стані. Наприклад, імпринтовані, розміщені в інактивованій X хромосомі та гени, які експресуються виключно у генеративних клітинах. Така стабілізація репресованого стану метилюванням CGIs у промоторах може тривати протягом 100 років життя (наприклад, у рослин) та не впливає на існування самих CGIs, оскільки будь-які події дезамінування цих послідовностей у соматичних клітинах не передаються через генеративні тканини наступному поколінню.

Особливості метилювання TSSs поза CpG-острівцями. На відміну від TSSs, які містяться у CGIs, рівні метилювання CpG-збіднених промоторів значно варіюють. TSS генів з такими промоторами, які експресуються у первинних статевих клітинах, є неметильованими. Ті гени, які експресуються виключно у ЕСК або тканино-специфічно, часто демонструють метилювання у сперматозоїдах, але не в яйцеклітинах або соматичних клітинах. Відомо, що гени, які кодують транскрипційні фактори OCT4 та NANOG, необхідні для підтримання недиференційованого стану стовбурових клітин. Недавні дослідження свідчать, що промотори OCT4 та NANOG можуть зазнавати активного деметилювання за допомогою AID та/або TET3. В той же час деякі тканино-специфічні гени демонструють метилювання у сперматозоїдах та ЕСК та деметильовані тільки у певних тканинах, в яких вони експресуються.

Метилювання та ініціація транскрипції. То який все ж таки існує зв’язок між метилюванням ДНК та ініціацією транскрипції? Наявні неспростовні докази того, що точки старту транскрипції, які містяться в метильованих CGIs, не можуть ініціювати транскрипцію після того, як ДНК компактизується за допомогою гістонів. Питання першочерговості сайленсингу чи метилювання ДНК, проте, довгий час залишається відкритим. Ще ранні експерименти Льока (Lock) зі співавторами чітко показали, що метилювання гену *Hprt* у

інактивованій Х-хромосомі відбувається після інактивації самої хромосоми. Іншими словами, метилювання, яке вважається замикачем, насправді лише підтримує раніше сайленсований стан генів Х-хромосоми. Більшість CGIs в аутосомних генах залишаються неметильованими у соматичних клітинах. Невелика кількість цих острівців (<10%), метилюється у нормальних тканинах та клітинах, проте час метилювання *de novo* відносно сайленсингу детально не досліджений. Як зазначалося вище, нещодавні дослідження стосовно ролі DNMT3A у диференціації стовбурових клітин кісткового мозку піднімають питання стосовно універсальності довгострокової «моделі замикача». У згаданій роботі показано визначальну роль метилази у диференціації короткоживучих типів клітин. Таким чином, цілком можливо, що роль метилювання ДНК в ініціації цього процесу не обмежується лише сайленсингом.

Повногеномні дослідження, здійснені на тканинах пухлин, показали, що гени з CGIs у промоторах, які вже сайленсовані комплексом Polycomb, більш часто, ніж інші, піддаються метилюванню. Цей факт свідчить на користь того, що принаймі у випадку з білками Polycomb, репресія генів передує їх метилюванню. Ці дані свідчать про неоднозначну роль метилювання в регуляції експресії генів. Крім того, виявлено тканино-специфічні зміни у фланкуючих послідовностях CpG-острівців. Проте наслідки таких модифікацій ще не до кінця зрозумілі. Дані щодо часу метилювання ДНК відповідають ідеї метилювання, яке надає додаткового рівня стабільності епігенетичному стану. Цікаво, що метилювання практично відсутнє у низки видів, включаючи *Drosophila melanogaster* та дріжджі.

Зв'язок між транскрипцією та метилюванням de novo. У піонерській роботі Ооі (Ooi) з співавторами показали, що процес метилювання *de novo* у клітинах, які експресують DNMT3L (що є каталітично неактивним гомологом DNMT3A та DNMT3B), відбувається за допомогою тетрамерного комплексу, який складається з двох молекул кожної метилтрансферази (DNMT3A2 та

DNMT3L), і його функціонування потребує наявності нуклеосоми. Так, відомо, що активні TSSs збіднені на нуклеосоми, а отже, на цих ділянках відсутні умови для метилювання *de novo*. Раніше було показано, що у дистальному енхансері гену *OCT4* та промоторі гену *NANOG* під час диференціації з'являється перша нуклеосома, що в свою чергу призводить до рекрутування DNMT3A на цю нуклеосому та наступного метилювання *de novo*.

Крім того, у цій роботі було показано, що метилювання *de novo* не відбувається, якщо гістони нуклеосоми модифіковані у положеннях H3K4me2 та H3K4me3, які асоційовані з активними генами. І взагалі, нуклеосоми, які фланкують збіднений на них сайт початку транскрипції, часто містять модифікацію гістона H3K4me3 та варіант гістону H2A.Z. Обидва варіанти гістонів характерні для ділянок з відсутністю метилювання ДНК. Наявність H3K4me3 у мишей, можливо, підтримується присутністю білку CXXC finger protein 1 (CXXC1; також відомий як CFP1). Цей білок залучає метилтрансферазу H3K4 у певний регіон, таким чином розпізнаючи нуклеосоми, які фланкують ключову нуклеосому з відповідними модифікаціями гістонів та містять несумісні з метилюванням *de novo* мітки. Крім того, неметильований стан CpG-острівців також забезпечується присутністю білка TET1, який було знайдено у великій кількості TSSs у промоторах з високим вмістом CpG. Передбачають, що білок TET1 перетворює будь-які 5mC у цьому регіоні на 5-гідроксиметилцитозин. Отже, структура активних CGIs забезпечує їх підтримання у неметилованому стані.

Звичайно, не всі гени з промоторами, які містять CGIs, експресуються в ембріональних стовбурових клітинах, оскільки декотрі з них супресуються комолексом Polycomb. Постає питання, чому ж вони не метилюються *de novo*? Відповідь на це запитання імовірно лежить у тому факті, що такі промотори містять антагоністичні модифікації H3K4me3 та H2A.Z і також пов'язані з білком TET1, що й забезпечує відсутність у цих регіонах 5mC. Припускається, що цей захист відсутній у випадку імортализації, а CGIs стають дуже чутливими

до метилювання *de novo,* і така чутливістю зростає ще більше при подальшій онкологічній трансформації.

Згідно з даною моделлю, чим вищим є рівень експресії, тим менш імовірне метилювання *de novo* CGIs у промоторі. На підтвердження цього положення існують беззаперечні докази, а саме у випадках моноалельного метилювання CGIs метилюється переважно той алель, рівень експресії якого нижчий. Наприклад, показано, що алель гену *MLH1*, який містить однонуклеотидну заміну у промоторі та є менш активним порівняно з більш поширеними алелями, у експериментах по трансфекції частіше зазнає метилювання у соматичних клітинах представників сімей з онкологічними хворобами. З іншого боку, є приклади і того, що менш активний алель з більшою імовірністю зазнає метилювання *de novo.* Альтернативний сценарій описаний у випадку алеля гену *RIL* (також відомого як *PDLIM4*), який характеризується поліморфізмом у промоторі, що створює додатковий сайт зв'язування для транскрипційного фактора SP1 або SP3, передбачає меншу ймовірність метилювання *de novo*, ніж алелі, яким цей поліморфізм не притаманний. Додаткові сайти для SP1, тим самим, забезпечують резистентність цього алелю до метилювання *de novo*. Продемонстровано також, що вказаний ген з додатковими сайтами зв'язування транскрипційних факторів не демонструє підвищення рівня експресії.

Метилювання кодуючої частини гена

Більшість кодуючих послідовностей генів збіднені на CpG, але, не дивлячись на це, вони метильовані та інколи містять повтори і навіть мобільні генетичні елементи (МГЕ). Метилювання сайтів CpG у екзонах – основний чинник виникнення транзицій C→T, які реалізовуються у мутації. У гермінативній тканині такі мутації призвлодять до захворювань, а у соматичних клітинах - до онкологічних перероджень. Як вказувалося вище, CGIs розташовуються у промоторах генів, крім того їх знайдено у кодуючих послідовностях генів та у міжгенних проміжках. Незважаючи на те, що їх

функції залишаються невідомими, відомий генетик Адріан Бьорд (Adrian Bird) висловив припущення, що ці регіони можуть являти собою послідовності, які слугували промоторами (orphan promoters) та могли використовуватись на ранніх етапах розвитку та не метилювались у зародковій лінії, саме тому у них підтримується високий вміст CpG.

Метилювання кодуючої частини генів та відсутність репресії їх активності. Відомо, що метилювання кодуючої частини гена (gene body) притаманне послідовностям, які транскрибуються. Висока позитивна кореляція між активною транскрипцією та метилюванням кодуючої частини гена була показана для генів Х-хромосоми за допомогою бісульфітного секвенування геномів рослин та тварин з використанням методу «дробовика» (shotgun sequencing). Більшість кодуючих частин генів не містять CGIs, а у випадку, коли CGIs розташовані у середині генів, вони, загалом, вважалися неметильованими. Однак, нещодавно продемонстровано, що майже 34% всіх внутрішньогенних CGIs метильовані у клітинах тканин головному мозку людини. Роль цього метилювання, яке є тканино-специфічним, до кінця ще не з'ясовано. Прикметно ще й те, що TSSs у таких випадках переважно залишаються неметильованими. Крім того, показано, що внутрішньогенні CGIs є сайтами метилювання *de novo* у ракових клітинах.

Метилювання CGIs у кодуючій частині гена не призводить до блокування елонгації транскрипції незважаючи на те, що метильовані CGIs марковані H3K9me3 та асоційовані з білком MECP2 (methyl-CpG-binding protein 2), які за умови присутності у TSSs є ознаками хроматину з репресованою транскрипцією. Описана ситуація виглядає парадоксальною, оскільки метилювання промоторів обернено корелює з транскрипцією, тоді як метилювання кодуючи послідовностей генів позитивно корелює з нею. Отже, у ссавців чутливою до сайленсингу, спричиненого метилюванням ДНК, є ініціація транскрипції, але не її елонгація. На відміну від ссавців, у грибів виду *Neurospora crassa* метилювання цитозину у контексті CpG або інших

послідовностей блокує саме елонгацію транскрипції, але не її ініціацію. Тому можна стверджувати, що не сама по собі присутність 5mC впливає на процес транскрипції, а більше контекст в якому він знаходиться.

Можливі функції метилювання кодуючої частини гена. Яка ж функція метилювання кодуючої частини гену, яка не містить CGIs? Спочатку вважалося, що метилювання головним чином є механізмом сайленсингу елементів ДНК, які повторюються, таких як ретровіруси, елементи *LINE1*, *Alu*-елементи та інші, і блокує ініціацію транскрипції цих елементів, допускаючи транскрипцію гену-хазяїна.

Також було висловлено припущення, що сам процес елонгації транскрипції може стимулювати метилювання ДНК, а модификація N-кінця гістону H3 у положенні H3K36me3, яка також асоційована з елонгацією, відповідає за залученння у цей процес ДНК-метилтрансфераз (Рис. 2.1.5). Повногеномні дослідження показали, що метилювання ДНК у кодуючій частині гена може відігравати роль у регуляції сплайсингу, оскільки екзони більш метильовані, ніж інтрони, та переходи в рівні метилювання зустрічаються на межі екзон-інтрон. Крім того, експерименти щодо позиціонування нуклеосом свідчать, що екзони містять більшу кількість нуклеосом у порівнянні з інтронами, а нуклеосомна ДНК, як відомо, часто метилюється. Показано, що зв’язування CTCF (CCCTC-binding factor; транскрипційний фактор, який залучений у проходження багатьох процесів, таких як регуляція транскрипції та регуляція інсуляторів) в конкретному сайті залежить від рівня метилювання ДНК. Оскільки таке зв’язування призводитиь до зупинки у роботі РНК-полімерази II (RNAPII), що у свою чергу запускає сплайсинг, то можна зробити висновок, що метилювання ДНК опосередковано пов’язано з процесом сплайсингу. Отже, однією з функцій метилювання кодуючої частини гену поза CGIs може бути переключення режимів сплайсингу.

Вважалося, що TSSs та кодуючі частини генів - це окремі функціональні одиниці геному. Відомо, що існують гени, які мають принаймні дві точки

старту транскрипції, при цьому одна з них знаходиться в межах транскрипційної одиниці, яка контролюється іншим. Альтернативні промотори можуть бути CGIs послідовністю, або ні, або лише один з них може являти собою вказаний острівець. Саме тому наявність альтернативних сайтів початку транскрипції ускладнює інтерпретацію результатів експериментів по визначенню зв'зку метилювання з експресією генів. Таким чином, метилювання ДНК може бути механізмом контролю альтернативного використання промоторів.

Інші регуляторні елементи та метилювання

Метилювання енхансерів. **Енхансери**, які можуть розміщуватися на різних відстанях від промоторів, є ключовими у контролі експресії генів протягом розвитку та функціонування клітин. Здебільшого вони збіднені на послідовність CpG, тому метилювання цих регуляторних сайтів досліджували за допомогою повногеномного аналізу метилювання (так званого метилому у ссавців та рослин). Загалом у цих регіонах спостерігається тенденція до досить варіабельного метилювання. Стадлер (Stadler) зі співавторами при вивченні енхансерів у геномі мишей припустили, що ці регіони є **«регіонами з незначним метилюванням»** (low-methylated regions; LMRs) (Рис 2.1.6). Оскільки конкретний цитозин може бути або метильованим або ні, то у випадку динуклеотиду CpG один з цитозинів може бути метильованим, а комплементарний гуаніну - ні. Наслідком цього є те, що метилювання сайтів CpG являє собою динамічний процес, оскільки ферменти метилювання та деметилювання конкурують за них. Одночасно це призводить до того, що статус метилювання кожного CpG не може безпомилково підтримуватися протягом поділу клітини, саме тому LMRs можуть формуватися внаслідок помилок у спадкуванні. Наприклад, у різних підтипах Т-клітин виявлена велика кількість **диференційно метильованих регіонів** (differentially methylated regions; DMRs), які належать до енхансерів генів диференціації. З точки зору

функції, метилювання сайтів CpG може призводити до зниження активності енхансерів при застосуванні методу репортерних генів (reporter assay).

Висновок про вплив метилювання конкретного енхансера на його функцію грунтується на вивченні білків, які визначають метилювання/деметилювання цих регіонів. Проте, звя'зок між метилюванням CpG та зв'язуванням транскрипційних факторів дуже складний, тому остаточне розуміння цих процесів потребує подальших досліджень.

Метилювання в межах інсуляторних послідовностей. **Інсулятори** - це елементи геному, які блокують взаємодію енхансера та промотора. Найбільш дослідженим прикладом визначенння послідовностей ДНК, які розташовуються між двома інсуляторами є зв'язування білка CTCF, який має спорідненість до різних нуклеотидних послідовностей. Відомо, що зв'язування CTCF в межах імпринтованого локуса *IGF2–H19* контролює взаємодію енхансера та промотора цих генів. Метилювання сайту зв'язування CTCF у цьому локусі блокує зв'язування білка, таким чином регулюючи роботу локусу (Рис. 2.1.6). Також показано, що зв'язування CTCF з 5 екзоном гена, який кодує білок CD45, інгібується метилюванням ДНК, впливаючи на сплайсинг. Дослідження стовбурових та диференційованих клітин у мишей продемонструвало, що в межах регіонів, бідних на CpG, метилювання не впливає на зв'язування CTCF з регіонами цими послідовностями, хоча, можливо, що саме зв'язування призводить до локального деметилювання. З урахуванням вищесказаного постає питання щодо існування загальних правил впливу метилювання в сайтах зв'язування CTCF на його взаємодію з ними. Так, хоча існує сім потенційних сайтів зв'язування CTCF у промоторі гена *H19* людини, лише один з них демонструє залежне від батьків метилювання.

Метилювання ДНК та механізми інактивації промоторів

Механізми інактивації CGI-промоторів за допомогою метилювання ДНК добре досліджені. Як відомо, метильований промотор характеризується

наявністю нуклеосом у районі TSS, які несуть репресивну мітку H3K9me3. Ця мітка стабілізується білками, які зв'язуються з метильованою ДНК, що призводить, у свою чергу, до рекрутування у регіон деацетилаз гістонів.

Питання впливу метилювання на експресію генів з промоторами без CpG-острівців залишається відкритим. Оскільки транскрипційні фактори можуть зв'язуватись з метильованими послідовностями ДНК, що, в свою чергу, може призводити до пасивного деметилювання цих регіонів, залишається не зрозумілим, чи зміни в метилюванні є результатом зв'язування цих факторів, або, навпаки, таке зв'язування призводить до стабілізації транскрипційно неактивного стану. Однак метилювання регіонів без CpG-острівців може мати і прямий вплив на зв'язування транскрипційних факторів з сайтами-мішенями. Наприклад, зв'язування білка MYC зі спорідненою послідовністю інгібується присутністю 5mC, але такий результат не встановлено при зв'язуванні SP1. Повногеномні дослідження показали, що метилювання CpG у певних сайтах впливає на зв'язування транскрипційних факторів з ними, однак конкретних механізмів такого взаємозв'язку поки що встановити не вдалося. Наприклад, показано, що у ЕСК людини майже завжди не відбувається зв'язування OCT4 з сайтом-мішенню, коли існує метилювання ДНК у межах 100 пн з обох боків від послідовності-мішені. Однак, якщо сайт-впізнання OCT4 не містить CpG, механізм інгібування такого зв'язування залишається не зрозумілим.

Підсумовуючи вищевикладене, сформулюємо основні положення щодо метилювання у ссавців, як вже остаточно з'ясовані, так і такі, що потребують подальшого пояснення.

Отже, встановлено, що:

- Більшість CpG-острівців неметильовані, коли вони розміщені у точках початку транскрипції (TSS).
- Метилювання CGI у TSS пов'язано з довготривалим сайленсингом гену (наприклад, інактивація X хромосоми, геномний імпринтинг,

репресія генів, які експресуються тільки у зародковій лінії, та тканино-специфічних генів).

- CGIs у межах кодуючої послідовності гена також інколи тканино-специфічно метилюються.
- Метилювання послідовностей, в яких CpG острівців відсутні, є більш динамічним та більш тканино-специфічним за метилювання CGIs.
- Метилювання блокує ініціацію транскрипції, але не блокує її елонгацію (проте у грибів *N. crassa* описано протилежний взаємозв'язок).
- Метилювання МГЕ інактивує ці елементи, але не впливає на функціонування генів хазяїна в сусідніх нуклеотидних послідовностях.
- Метилювання кодуючої послідовності гена сприяє виникненню соматичних та генеративних мутацій, які можуть призводити до онкологічних захворювань.

Потребує подальних досліджень:

- Вплив метилювання у вільних від CGIs послідовностях на активність генів.
- Функції метилювання у контексті CHG тринуклеотидів (де H – це A, C або T).
- Роль активного та пасивного деметилювання у активації генів.
- Функції «берегового» («shore») метилювання.
- Чи впливає метилювання послідовностей гену на сплайсинг його продуктів?
- Роль 5-гідроксиметилювання нуклеотидних послідовностей в клітинах головному мозку та інших тканин.
- Роль метилювання у функціонуванні енхансерних та інсуляторних елементів.
- Що первинно, сайленсинг чи метилювання?

2.2. ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНІ МОДИФІКАЦІЇ ГІСТОНІВ

Відтоді як на початку 1960-х років вийшла піонерська робота Вінсента Олфрі, добре відомо, що гістони підлягають пострансляційним модифікаціям. Вже описано велику кількість різноманітних **посттрансляційних модифікацій гістонів** (ПТМ) (Рис. 2.2.1). Розуміння того, як модифікації впливають на структуру хроматину, прийшло з розкриттям структури нуклеосоми у 1997 році за допомогою рентгено-структурного аналізу (the high-resolution X-ray structure). Ці роботи засвідчили, що (високо)-основні (highly basic) **N-термінальні амінокислотні хвости** гістонів виходять зі своїх нуклеосом та контактують з компонентами сусідніх нуклеосом.

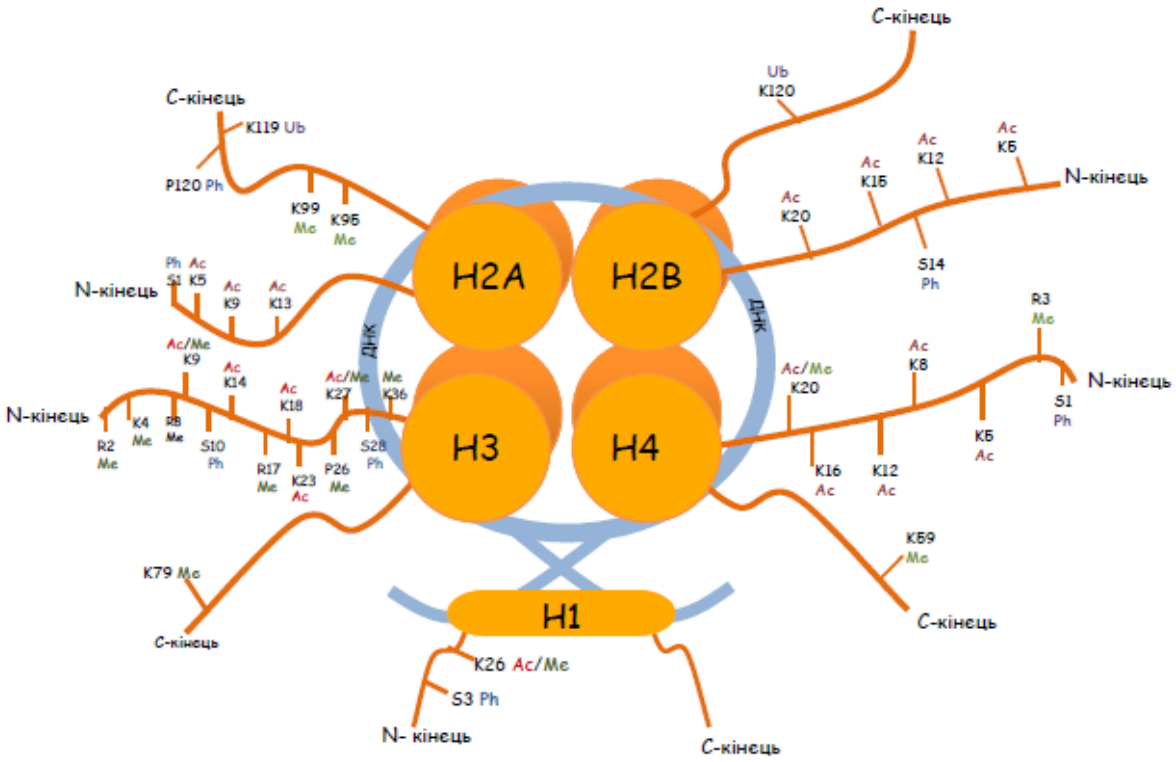
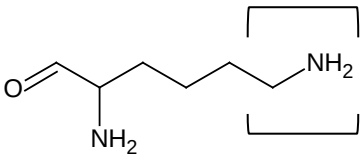
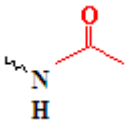
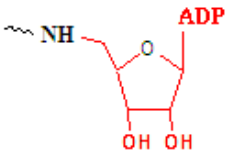
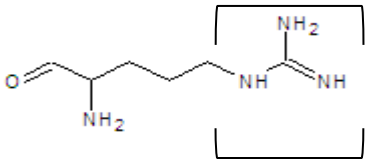


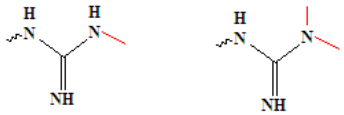
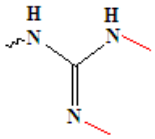
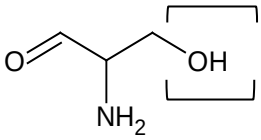
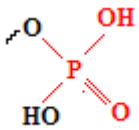
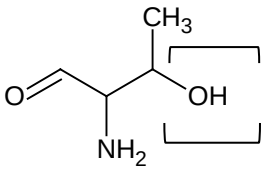
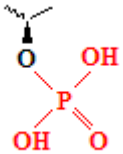
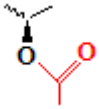
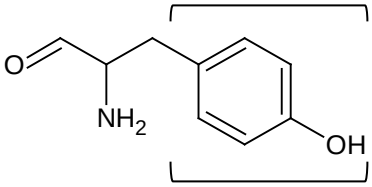
Рис.2.2.1. Посттрансляційні модифікації гістонів.

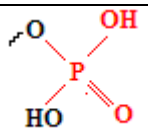
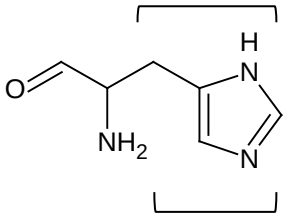
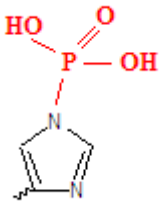
Зрозуміло, що модифікування цих хвостів впливатиме на міжнуклеосомні взаємодії, а це, в свою чергу, призводитиме до зміни структури хроматину в цілому. Модифікації не тільки самі по собі змінюють структуру хроматину, вони здатні також рекрутувати ремодулюючі білки, які використовують

енергію гідролізу АТФ для репозиціювання нуклеосом. Вважається доведеним, що модифікації білків напряму пов’язані з їх функціями. Модифікації хвостів гістонів впливають на транскрипцію, а також на інші процеси, пов’язані з репарацією, реплікацією та рекомбінацією ДНК (Таблиця 2.2.1).

Таблиця 2.2.1. **Посттрансляційні модифікації гістонів (за Rothbart and Strahl, 2014)**

Модифікація	Структура	Функції	Зв’язуючі домени
Лізин		• Регуляція активності генів	PHD,ADD,WD40
Метилювання	me 1 me2 me3	• Регуляція активності генів • Репарація ДНК Реплікація ДНК • Формування гетерохроматина	Chromo, PHD, Tudor,MBT, ZF-CW, PWWP, ADD Ankyrin Repeats, WD40, BAH
Ацетилювання		• Регуляція активності генів • Структура хроматину	Bromo, PHD
Сумоілювання	Поліпептид масою 11 кДа, Вторинна структура схожа на убіквітин. С-кінцевим Gly зв’язується з ε-аміногрупиою лізину	• Регуляція активності генів	?
ADP-рибозилювання		• Регуляція активності генів • Репарація ДНК • Формування гетерохроматина	PAR
Убіквітинування	Поліпептид масою 8,5 кДа, С-кінцевим Gly зв’язується з ε-аміногрупиою лізину	• Регуляція активності генів • Репарація ДНК • Формування гетерохроматина	?
Аргінін		• Регуляція активності генів	PHD

Метилювання	 me1 me2a  me2s	• Регуляція активності генів	Tudor, WD40, ADD
Серин			
Фосфорилювання		• Регуляція активності генів • Репарація ДНК • Формування мітотичних хромосом	BRCT, 14-3-3
Ацетилювання		?	?
Глікозилювання	β -N-ацетилглюкозамін (O-GlcNAc)	• Регуляція активності генів	?
Треонін			
Фосфорилювання		• Формування мітотичних хромосом	BIR
Ацетилювання		?	?
Глікозилювання	β -N-ацетилглюкозамін (O-GlcNAc)	• Регуляція активності генів	?
Тирозин			
Ацетилювання		?	?

Фосфорилювання		• Регуляція активності генів	?
Гістидин			
Фосфорилювання		• Регуляція активності генів	?

Ацетилювання гістонів

Ацетилювання гістонів вперше було описано у 1964 році Олфрі зі співавторами. З того часу було продемонстровано, що **ацетилювання лізинів** є надзвичайно динамічним та регулюється двома родинами ферментів – **гістон-ацетилтрансферазами** (histone acetyltransferases; HATs) та **гістон-деацетилазами** (histone deacetylases; HDACs). HATs використовують як кофактор ацетил-CoA та забезпечують переміщення ацетильної групи на ε-аміно групу бічного ланцюга лізину. В результаті цього нейтралізується позитивний заряд лізину, а це в свою чергу призводить до послаблення зв'язку між гістонами та ДНК. Існує два головних класи HATs: А-типу та В-типу. Гістон-ацетилтрансферази В-типу - це здебільшого цитоплазматичні ферменти, які ацетилюють вільні гістони, але не ті, які входять до складу нуклеосом, тобто є компонентами хроматину. До цього класу HATs входять надзвичайно консервативні ферменти, які мають часткову гомологію з білком scHat1 (*S. cerevisiae* Hat1), основним представником цього типу HATs. HATs В-типу ацетилюють новосинтезовані гістони Н4 у положеннях К5 та К12 (так само, як і такі ж сайти у гістоні Н3). Цей специфічний патерн ацетилювання дуже важливий для транспортування гістонів, а в нуклеосомному комплексі така мітка відсутня.

Гістон-ацетилтрансферази А-типу являють собою більш різноманітну родину ферментів, ніж В-типу (Таблиця 2.2.2). Однак їх можна розділити принаймні на три окремі групи білків в залежності від гомології амінокислотних послідовностей та конфірмаційної структури: GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferases), MYST (назва походить від перших літер членів родини MOZ, YBF2, SAS2 та TIP60) та CBP/p300 (CREB-binding protein). Кожен з цих ферментів модифікує декілька сайтів у межах N-термінального хвоста гістонів. Одночасно це призводить до нейтралізації позитивного заряду, що в свою чергу порушує стабілізуючі електростатичні взаємодії, і цей вплив позитивно корелює з функціонуванням вказаних ферментів у комплексах транскрипційних коактиваторів. Однак у таку регуляцію залучені не тільки гістонові хвости, у глобулярному гістоновому ядрі присутні додаткові сайти ацетилювання, такі як H3K56, який ацетилюється у людини, зокрема, за допомогою hGCN5 (одна з ацетилтрансфераз людини). Те, що мітка H3K56 бічного ланцюга орієнтована у великий жолобок ДНК, свідчить, що ацетилювання може впливати на взаємодії гістонів та ДНК. Така ситуація нагадує ефект ацетилювання лізинів N-кінцевих хвостів гістонів. Цікаво, що порушення роботи HAT p300 призводить до втрати ацетилювання H3K56, що свідчить про те, що лізин під номером 56 також може бути сайтом ацетилювання і для p300. Проте одночасно це призводить до збільшення кількості пошкоджень ДНК, на відміну від нокдауну GCN5, що в свою чергу може непрямо впливати на рівень ацетилювання H3K56.

HATs А-типу разом з багатьма гістон-модифікуючими ферментами часто формують великі мультибілкові комплекси. Білки, які входять до складу таких комплексів, відіграють важливу роль у контролі залучення, активності та субстратної специфічності ферментів. Наприклад, очищені scGCN5 ацетилюють вільні гістони, але не ті, які входять до складу нуклеосом. Коли ж scGCN5 є компонетом так званого **комплексу SAGA** (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase), він ацетилює саме нуклеосомні гістони.

Таблиця 2.2.2. **Характеристика гістонових ацетилтрансфераз типу А**

Родина HAT	**HAT (і комплекси асоційовані з ними)**	**Гістони, які ацетилюються**	**Взаємодія з іншими HAT**
GNAT	GCN5 (SAGA, ADA, A2) PCAF (PCAF) HAT1 (HATB) ELP3 (elongator) HPA2	H3, H2B H3, H4 H4, H2A	p300, CBP p300, CBP
MYST	ESA1 (NUA4) MOF (MSL) SAS2 SAS3 (NUA3) MORF TIP60 HBO1 (ORC)	H2A, H4 H4 H3 H3, H4	
p300/CBP	p300 CBP		PCAF, GCN5 PCAF, GCN5

Ферменти HDACs мають протилежний HATs ефект та деацетилюють лізини N кінцевих хвостів гістонів. Це потенційно стабілізує локальну компактну конформацію хроматину, а отже HDACs є головним чином репресорами транскрипції. Виділяють чотири класи HDACs: класи I та II включають ферменти, які найбільш близькі до дріжджових білків scRpd3 та scHda1 відповідно, до класу IV належить тільки один представник (HDAC11), тоді як білки III класу (відомі як **сіртуїни**) гомологічні дріжджовим scSir2 (Sirtuin) (Таблиця 2.2.3). Білки останнього класу, на відміну від інших, для свого функціонування потребують кофактор - NAD^+.

Загалом HDACs самі по собі мають низьку субстратну специфічність, а отже здатні ацетилювати численні сайти гістонів. Розуміння механізмів рекрутування та специфічності цих ферментів додатково ускладнюється тим, що ці білки зазвичай є компонентами різних комплексів, часто разом з іншими представниками класу. Наприклад, HDAC1 була виявлена разом з HDAC2 у комплексах NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase), Sin3a (комплекс, який відповідає за репресію транскрипції генів за рахунок деацетилювання гістонів) та Co-REST ([co]repressor for element-1-silencing transcription factor). Тому дуже важко ідентифікувати, які саме компоненти або особливості HDAC (та/або

комплексів, до складу яких вони входять) відповідальні за ефект специфічності. Хоча деякі відомості щодо цього є, відомо, зокрема, що HDAC1, але не HDAC2, контролює диференціацію ембріональних стовбурових клітин.

Таблиця 2.2.3. **Характеристика гістонових деацетилтрансфераз**

Родина HDAC	**Фермент**	**Організм**	**Білки безпосередньо або опосередковано асоційовані з HDAC-комплексами**
RPD3-like	RPD3, HOS1-3 RPDA, HOSA dHDAC1-3 HDA1-3 HDm HDAC1-3 HDAC7, 8 RPD3/HD1-B	Дріжджі *Aspergillus* Дрозофіла *C.elegans* *Xenopus laevis* Курка, ссавці Курка, ссавці Кукурудза	Sin3, Rbap, SAP, MAD, MAX, NCoR, SMRT, Mi2, MTA2, MBD3, MeCP1, MeCP2, Ikaros, UME6, Ski, p53, HPV, E7, PcG, YY1, LIM, Hunchback, Groucho, LAZ3, PLZF, BRCA1, HDAC4, HDAC5
HDA1- like	HDA1 dHDA2 mHDA1, 2 HDAC4-6	Дріжджі Дрозофіла Миші Людина	HDAC3, MEF2A, NCoR, SMRT
HDA2-подібні	HD2	Рослини	Гомополімер HD2-p39
SIR2- like NAD-залежні	SIR2 SIR2-гомолог	Дріжджі Миші	Sir3, Sir4, Net 1

Фосфорилювання гістонів

Як і ацетилювання гістонів, їх фосфорилювання є дуже динамічним. Воно здебільшого стосується **серину, треоніну та тирозину**, але може відбуватися і на інших амінокислотах N-кінцевих хвостів гістонів. Рівень цього типу модифікацій контролюється **кіназами** та **фосфатазами**, які відповідно приєднують та видаляють фосфатну групу.

Всі відомі гістонові кінази переносять фосфатну групу з АТФ на гідроксильну групу бічного ланцюга конкретної амінокислоти. Внаслідок цього з’являється суттєвий негативний заряд на гістоні, і це, врешті решт, справляє вплив на структуру хроматину. За допомогою чого кіназа залучається на потрібний сайт у хроматині досі залишається нез'ясованим для більшості ферментів даного типу. У деяких випадах, що підтверджено прикладом ферменту ссавців MAPK1 (Mitogen-activated protein kinase 1), кіназа містить

власний ДНК-зв'язувальний домен, за допомогою якого вона приєднується до ДНК. Це може бути достатнім для специфічного рекрутування, як у випадку транскрипційних факторів, які безпосередньо зв'язуються з ДНК. Рекрутування може потребувати і асоціації з фактором, який вже зв'язаний з хроматином, перед тим, як він безпосередньо буде контактувати з ДНК для стабілізації загальної взаємодії.

Більшість сайтів фосфорилювання гістонів лежить у межах N-кінцевих хвостів. Проте також існують і амінокислоти у корових регіонах гістонів, які підлягають такій модифікації. Прикладом може бути, зокрема, H3Y41, за яку відповідальна нерецепторна тирозин кіназа JAK2. Функція фосфорилювання станом на сьогоднішній день ще мало зрозуміла. Оскільки фосфорилювання гістонів являє собою дуже динамічний процес, можна передбачити наявність високої фосфатазної активності в ядрі. Відомо, наприклад, що фосфатаза PP1 працює антагоністично до Aurora B, кінази, яка відповідає за фософрилювання H3S10 та H3S28 у мітозі у всьому геномі.

Метилювання гістонів

Метилювання **лізинів та аргінінів** в гістонах здебільшого відбувається по бічним ланцюгам цих амінокислот. На відміну від ацетилювання та фосфорилювання, метилювання не змінює заряд гістонових білків. Модифікація лізину у цьому випадку може полягати у його моно-, ди- або три-метилюванні, тоді як аргініну - у моно-метилюванні, а також симетричному або асиметричному диметилюванні.

Метилювання лізину. Першою ідентифікованою **гістон-лізин-метилтрансферазою** (histone lysine methyltransferase; HKMT) була SUV39H1 (suppressor of variegation 3-9 homolog 1), субстратом якої є H3K9. З того часу було ідентифіковано низку HKMTs, більшість з яких метилюють лізин у межах N-кінцевого хвосту гістонів. Всі HKMTs, які модифікують лізини у N-кінцевому хвості, містять так званий SET-домен (від Su[VAR]3-9, enhancer-of-

zeste, thritorax), який має ферментативну активність, однак, фермент Dot1, який метилює H3K79 у глобулярній коровій частині гістону, не містить вказаного домену. Чому цей фермент структурно відрізняється від інших, не відомо, проте, можливо, це пояснюється проблематичністю доступності його субстрату H3K79. У будь-якому випадку, всі HKMTs відповідають за перенесення метильної групи з S-аденозилметіоніну (S-adenosylmethionine; SAM) на ε-аміногрупу лізину.

HKMTs притаманна висока специфічність (Таблиця 2.2.4). Так, фермент DIM5 у аскоміцета *N. crassa* специфічно метилює H3K9, тоді як H3K4 є субстратом вже для іншого білка, SET7/9. DIM5 здатна триметилювати H3K9, тоді як SET7/9 може спричиняти тільки монометилювання H3K4. Ці відомості були отримані лише щодо очищених ферментів, а отже, здатність розрізняти різні лізини гістонів, а також різні стани їх метилювання є специфічною властивістю цих ферментів. Як було з'ясовано за допомогою рентгеноструктурної кристалографії, ключова амінокислота усередині каталітичного домену ферменту визначає, чи потрібно ферменту продовжувати свою активність після утворення монометильованого продукту. У фермента DIM5 ключовим є фенілаланін (F281) усередині лізин-зв'язуючого активного центру, в якому можуть розміщуватись всі метильовані форми лізину, що у такий спосіб дозволяє ферменту створювати три-метильовані продукти. На відміну від цього, SET7/9 має тирозин (Y305) у відповідній позиції, тому у його активному центрі можуть розміщуватись тільки моно-метильовані продукти. У експериментах по мутагенезу було продемонстровано, що заміна F281 у складі DIM5 на тирозин повертає ферменту монометилтрансферазну активність, тоді як реципрокна мутація у SET7/9 (Y305 на F) надає ферменту здатність до триметилювання субстратів. Загалом, чергування амінокислот (Y або F) є механізмом, який широко використовується у HKMTs з SET-доменами для контролю ступеня метилювання.

Метилювання аргініну. Відомо два класи **аргінін-метилтрансфераз**: ферменти I та II типу. Ферменти I типу генерують Rme1 (monomethylarginine) та Rme2as (asymmetric dimethylarginine), тоді як метилтрансферази II типу - Rme1 та Rme2s (symmetric dimethylarginine). Разом два типи аргінін-метилтрансфераз складають відносно велику родину білків (11 представників), представники якої відомі як PRMTs (protein arginine methyltransferase). Всі ці ферменти переносять метильну групу з SAM до ω-гуанідинової групи аргініну у складі різноманітних субстратів. Метилювання аргінінів у складі гістонів виконується ферментами PRMT1, 4, 5 та 6.

Таблиця 2.2.4. **Гістон-метилтрансферази**

Аміно-кислота	*Homo sapiens*			*Drosophila melanogaster*			*Caenorhabditis elegans*		
	me3	**me2**	**me1**	**me3**	**me2**	**me1**	**me3**	**me2**	**me1**
		CARM1(a) PRMT6(a) PRMT5(s) PRMT7(s)	CARM1 PRMT6 PRMT5 PRMT7						
H3K4	SETD1A SETD1B ASH1L MLL MLL2 MLL3 MLL4 SMYD3 PRMD9	SETD1A SETD1B MLL MLL2 MLL3 MLL4 SMYD3	SETD1A SETD1B ASH1L MLL MLL2 MLL3 MLL4 SETD7	ASH1 SET1	TRX TRR SET1	TRX TRR	SET-2 SET-16		
H3R8		PRMT5(s)	PRMT5						
H3K9	SUV39H1 SUV39H2 SETDB1 PRDM2	SUV39H1 SUV39H2 SETDB1 G9a EHMT1 PRDM2	SETDB1 G9a EHMT1 PRDM2	SU(VAR)3-9 Eggless	SU(VAR)3-9 Eggless	Eggless	MES-2 SET-9 SET-26	MET-2	
H3R17		CARM1(a)	CARM1						
H3R26		CARM1(a)	CARM1						
H3K27	EZH2 EZH1	EZH2 EZH1		E(Z)	E(Z)		MES-2	MES-2	
H3K36	SETD2	NSD3 NSD2 NSD1 SMYD2	SETD2 NSD3 NSD2 NSD1	SET2	MES4		MET-1	MES-4	

		SETD2							
H3K79	DOT1L	DOT1L	DOT1L	DOT1L	DOT1L	DOT1L			
H4R3		PRMT1(a) PRMT6(a) PRMT5(s) PRMT7(s)	PRMT1 PRMT6 PRMT5 PRMT7					PRMT-1	PRMT-1
H4K20	SUV420H1 SUV420H2	SUV420H1 SUV420H2	SETD8	SUV4-20	SUV4-20	PRSET7			

І лізин-, і аргінін-метилтрансферази мають характерні великі сайти каталітичної активності, що відрізняє цю широку групу метилтрансфераз від інших SAM-залежних ферментів. Цікаво, що SAM-зв’язуючий активний центр знаходиться з одного, зовнішнього боку, тоді як пептидил-акцепторний канал розміщений з іншого боку білка. Це означає, що молекула SAM та гістоновий білок зв’язуються фе рментом одночасно з різних боків. Більш того, такий спосіб зв’язування субстратів може забезпечувати можливість розробки препаратів, які будуть здатні дискримінувати гістонові аргінін/лізин метилтрансферази від інших метилтрансфераз, наприклад, ДНК-метилтрансфераз.

Гістон-деметилази. Протягом довгого часу метилювання гістонів вважалося стабільною модифікацією. Згодом було експериментально продемонстровано, що існує низка сигнальних шляхів, які відповідають за деметилювання і лізинів, і аргінінів. Спочатку було виявлено можливість перетворення аргініну на **цитрулін** в результаті реакції деімінізації як спосіб усунення метильної групи. Незважаючи на те, що цей шлях не є безпосереднім деметилюванням, описаний механізм продемонстрував оборотність метилювання. В подальшому було описано реакцію, яка відповідальна за деметилювання аргініну. Так, було показано, що білок JMJD6 (Jumonji Domain Containing 6) здатний виконувати реакцію деметилювання у сайтах гістонів H3R2 та H4R3.

У 2004 році було ідентифіковано першу **лізин-деметилазу**, яка отримала назву лізин-специфічна деметилаза I (lysine-specific demethylase 1; LSD1)

(Таблиця 2.2.5). Було встановлено, що вона використовує FAD (флавинадениндинуклеотид) у якості кофактора. Реакція деметилювання потребує протонованого нітрогену, тому сумісним субстратом для неї може бути тільки моно- або диметильований лізин. *In vitro* очищена LSD1 каталізує видалення метильної групи з H3K4me1/2 вільного гістону, але вона не може деметилювати такий самий сайт, якщо він входить до комплексу нуклеосоми. Тим не менш, якщо LSD1 є компонетом комплексу Co-REST (гістон-деацетилазний комплекс), вона набуває здатності деметилювати гістони у складі нуклеосом. Отже, згаданий комплекс забезпечує LSD1 здатність впізнавати її субстрат в комплексі білків нуклеосоми. Більш того, саме конкретний склад компонентів комплексу і визначає, який лізин буде деметилюватися за допомогою LSD1. Як вже було зазначено, LSD1 у складі Co-REST деметилює H3K4me1/2, проте у комплексі з андрогеновим рецептором він деметилює H3K9. Таким чином, зміна компонентів комплексу, які взаємодіють з LSD1, виконує функцію перемикання її активності з репресорної на коактиваторну.

Таблиця 2.2.5. **Гістон-деметилази**

Аміно-кис-лота	*Homo sapiens*			*Drosophila melanogaster*			*Caenorhabditis elegans*		
	me3	**me2**	**me1**	**me3**	**me2**	**me1**	**me3**	**me2**	**me1**
H3R2									
H3K4	KDM2B KDM5A KDM5B KDM5C KDM5D NO66	KDM1A KDM1B KDM5A KDM5B KDM5C KDM5D NO66	KDM1A KDM1B KDM5B NO66	LID	SU(VAR)3-3 LID	SU (VAR)3-3	RBR-2	LSD-1 SPR-5 AMX-1 RBR-2	LSD-1 SPR-5 AMX-1
H3K9	KDM3B KDM4A KDM4B KDM4C	KDM3A KDM3B KDM4A KDM4B KDM4C KDM4D PHF8 KDM1A	KDM3A KDM3B PHF8 JHDM1D	KDM4B			JMJD2	KDM7A JMJD-1.1	KDM7A JMJD-1.1

	KDM4D	JHDM1D							
H3K27	KDM6A KDM6B	KDM6A KDM6B JHDM1D	JHDM1D				UTX-1 JMJD-3.1	KDM7A UTX-1 JMJD-3.1	
H3K36	NO66 KDM4A KDM4B KDM4C	KDM2A NO66 KDM2B KDM4A KDM4B KDM4C	KDM2A KDM2B	KDM4B KDM4A	KDM4B KDM4A		JMJD-2		
H4K20			PHF8						

Пізніше було відкрито ще один клас лізин-деметилаз. Важливо, що певні ферменти цього класу здатні до три-деметилювання лізинів. Вони застосовують відмінний від LSD1 каталітичний механізм, використовуючи Fe(II) та α-кетоглутарат як кофактор та радикал-атакуючий механізм (radical attack mechanism). Першим ідентифікованим ферментом триметил-лізин-деметилаз був JMJD2 (Jumonji Domain Containing 2), який деметилює H3K9me3 та H3K36me3. Ферментативна активність JMJD2 визначається наявністю домену джуманджи JmjC (jumonji domain). На сьогоднішній день відомо багато гістонових лізин-деметилаз, і, за виключенням LSD1, вони всі мають домен джуманджи. Як і лізин-метилтрансферази, деметилази мають високий рівень субстратної специфічності стосовно їх цільового лізину. Вони також чутливі до ступеню метилювання лізину. Наприклад, деякі ферменти здатні деметилювати тільки моно- або ди-метильні субстрати, тоді як інші деметилюють лізини з усіма трьома ступенями метилювання.

Інші модифікації

Деімінація. Реакція включає хімічну модифікацію аргініну, яка призводить до утворення цитруліну. У клітинах ссавців ця реакція каталізується ферментом пептидил-деіміназою PADI4, який перетворює пептидил-аргініни на цитруліни. Один з очевидних ефектів цієї реакції полягає в тому, що в результаті нейтралізується позитивний заряд аргініну, оскільки

цитрулін нейтральний. Також є докази, що PADI4 перетворює моно-метил-аргінін на цитрулін, а отже, функціонує як деметилаза. Проте на відміну від «справжніх» деметилаз, реакція за участю PADI4 не призводить до відновлення аргініну.

β-N-ацетилглюкозамін. Багато негістонових білків модифікуються по бокових ланцюгах серинів та треонінів одиничним цукровим залишком β-N-ацетилглюкозаміном (β-N-acetylglucosamine; O-GlcNAc). Нещодавно і гістони ввійшли до довгого списку O-GlcNAc-модифікованих білків. Цікаво, що у клітинах ссавців було виявлено тільки один фермент, O-GlcNAc-трансферазу, який каталізує перенесення цукру з донорного субстрату, UDP-GlcNAc, на цільовий білок. Як і інші модифікації гістонів, O-GlcNAc справляє враження дуже динамічного процесу з високим рівнем оберненості. Як у випадку прямої реакції, виявлено лише один фермент, здатний усувати цукор, β-N-ацетилклюкозамінідаза (β-N-acetylglucosaminidase; O-GlcNAcase). Сьогодні було показано модифікування O-GlcNAc лише гістонів H2A, H2B та H4.

ADP рибозилювання. Відомо, що гістони можуть моно- або полі-ADP-рибозилюватися по залишках глутамату та аргініну, але відносно мало відомо стосовно функцій цієї модифікації. Показано, що така модифікація є оберненою. Наприклад, полі-ADP-рибозилювання гістонів здійснюється родиною білків полі-ADP-рибоз-полімераз (poly-ADPribose- polymerase; PARP), а зворотна реакція – родиною білків полі- ADP-рибоз-глікогідролазами (poly-ADP-ribose-glycohydrolase). Ці ферменти разом контролюють кількість полі-ADP-рибозильованих гістонів, які характерні для відносно релаксованого стану хроматину. Можливо, це наслідок, принаймні частково, негативного заряду, який ця модифікація надає гістонам. Крім того, було продемонстровано, що активація PARP-1 призводить також до підвищення рівня ацетилювання корових гістонів. Рибозилювання деметилази гістона H3K4me3, KDM5B, опосередковане PARP-1, інгібує цю деметилазу та призводить до її дисоціації з

хроматином. Одночасно з цим процесом відбувається вилучення гістону H1, що робить доступним цільовий промотор та призводить до активації гену.

Моно-ADP-рибозилювання гістонів здійснюється за участю моно-ADP-рибозилтрансфераз, і було описано для всіх чотирьох корових гістонів та лінкерного гістона H1. Рівень цієї модифікації значно зростає на пошкоджених ділянках ДНК, що свідчить про її роль у сигнальному шляху відповіді на пошкодження ДНК.

Убіквітинування та сумоілірування. Всі описані вище модифікації гістонів призводять до відносно незначних молекулярних змін у радикалах амінокислот. На відміну від них, у результаті убіквітинування відбувається набагато суттєвіша ковалентна модифікація. Сам по собі **убіквітин** являє собою поліпептид довжиною 76 амінокислот, який приєднується до лізину у складі білка за рахунок послідовних дій трьох ферментів: активуючого E1, коньюгуючого E2 та лігуючого E3. Ферментативні комплекси визначають як субстратну специфічність (який саме лізин є цільовим), так і ступінь убіквітинування (наприклад, моно- або поліубіквітинування). Для гістонів вважається більш притаманним моноубіквітинування, хоча точні сайти модифікування залишаються невизначеними. Проте добре охарактеризовано два сайти, розташовані у гістонах H2A та H2B. H2AK119ub1 бере участь у сайленсингу генів, тоді як H2BK123ub1 відіграє важливу роль у ініціації та елонгації транскрипції. Не дивлячись на те, що убіквітинування це значна модифікація, вона є дуже динамічною. Убіквітин видаляється ізопептидазами, які є ферментами де-убіквітинування, а їх функція важлива як для активування генів, так і для їх сайленсингу.

Сумоілірування – подібна до убіквітинування модифікація, суть якої полягає в ковалентному приєднанні подібних до убіквітину невеликих молекул до лізинів гістонів за допомогою ферментів E1, E2 та E3. Сумоілірування відомо для всіх чотирьох типів корових гістонів та, як вважається, функціонує як антагоніст ацетилювання та убіквітинування, які можуть відбуватися на тому

самому бічному ланцюзу лізину. Отже, воно повинно бути пов'язано переважно з репресією хроматину, проте з'язування молекулярних механізмів цих процесів потребує подальших досліджень.

Видалення хвостів гістонів. Можливо, найбільш радикальним способом зняття модифікацій гістонів є видалення їх N-кінцевого хвосту, який, власне, і модифікується. Цей процес було названо **видаленням хвосту гістону (histone tail clipping)**. Він був вперше описаний у 1980 році у інфузорії *Tetrahymena*, у яких видаляються крайні шість амінокислот гістону H3. Проте, на сьогоднішній день стало очевидно, що цей процесс також існує у дріжджів та ссавців (мишей), у яких видаляються перші 21 амінокислоти гістону H3. У дріжджів протеолітичний фермент, який видаляє амінокислоти, залишається неідентифікованим, але показано, що процес видалення хвоста гістону залучений у регуляцію транскрипції. У мишей протеолітичний фермент (Cathepsin L) відрізає N-кінець гістону H3 під час диференціації ембріональних стовбурових клітин.

Ізомеризація проліну у складі гістонів. Наявність двогранного кута у пептидил-проліновому хімічному зв'язку забезпечує можливість переключення між його цис- та транс конформаціями, станами, які відрізняються на 180º. **Пролін-ізомерази** полегшують такі взаємоперетворення, які потенційно можуть впливати на конформацію білка. Однією з пролінових ізомераз є фермент дріжджів scFpr4, який ізомеризує H3P38. Його активність пов'язана з метилюванням H3K36, імовірно через те, що scFpr4 впливає на впізнавання K36 метилтрансферазою scSet2 та деметилазою scJMJD2, хоча точні механізми вказаних процесів залишаються невідомими. Цей приклад є ілюстрацією того факту, що ізомеризація проліну є важливою модифікацією хвостів гістонів. Однак цей процес не є справжньою ковалентною модифікацією, оскільки фермент лише змінює орієнтацію кута пептидного зв'язку на 180º, тим самим створюючи хімічні ізомери, а не ковалентно модифіковані продукти.

Механізми впливів модифікацій гістонів

Модифікації гістонів реалізують свій вплив, використовуючи два головних механізми. Перший - це безпосередній вплив (як короткостроковий, так і довгостроковий) модифікацій гістонів на загальну структуру хроматину. Другий - це вплив на регуляцію (як позитивну, так і негативну) зв'язування ефекторних молекул. Модифікації гістонів залучені у регуляцію транскрипції та інші процеси, які відбуваються за участю ДНК, такі, як репарація, рекомбінація та реплікація. Далі розглядатимемо переважно вплив модифікацій гістонів на транскрипцію, проте, його основні принципи актуальні і для інших процесів.

Прямі структурні перетворення. Ацетилювання та фосфорилювання гістонів ефективно знижують позитивний заряд гістонів, що потенційно дестабілізує електростатичні взаємодії між гістонами та ДНК. Імовірно, це призводить до зменшення компактизаії хроматину, тим самим полегшуючи доступність ДНК для білкової машинерії, такої, як білкові комплекси транскрипції. Нагадаємо, що ацетилювання відбувається на низці лізинів у складі хвостів гістонів, в тому числі ацетилюються H3K9, H3K14, H3K18, H4K5, H4K8 та H4K12. Така велика кількість потенційних сайтів модифікування передбачає, що у гіперацетильованих регіонах геному заряд гістонових хвостів може бути ефективно нейтралізованим, що буде справляти значний вплив на структуру хроматину загалом. Свідчення цьому можна знайти у β-глобіновому локусі (у людини до його складу входять 5 генів, які відповідають за синтез β-частини гемоглобіну), де гени розташовуються у гіперацетильованому та транскрипційно компетентному хроматиновому оточенні, про що свідчить ДНКазна чутливість цих ділянок, а отже їх загальна доступність. Енхансерні елементи та особливо промотори генів також розташовуються на нуклеосомах, хвости гістонів яких підлягають значному ацетилюванню, що, ймовірно, сприяє доступності цих регіонів для

транскрипційних факторів. Однак множинне ацетилювання гістонів не є обов'язковою передумовою змін структури, хоча гістони, які специфічно ацетильовані у положенні H4K16, справляють значний негативний ефект на формування фібрили 30 нм, принаймні *in vitro*.

Фосфорилювання гістонів переважно сайт-специфічне, і кількість таких сайтів значно менша у порівнянні з сайтами ацетилювання. Як і у випадку з H4K16ac, такі модифікації в конкретному окремому сайті можуть призводити до значної зміни структури хроматину. Наприклад, фосфорилювання H3S10 під час мітозу відбувається повногеномно та пов'язане з конденсацією хроматину. Це видається дещо нелогічним, оскільки фосфатна група надає негативного заряду гістоновому хвосту, який знаходиться у безпосередній близькості до негативно зарядженого цукро-фосфатного остову ДНК. Проте, можливо, усунення гетерохроматинового білка 1 (heterochromatin protein 1; HP1) з гетерохроматину під час метафази забезпечується рівномірно високим фосфорилюванням H3S10 та необхідно саме для відокремлення хромосом від інтерфазного скефолду (scaffold). Це буде полегшувати ремоделювання хромосом, що важливе для їх приєднання до веретена поділу.

Убіквітинування додає надзвичайно великий залишок до гістонів. Така модифікація повинна призводити до зміни загальної конформації нуклеосом, що в свою чергу буде впливати на внутрішньохромосомні взаємодії та/або взаємодії з відповідними хроматиновими комплексами. Вкорочення хвостів гістонів, а саме втрата перших 21 амінокислот гістону H3, буде мати подібний ефект. На противагу цьому, нейтральні модифікації, такі, як метилювання гістонів, навряд чи безпосередньо змінюють структуру хроматину, тому що вони не значні та не змінюють заряд гістонів.

Регуляція зв'язування факторів хроматину. Численні фактори, асоційовані з хроматином, специфічно взаємодіють з модифікованими гістонами за допомогою різноманітних доменів. Кількість ідентифікованих білків постійно зростає слідом за розвитком та використанням нових методів дослідження білків. Величезна кількість даних свідчить, що полівалентні білки

та комплекси, до складу яких входять специфічні домени, здатні одночасно впізнавати декілька модифікацій та інших ознак нуклеосом.

Варто відмітити, що для впізнання метильованих лізинів існує більша кількість різних доменів, ніж для розпізнавання інших модифікацій, що, можливо, є відображенням важливої ролі таких модифікацій (Таблиці 2.2.1). До групи таких доменів відносять домени PHD fingers та так звану родину доменів Tudor 'royal', які містить хромодомен, Tudor, PWWP та MBT домени. В цій групі доменів, які зв'язують метильовані лізини, низка доменів може розпізнавати одні й ті самі сайти модифікованих гістонових лізинів. Наприклад, H3K4me3 – мітка, асоційована з активною транскрипцією, впізнається доменом PHD fingers, який є складовою частиною білків родини ING (ING1-5). Родина білків ING в свою чергу рекрутує додаткові модифікатори хроматину, такі як HATs та HDACs. З триметильованим сайтом H3K4 можуть також зв'язуватись тамдемні хромодомени у складі білка CHD1 (АТФ-залежний ремодулюючий фермент, здатний репозиціонувати нуклеосоми) та тандемні домени Tudor у складі гістонової деметилази JMJD2A. У цих випадках H3K4me3 безпосередньо відповідає за рекрутування ферментів, які модифікують хроматин.

Наступні приклади специфічного зв'язування з метильованими лізинами обумовлені впізнаванням білком HP1 H3K9me3 – мітки, яка асоційована з репресованим гетерохроматином. HP1 зв'язується з H3K9me3 за рахунок наявності хромодомену на його N-кінці, і ця взаємодія є важливою для загальної структури хроматину. Білок HP1 димеризується завдяки здатності **хромошедоу** (chromoshadow) домену на його C-кінці формувати бівалентні сполуки, зв'язані з хроматином. Цікаво, що білок HP1 за рахунок його хромодомену також зв'язується з метильованим H1.4K26. Оскільки гістон H1.4 також залучений у процеси формування структури гетерохроматину, можна передбачити, що димери HP1 можуть об'єднувати позиційну інформацію (H3K9me3 та H1.4K26, з якими він зв'язується) таким чином, що вона сприймається як сигнал для відповідної компактизації хроматину.

З ацетильованими лізинами гістонів зв’язується **бромодомен**, який часто входить до складу HATs та комплексів ремоделювання хроматину. Наприклад, Swi2/Snf2 (switching/sucrose non-fermenting chromatin remodeling complex) ремоделюючий комплекс містить бромодомен, який і спрямовує його до ацетильованих гістонів. Після цього рекрутується ремодулюючий комплекс SWI/SNF, функціями якого є декомпактизація хроматину. Нещодавно було також продемонстровано, що і домени PHD fingers здатні специфічно впізнавати ацетильовані гістони. Білок DPF3b (Zinc finger protein DPF3), який входить до складу хроматин-ремодулюючого комплексу BAF та містить тандемні домени PHD fingers, відповідальний за рекрутування цього комплексу до ацетильованих гістонів.

Прикладом білків, які специфічно зв’язуються з фосфорильованими гістонами, є білок MDC1, який відіграє важливу роль у процесах репарації ДНК. Цей білок рекрутується до місць дволанцюгових розривів ДНК. MDC1 містить тандемні домени BRCT, які зв’язуються з гістоном γH2AX, характерного для ДНК, що містить дволанцюгові розриви і є фосфорильованим~~и~~ варіантом гістону H2A.

Модифікації гістонів можуть виступати не тільки в якості динамічної платформи для зв’язування різноманітних факторів, але й в якості руйнівників взаємодій між гістонами та факторами хроматину. Наприклад, H3K4me3 може перешкоджати зв’язуванню комплексу NuRD з N-кінцевим хвостом гістону H3. Цей механізм пояснюється тим, що комплекс NuRD є загальним репресором транскрипції, а H3K4me3 – мітка активної транскрипції. Метилювання H3K4 також запобігає зв’язуванню домену PHD finger у складі DNMT3L з хвостом гістону H3. Отже, цей варіабельний N-кінцевий хвіст гістону H3 є важливим у регуляції обох типів взаємодій, хоча регуляція відбувається не тільки завдяки модифікуванню K4. Наприклад, фосфорилювання H3T3 перешкоджає зв’язуванню з кінцем гістону H3 комплексу INHAT, який репресує транскрипцію.

Взаємозв'язки різних модифікацій гістонів. Велика кількість модифікацій гістонів дає можливість для точного контролю структури хроматину. Вищі рівні компактизації забезпечуються взаємодією між різними модифікаціями, які імовірно допомагають встановити загальний контроль. Такі взаємодії реалізуються через низку механізмів. Це, зокрема:

1) Конкурентний антагонізм між модифікаціями, якщо один і той самий сайт є мішенню для більш ніж одного способу модифікації. Це особливо справедливо для лізинів, які можуть бути ацетильованими, метильованими або убіквітинованими.
2) Одна модифікація може залежати від іншої. Наприклад, у *S. cerevisiae* транс-регуляція метилювання H3K4 за допомогою scCOMPASS та H3K79 за допомогою scDot1 повністю залежать від убіквітинування H2BK123 за допомогою scRad6/Bre1. Цей механізм є консервативним у ссавців, включаючи і людину.
3) Зв'язування білків з хвостом гістону, який має певну модифікацію, може порушуватись суміжною з нею модифікацією. Наприклад, як вже було зазначено, білок HP1 зв'язується з H3K9me2/3, проте під час мітозу таке зв'язування може порушуватись фосфорилюванням H3S10. Для того щоб регулювати зв'язування у такий спосіб, модифіковані амінокислоти не обов'язково повинні розташовуватись безпосередньо одна біля одної. Наприклад, у *Schizosaccharomyces pombe* ацетилювання H3K4 інгібує зв'язування spChp1 з H3K9me2/3.
4) На активність ферментів може впливати модифікування їх субстратів. У дріжджів пролінова ізомераза scFpr4 каталізує поворот пептидного зв'язку H3P38, що впливає на здатність ферменту scSet2 метилювати H3K36, яке пов'язане з впливом на транскрипцію генів.
5) Можлива кооперація між модифікаціями з метою ефективного рекрутування специфічних факторів. Наприклад, PHF8 специфічно зв'язується з H3K4me3 та ця взаємодія є сильнішою, коли H3K9 та H3K14 ацетильовані на цьому ж хвості гістону H3. Проте, така стабілізація зв'язування скоріше відбувається

завдяки додатковим факторам у комплексі з PHF8, ніж за рахунок прямого впливу на сам білок PHF8.

Також можлива взаємодія між модифікаціями гістонів та метилюванням ДНК. Наприклад, білок UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1) зв'язується з нуклеосомами, які несуть H3K9me3, проте, таке зв'язування значно посилюється, якщо нуклеосомна ДНК містить метильовані динуклеотиди CpG. І навпаки, метилювання ДНК може інгібувати зв'язування білків зі специфічними модифікаціями гістонів. Хорошим прикладом є KDM2A (lysine (K)-specific demethylase 2A), який зв'язується з нуклеосомами, які містять H3K9me3, та тільки у тому випадку, коли ДНК є неметильованою.

Локалізація модифікацій гістонів у геномі

Хроматин еукаріот може перебувати у двох станах. Першим є відносно декомпактизований стан хроматину, при якому він містить більшість активних генів та зазнає циклічних змін протягом клітинного циклу. Ці «відкриті» регіони також відомі як **еухроматин**. На противагу їм, інші регіони геному, такі як центромери та теломери, є відносно компактними структурами, які містять здебільшого неактивні гени та зберігають відносну стабільність протягом циклічних змін клітинного циклу. Такі більш компактні регіони відомі як **гетерохроматин**. Подібна класифікація є дуже умовною. Наприклад, нещодавно було показано, що у *D. melanogaster* існує п'ять геномних районів різних структур хроматину (зелений, блакитний, чорний, червоний та жовтий хроматин), розподіл на які базується на аналізі патернів зв'язування багатьох білків хроматину. Так, гетерохроматину відповідають зелений та блакитний типи. Зелений тип хроматину – це класичний гетерохроматин з відповідними мітками та білками, а блакитний тип – це хроматин, до складу якого входять білки групи Polycomb. До чорного типу хроматину відносяться великі ділянки геному, які є сайленсованими, проте вони можуть інколи тканино-специфічно експресуватися. Транскрипційно активними типами хроматину є жовтий та червоний. Гени, які розміщені у червоному хроматині, експресуються тканино-

специфічно, тоді як жовтий хроматин містить гени домашнього господарства. Проте, оскільки у більшості робіт брали до уваги саме простий розподіл на гетерохроматинові та еухроматинові райони, ми на ньому і будемо зупинятися.

І гетерохроматин, і еухроматин можуть бути збагачені або, навпаки, збіднені, на певні характерні модифікації гістонів. Тим не менш, не існує простих правил для визначення локалізації цих модифікацій та наявний високий ступінь перекриття між різними регіонами хроматину. Проте, ідентифіковані і ділянки, які розмежовують гетерохроматин та еухроматин. З такими «обмежувальними елементами» зв'язуються специфічні фактори, такі як CTCF, який відіграє важливу роль у підтриманні межі між різними «типами» хроматину. За відсутності таких факторів гетерохроматин буде поширюватись та сайленсувати еухроматинові регіони геному. Обмежувальні елементи збагачені на певні модифікації, наприклад, H3K9me1, та вільні від інших, таких як ацетилювання. Більше того, ці сайти сильно збагачені на особливий варіант гістону - H2A.Z. Правила роботи цих факторів, які забезпечують підтримання границь цих ділянок далекі від повного розуміння, але їх важливість є беззаперечною.

Гетерохроматин. У багатоклітинних організмів розрізняють два типи гетерохроматину: **факультативний** та **конститутивний**. До факультативнного гетерохроматину входять регіони геному, що містять гени, які диференційно експресуються протягом розвитку організму та/або диференціації і які в інший час є репресованими. Класичним прикладом такого типу хроматину є інактивована Х-хромосома, яка присутня у клітинах самок ссавців в комплексі з Polycomb (Polycomb repressor complexes; PRCs), який, як відомо, являє собою репресорні білки, та маркована H3K27me3. Така ко-локалізація пояснюється тим, що H3K27-метилтрансфераза EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) перебуває всередині тримерного комплексу PRC2. Нещодавно продемонстровано, як саме H3K27me3 та PRC2 залучаються до позиційного підтримання стану факультативного гетерохроматину під час реплікації ДНК.

H3K27me3 рекрутує PRC2 до сайтів реплікації ДНК, сприяючи підтриманню H3K27me3 за рахунок діяльності EZH2. У цьому випадку гістонова мітка поширюється на внесені *de novo* гістони та таким чином підтримується стан факультативного гетерохроматину.

У межах конститутивного гетерохроматину (райони центромери та теломери) розташовуються гени, які практично не еспресуються. Він характеризується відносно високими рівнями H3K9me3 та наявністю значної кількості HP1α/β. Як вже було сказано, димери HP1 зв'язуються з H3K9me2/3 своїми хромодоменами та взаємодіють з SUV39, головною метилтрансферазою H3K9. Під час реплікації ДНК відбувається перерозподіл модифікованих гістонів (які містять H3K9me), а також модифікація синтезованих *de novo* гістонів у реплікованому хроматині. Оскільки HP1 зв'язується з SUV39, це наводить на думку, що існує зворотній зв'язок, який забезпечує підтримання конкретного стану гетерохроматину протягом реплікації ДНК. Іншими словами, під час реплікації ДНК HP1 зв'язується з нуклеосомами, які містять H3K9me2/3-модифіковані гістони, що призводить до залучення метилтрансферази SUV39, яка, в свою чергу, метилює H3K9 на сусідніх нуклеосомах. Крім того, такий пасивний зворотний механізм пояснює, принаймні частково, динамічну природу гетерохроматину і не в останню чергу його властивість поширюватися на регіони еухроматину.

Еухроматин. На відміну від гетерохроматину, еухроматин є набагато більш декомпактизованим та містить активні гени. Тим не менше, як і у випадку з гетерохроматином, еухроматин не весь однорідний. Певні регіони збагачені на конкретні модифікації гістонів, тоді як інші відносно збіднені на ці модифікації. Загалом збагачені на модифікації ділянки мають тенденцію розміщуватись у регіонах, які відповідальні за регуляцію транскрипції або активно транскрибуються. Наприклад, транскрипційно активні енхансери містять відносно високий рівень H3K4me1, яка чітко пов'язана з цим процесом. Проте, активні гени самі по собі збагачені на H3K4me3, яка

характерна для сайтів початку транскрипції (TSS). Загалом, ділянки, які активно транскрибуються, містять багато H3K36me3 модифікацій. Механізм, за допомогою якого модифікація H3K4me1 встановлюється у енхансерах, невідомий, проте на дріжджах продемонстровано деякі деталі того, як саме метилтрансферази, які модифікують H3K4 та H3K36, залучаються у процес метилювання. Білок scSet1, який є метилтрансферазою H3K4, зв'язується з серином 5 фосфорильованого CTD (C-terminal domain) у складі ініціаторної форми РНК-полімерази RNAPII, яка розміщена у TSS. В свою чергу білок scSet2, який є метилтрансферазою H3K36, зв'язується з серином 2 фосфорильованого CTD елонгаційної форми полімерази. Отже, два ферменти рекрутуються на ДНК завдяки взаємодії з різними формами RNAPII, саме тому їх розміщення визначає, де саме модифікація буде встановлюватись.

Таким чином, загальна картина залучення ферментів модифікації у сайти їх активності далека від повного розуміння, але деякі аспекти цих процесів вже зрозумілі. Іще одним важливим аспектом проблеми гістонових модифікацій, який потребує обговорення, є те, як саме відбувається узгодження різноманітних модифікації гістонів з метою регуляції таких процесів як транскрипція. Показано, що вже згадана модифікація H3K4me3 у дріжджів відповідальна за залучення scYng1, який зв'язується за допомогою домену PHD finger цього білка. Це, в свою чергу, стабілізує взаємодію scNuA3 HAT з хроматином, що призводить до гіперацетилювання H3K14. Отже, метилювання H3K4 поєднане з ацетилюванням H3K14. В аналогічний спосіб, і знову у дріжджів, H3K36me3 рекрутує scRpd3S комплекс HDAC, який деацетилює гістони після елонгаційної RNAPII. Це важливо тому, що попереджує потенційну ініціацію транскрипції усередині кодуючих регіонів. Обидва ці приклади демонструють, як узгодження двох протилежних ферментативних активностей (HAT та HDAC) регулює активність генів у дріжджів. Однак питання концервативності цього механізму у ссавців залишається відкритим. У ссавців є докази H3K4me3-залежного рекрутування HAT, але немає доказів H3K36me3-залежного рекрутування HDAC.

У ссавців механізми, які регулюють активність певних генів, передбачають можливість залучення у ці процеси компонентів, специфічних для гетерохроматину. Наприклад, репресія регулятору клітинного циклу цикліну Е продуктом гену ретинобластоми (RB) включає рекрутування HDAC, метилювання H3K9 та HP1β. Отже, репресований стан промотора гену цикліну Е потребує локальної структури, яка нагадує конституційний гетерохроматин, а саме наявності H3K9me2/3 та HP1. Тим не менше, на відміну від конституційного гетерохроматину, це непостійна структура, яка змінюється, якщо клітина переходить з G1- до S-фази, коли ген цикліну Е активується. Отже, в еухроматині для регуляції активності генів можуть використовуватися компоненти гетерохроматину.

2.3. НЕКОДУЮЧІ РЕГУЛЯТОРНІ РНК

Некодуючі РНК (non-coding RNA; ncRNA) відіграють важливу роль **у** регуляції експресії генів. В еукаріотичному геномі транскрибується більше 75% геномної ДНК, але тільки приблизно 3% цих транскриптів кодують білки; більшою частиною це ncRNA, які можна класифікукати в залежності від розміру та функцій. На сьогоднішній день відомо багато типів регуляторних РНК, проте найбільш вивченими є малі інтерферуючі РНК (small interfering RNAs; siRNAs), мікро-РНК (microRNAs; miRNAs) та довгі некодуючі РНК (long ncRNAs; lncRNAs) (Таблиця 2.3.1). Вони відіграють важливу роль у регуляції активності генів на декількох рівнях – транскрипції, деградації мРНК, сплайсингу та трансляції, забезпечуючи наявність продуктів генів як у певному компатрменті клітини, так і у певний часовий період. ncRNA впливають на експресію генів загалом як інгібітори шляхом РНКі, тому відповідні механізми за їх участі відносять до РНК-сайленсингу. Окрім ролі у регуляції РНКі, ncRNAs беруть участь у епігенетичних механізмах, наприклад, інактивації Х-хромосоми та імпринтингу генів.

Таблиця 2.3.1. **Класи некодуючих РНК та їх функції**

Клас некодуючої РНК	**Розмір**	**Функції**
miRNAs	~23 нк	Регуляція від сотень до тисяч білок-кодуючих та некодуючих генів шляхом посттранскрипційного генного сайленсингу як у тварин, так і у рослин
siRNAs	20-25 нк	Регуляція певних генів шляхом комплементарного зв'язування з мРНК та деградації останньої. Участь у механізмах транскрипційного та постранскрипційного генного сайленсингу. У рослин участь у механізмах РНК-залежного метилювання ДНК
piRNAs	~26–31 нк	Сайленсинг повторюваних послідовностей в геномі та регуляція метилювання ДНК, що впливає на експресію генів
lncRNAs	>200 нк	Різноманітні функції від структурних механізмів до регуляції генів шляхом епігенетичних модифікацій

мікро-РНК (micro RNA, miRNA) – це тип ендогенних некодуючих РНК (довжиною приблизно 22 нк), які діють на рівні посттранскрипційної регуляції експресії генів. Представник родини miRNA, lin-4, був вперше ідентифікований у *C. elegans* як регулятор тривалості розвитку. Сьогодні зрозуміло, що miRNA відіграють фундаментальну роль у контролі багатьох біологічних процесів, таких як ріст, розвиток, диференціація, проліферація та загибель клітин. Вони виконують свої функції шляхом репресії їх цільових генів. Мішенню кожної miRNA можуть бути декілька сотень мРНК, та передбачено, що більше 60% мРНК мають miRNA-зв'язуючі сайти на своїх 3'-UTR (**3' untranslated region**), окрім того, miRNA здатні зв'язуватись з кодуючими регіонами. Накопичена на сьогоднійшій день інформація свідчить, що величезна кількість miRNA залучена у регуляцію багатьох біологічних процесів на рівні клітини, а порушення у регуляторних мережах miRNA призводить до патологічних змін.

siRNAs – це дволанцюгові РНК (double-stranded RNAs; dsRNA), які є посередниками посттранскрипційного сайленсингу та можуть брати участь у рекрутуванні комплексів, які модифікують гістони. siRNAs були виявлені як екзогенні РНК у тварин (наприклад, вірусного походження), але на сьогоднішній день відомо низку типів ендогенних siRNAs, які можуть брати

участь у контролі активності транспозонів. Крім того, у рослин добре відома участь siRNAs у механізмі RdDM. У дріжджів та рослин dsRNA залучені як у **посттранскрипційний**, так і **транскрипційний генний сайленсинг**. За посттранскрипційного генного сайленсинга siRNAs безпосередньо беруть участь у деградації певних РНК у цитоплазмі, що не має відношення до епігенетичних механізмів. Машинерії транскрипційного генного сайленсинга працюють у ядрі та асоційовані з модифікаціями хроматину, беручи участь у встановленні та підтриманні певних міток.

piRNAs (PIWI-interacting RNAs) були відкриті через їх асоціацію з білками PIWI, які залучені у процес гаметогенезу. Даний клас РНК найбільш вивчений у *D.melanogaster*, хоча вони також наявні і у ссавців. У дрозофіли вони виявлені і у соматичних клітинах, де відіграють критичну роль у сайленсингу транспозонів. Довжина piRNAs варіює від 26 до 31 нк, характерною особливістю є високий відсоток уридинів на 5'-кінці. piRNAs здебільшого організовані в кластери, які розміщені у гетерохроматині або на межі гетеро-еухроматин. Такі кластери являють собою повторювані послідовності фрагментів транспозонів усіх головних класів та родин. Їх головною функцією вважається сайленсинг МГЕ, хоча у ссавців вони можуть безпосередньо регулювати метилювання ДНК в статевих клітинах.

lncRNAs представляють собою гетерогенну групу ncRNAs довжиною більше 200 нк та є найменш зрозуміли транскрипційними одиницями в геномах еукаріот. Більшість відомих прикладів таких РНК залучені у епігенетичні механізми. Так, *XIST* (*X-inactive specific transcript*) бере участь у інактивації Х-хромосоми у ссавців, *H19* та *AIR* необхідні для геномного імпринтинга. Одним з підтипів lncRNA є **lincRNA** (long intergenic non-coding RNAs), для яких характерна висока консервативність. Було показано, що вони відповідають за формування комплексів модифікацій хроматину на специфічних геномних локусах, тим самим обумовлюючи встановлення клітинно-специфічного епігенетичного стану. Під час ембріонального розвитку експресія lncRNA, яка

регулюється плюрипотентними транскрипційними факторами OCT4 та NANOG, полегшує клітинно-специфічну експресію генів.

Біогенез малих ncRNAs

Біогенез miRNA. miRNA можуть бути міжгенного, інтронного або екзонного походження. Міжгенні miRNA можуть мати як свій власний промотор (**моноцистронні**), так і використовувати один промотор разом з іншими miRNA (**поліцистронні**), тоді як інтронні miRNA присутні поодиноко або у складі кластеру та використовують промотор їх гена-хазяїна. miRNA транскрибуються RNAPII, їх 5'-кінець піддається кепуванню, а 3'-кінець – поліаденілюванню. Дозрівання miRNA потребує двох ендонуклеолітичних кроків розщеплення за допомогою рибонуклеаз III типу - **Drosha** та **Dicer**. Після транскрипції Drosha каталізує дозрівання первинного транскрипту miRNA (**primary miRNA**; pri-miRNA), який може бути довжиною декілька кілобаз, у шпильку довжиною 60-100 н, яка називається **попередником мікро-РНК** (precursor-miRNA; pre-miRNA). pre-miRNA згортається у міні-спіральну структуру, яка впізнається білком exportin-5, ядерним фактором експортування, який переносить pre-miRNA з ядра у цитоплазму. У цитоплазмі від шпильки pre-miRNA відрізається кінцева петля білком Dicer, що призводить до створення дуплексу РНК довжиною 22 нуклеотиди, який включає зрілу головну частину та додаткову частину miRNA. Зріла miRNA залучається у комплекс **RISC** (RNA-induced silencing complex), де деградує її додаткова частина (Рис. 2.3.1). Точні деталі механізмів біогенезу miRNA ще не остаточно вивчені, але набагато менше відомо про механізми регуляції експресії miRNA. Нещодавні дослідження вказують на те, що не всі miRNA формуються у результаті проходження одних і тих самих механізмів. Після приєднання до комплексу RISC зрілої miRNA вона спрямовується до сайту-зв'язування на її цільовій мРНК. Таке зв'язування призводить до репресії трансляції мРНК за допомогою одного з наступних механізмів: або трансляція блокується за рахунок згортання мРНК у неактивну просторову конформацію, або

деаденілювання та дестабілізації мРНК, або розщеплення мРНК, або ізоляції її у **Р-тільця** (**processing bodies**). При високому ступені комплементарності цільової мРНК комплекс miRNA -RISC розрізає цільову мРНК за участю каталітичного домену (домен РНКази III) у складі білків Argonaute (AGO), корового компоненту комплексу RISC, та викликає її деградацію за участю комплексів SKI та XRN1 (Exoribonuclease 1). За часткової комплементарності комплекс RISC декепує та деаденілує цільову мРНК за участі комплексів DCP1-DCP2 (Decapping protein1-2) та CAF1-CCR4-NOT (Chromatin assembly factor 1 - CC chemokine receptor type 4 - Negative regulator of transcription 1) відповідно, що призводить до дестабілізації мРНК.

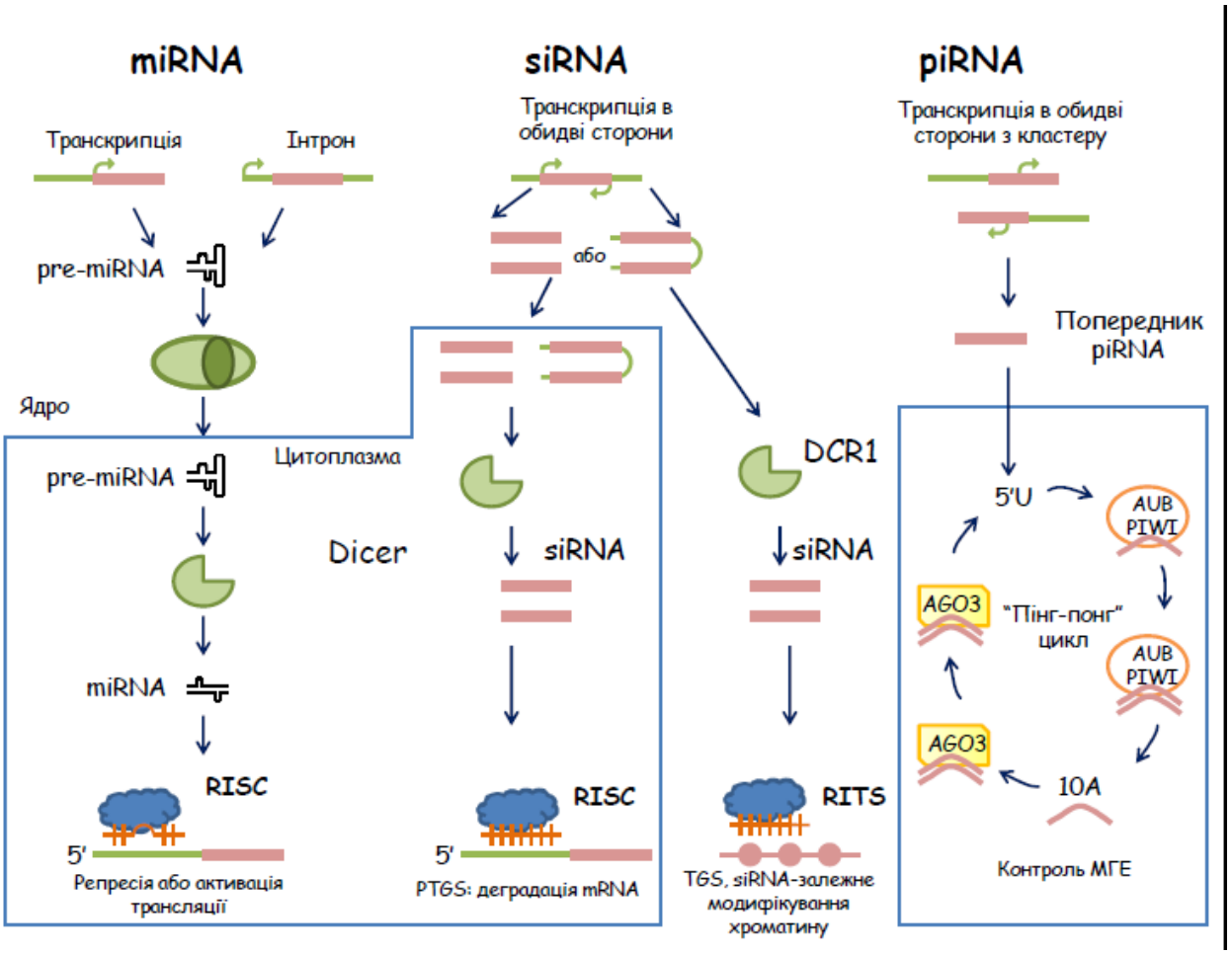


Рис. 2.3.1. Процесинг різних типів малих регуляторних РНК.

Біогенез siRNA. **dsRNA** вважається тригером для більшості, якщо не всіх, випадків біогенезу siRNA, і можуть формуватися різними шляхами – як змістовна-антизмістовна пара транскриптів або як дволанцюгові транскрипти.

Коли dsRNAs наявні, біогенез siRNA потребує роботи **родини ферментів Dicer** (Рис 2.3.1.). Dicer розрізає dsRNAs на дуплекси siRNA довжиною 20-25 нк з двома неспареними нуклеотидами на 3'- та 5'-кінцях. Крім того, у нейроспори (*N. crassa),* дріжджів *(Schizosaccharomyces pombe)* та нематод *(C. elegans)* був описаний **незалежний від Dicer** механізм формування siRNA. Локалізація в клітині, де відбувається процесинг dsRNA, впливає на регуляцію біогенезу siRNA та їх ролі у ядрі. У *S. pombe* транскрипція, процесинг, ампліфікація **РНК-залежною РНК полімеразою** (RNA-dependent RNA polymerase; RdRP) та AGO-опосередковане розрізання мішеней відбуваються у ядрі. Вважалося, що у тварин процесинг siRNA відбувається в цитоплазмі, проте, нещодавні дослідження показали, що у *D. melanogaster* Dicer2 (DCR2) переважно локалізується у ядрі. В той же час, для *C. elegans* продемонстровано цитоплазматичний процесинг багатьох siRNA.

Після формування, дуплекси siRNA зв'язуються з відповідним ефекторним білком AGO. Де саме відбувається зв'язування з AGO не до кінця з'ясовано у всіх модельних організмів. У різушки Таля (*Arabidopsis thaliana)* зв'язування з AGO4 відбувається в цитоплазмі і опосередковується HSP90 (Heat shock protein 90), після чого комплекс імпортується в ядро. Необхідність HSP90 для зв'язування siRNA з AGO показана і для *D. melanogaster*. У *S. pombe*, як і у *A. thaliana,* процесинг siRNA відбувається в ядрі, проте невідомо, де саме відбувається зв'язування з білком AGO1. У *C. elegans* ядерний Argonaute, який називається NRDE-3 (Nuclear RNAi defective-3), детектується в ядрі лише за умови зв'язування з вторинними siRNA, які утворюються в цитоплазмі.

Біогенез piRNA. Біогенез piRNA відбувається, як правило, за механізмом, відомим як **«цикл пінг-понг»** ('the ping-pong cycle') (Рис 2.3.1), який вперше був описаний у клітинах зародкової лінії *D. melanogaster*. Спочатку геномні кластери piRNA транскрибуються з утворенням попередників piRNA. В цитоплазмі попередники piRNA перетворюються в антизмістовні piRNAs довжиною 23-29 нк, для яких характерна уриөдин-збагачена ділянка на 5'-кінці.

Ці короткі одноланцюгові РНК (**single-stranded RNAs; ssRNAs**) зв'язуються з білком **Aubergine (AUB)**, який належить до PIWI-білків, та білком PIWI. В цитоплазмі сформований комплекс відповідає за розрізання мРНК активних транспозонів на змістовні piRNAs. Ці змістовні piRNAs в свою чергу знову зв'язуються з AGO3 (PIWI-білок), який потім відповідає за розрізання попередників piRNA з наступним утворенням нових антизмістовних piRNAs, таким чином замикаючи пінг-понг цикл. У клітинах зародкової лінії самок локалізація AUB обмежується цитоплазмою, тоді як PIWI – це переважно ядерні білки. Припускають, що тільки після зв'язування piRNA, утворених в пінг-понг циклі, з AGO3 останній імпортується в ядро. Менш зрозумілим є **пінг-понг-незалежний шлях** біогенезу piRNA, який описаний у фолікулярних клітинах, що оточують ооцити.

Стабільність і циклічність мають важливе значення в регуляції як siRNA, так і piRNA сигнальних шляхів. piRNA та siRNA метилюються у різних організмів ферментом відомим як HEN1 (small RNA 2´-O- methyltransferase). Це метилювання захищає малі РНК від деградації 3'-кінця. Таким чином, функціонування HEN1 може забезпечувати клітинну специфічність малих РНК, і, отже, визначати мішені РНКі.

Епігенетика та miRNA

Епігенетична регуляція miRNA. Не дивлячись на те, що біогенез miRNA сьогодні інтенсивно досліджується, регуляція експресії miRNA залишається в значній мірі нез'ясованою. Так, були визначені промоторні регіони тільки для незначної частини генів miRNA. Незважаючи на те, що спроби передбачення промоторних регіонів miRNA були здійснені у низьці досліджень *in silico,* більшість цих передбачень не було підтверджено у лабораторних експериментах.

Як вже зазначалося, miRNA можуть бути міжгенними або внутрішньогенними. Локалізація промоторів міжгенних та антизмістовних внутрішньогенних miRNA в значній мірі не зрозуміла, тоді як промотори

основних генів, які перекриваються з miRNA, вважаються промоторами внутрішньогенних змістовних miRNA. Проте у деяких дослідженнях було показано, що експресію miRNA також можуть регулювати промотори, які розміщені у інтронах. Крім того, було продемонстровано, що один з представників кластеру miRNA може у певних випадках альтернативно регулюватися незалежно від інших за допомогою власного промотора, хоча зазвичай експресується у межах кластеру з однієї pre-miRNA. Крім того, частка miRNA у загальному пулі тотальної РНК може бути зниженою у ракових клітинах та клітинах, які швидко проліферують, причини чого залишаються невідомими. А отже, шлях регуляції експресії miRNA може бути дещо більш складним, ніж здавалося на перших етапах їх дослідження. Наприклад, рівень метилювання ДНК та статус модифікування гістонів у промоторах miR-127 впливають на експресію зрілої miRNA.

miRNA як регулятори епігенетичних процесів. Як гени білків, так і гени miRNA можуть регулюватися епігенетично, а самі miRNA регулювати різноманітні компоненти епігенетичної машинерії. miRNA можуть залучатися до процесів регуляції шляхом посттранскрипційної регуляції ферментів-модифікаторів хроматину. Серед передбачених генів-мішеней miRNA людини низка генів залучена в епігенетичну регуляцію, наприклад, гени метил-CpG-зв'язуючих білків, гістонових метилтрансфераз, HDACs та білків, які містять хромодомени. Ця частина miRNA, яка прямо або опосередковано регулює експресію ефекторів епігенетичних процесів, відома під назвою **epi-miRNAs**. Порушення регуляція експресії miRNA у ракових клітинах людини призводить до порушення епігенетичного сайленсингу генів-супресорів пухлин, який забезпечується метилюванням ДНК.

Перший безпосередній зв'язок між miRNA та DNMT було встановлено у нещодавньому дослідженні для родини miR-29 (miR-29a/b/c) та DNMT3a і DNMT3b, а також інших miRNA, таких як miR-148 і miR-143, що були ідентифіковані як регулятори ферментів метилювання. Так, у клітинах

карциноми легень за умов зниження експресії miR-29 підвищується експресія DNMT3a і DNMT3b. Підвищення ж експресії miR-29 порушує метилювання ДНК *de novo* та викликає загальне гіпометилювання, яке в свою чергу призводить до експресії генів-супресорів пухлин, що були вимкнені завдяки метилюванню. Все це призводить до апоптозу ракових клітин як *in vitro*, так *in vivo*. Ця робота показує, що miR-29 регулює гени DNMT3 у клітинах раку легень, та засвідчує наявність нового механізму, за рахунок якого miRNA регулюють експресію генів шляхом впливу на епігенетичні механізми. У іншій роботі було показано, що підвищення експресії *miR-29b* у клітинах AML (acute myeloid leukaemia) призводить до суттєвого зниження DNMT1, DNMT3A та DNMT3B як на рівні РНК, так і на рівні білків. Зроблено висновок, що експресія *miR-29b* сприяє гіпометилюванню не тільки за рахунок прямого впливу на DNMT3A та DNMT3B, а і завдяки непрямому зниженню експресії DNMT1 шляхом зниження експресії *Sp1*, відомого трансактиваційного фактору гену DNMT1.

Крім того, miR-143 регулює DNMT3A у клітинах колоректального раку, тоді як miR-148a та miR-148b репресують експресію Dnmt3b у клітинах мишей за рахунок зв'язування з дуже консервативною послідовністю у кодуючій частині, а не у районі 3'UTR як у більшості випдків. Бенетті (Benetti) з співавторами передбачили новий регуляторний шлях метилювання ДНК, який у ссавців включає **кластер miR-290** (miR-290, miR-291-3p, miR-291-5p, miR-292-3p, miR-292-5p, miR-293, miR-294 and miR-295) – важливий регулятор Rbl2 (Retinoblastoma-Like 2), що в свою чергує діє як транскрипційний репресор Dnmt3a та Dnmt3b. Це призводить до гіпометилювання геному, особливо теломер. Активність кластеру повністю пригнічується у клітинах мишей, позбавлених білка Dicer, в той же час у них підвищується експресія Rbl2, що призводить до репресії Dnmt3a та Dnmt3b і тим самим викликає дефекти метилювання ДНК. Проте регуляторні ефекти метилювання кластеру miR-290 не встановлені у DICER-нокаутованих ембріональних клітинах нирок людини. Такий результат свідчить, що вплив кластеру miR-290 на DNMT може бути

клітинно- чи видо-специфічним. Нещодавно на основі даних, отриманих на плавунах, запропоновано новий механізм регуляції експресії генів за допомогою miRNA. Висловлено припущення, що ініціація епігенетичного сайленсингу за рахунок метилювання ДНК регулюється шляхом співвідношення miRNA та їх мРНК- мішеней.

miRNA також регулюють експресію HDACs та гістновоих метилтрансфераз. Так, показано, що HDAC4 є мішенню miR-1 та miR-140. Такий новий регуляторний механізм за участю miRNA описаний у клітинах аміотрофічного латерального склерозу (amyotrophic lateral sclerosis, ALS). Показано, що miR-206 затримує розвиток ALS, також підтверджено, що HDAC4 є мішенню miR-206. Цікаво, що у miR-206$^{-/-}$ тварин зростає експресія білка HDAC4 у скелетних м'язах, тоді як рівень мРНК *Hdac4* залишається незмінним. Це означає, що miR-206 інгібує трансляцію Hdac4, а не діє на транскрипційному рівні. Було п оказано, що miR-1 та miR-499 беруть участь у диференціації кардіоміоцитів, імовірно за рахунок репресії генів HDAC4 та SOX6 (SRY (sex determining region Y)-box 6).

miR-449a впливає на свою мішень (HDAC4), експресія якого підвищується у багатьох типах ракових клітин. Експресія цієї miRNA знижується у ракових клітинах, введення її у клітини раку простати призводить до затримки клітинного циклу та апоптозу. Подібним чином ре-експресія miR-101 у онкологічних моделях також призводить до інгібування формування раку. Мішенню miR-101 є EZH2, каталітична одиниця репресивного комплексу Polycomb2, який відповідальний за триметилювання Н3К27, репресивної мітки, та може загалом змінювати структуру хроматину. miR-2861 у первинних остеобластах мишей сприяє їх диференціації за рахунок репресії експресії HDAC5 на посттранскрипційному рівні.

Механізми регуляції ядерної РНКі

Транкрипційний генний сайленсинг (transcriptional gene silencing; TGS) був першою відкритою функцією ядерної РНКі і визначається як процес, за

допомогою якого можна знизити транскрипцію шляхом формування гетерохроматину в таргетних локусах геному. У цьому контексті постає запитання: «Як саме досягається сиквенс-специфічне встановлення репресивних модифікацій хроматину?». Як і в цитоплазмі, мішенями ядерної РНКі є молекули РНК, проте вони повинні бути в безпосередній близькості до локусу їхнього походження, що і призводить до специфічного встановлення епігенетичних модифікацій у конкретних послідовностях. Так, була сформульована модель **котранскрипційного генного сайленсингу** (co-transcriptional gene silencing; CTGS), згідно якої мішенями ядерних малих РНК є новосинтезовані РНК-полімеразами молекули РНК, після чого відбувається взаємодія з ефекторними комплексами та регуляція машинерії транскрипції.

Ядерна РНКі у S. pombe: TGS. Роль РНКі у транскрипційному генному сайленсингу була виявлена у *S. pombe***,** що є необхідним для формування конститутивного гетерохроматину **у прицентромерних регіонах**. Ці регіони високозбагачені гістоном H3 метильованим по лізину в 9-му положенні (H3K9me) і складаються з варіабельного числа повторів, які двонаправлено транскрибуються з утворенням dsRNA, що потім процесуються за участі Dcr1 у siRNAs. Крім того, **РНК-залежний РНК-полімеразний комплекс** (RNA-dependent RNA polymerase complex; RdRC), взаємодіючи і з Dcr1, і з Ago1, продукує dsRNA та siRNA з транскриптів-мішеней Ago1, збільшуючи кількість siRNA та посилюючи ефект. Синтезовані siRNAs завантажуються в Ago1 – основного компонента **RNA-induced transcriptional silencing complex (RITSC)** – і спрямовують RITSC до новоутворених прицентромерних ncRNA транскриптів. Білок Chp1 (Chromodomain protein 1), до складу якого входить хромодомен, також є компонентом RITSC і сприяє його локалізації біля гетерохроматину шляхом взаємодії з H3K9me. Після локалізації RITSC у локусі, який містить повтори, він сприяє подальшому метилюванню H3K9, рекрутуючи **cryptic loci regulator complex (CLRC)**, до складу якого входить

H3K9 метилтрансфераза. Цікаво, що здатність Ago1 до каталітичного розрізання є необхідною для позиціонування та поширення H3K9me, зокрема в репортерних генах. Це пояснюється тим, що каталітична активність Ago1 призводить для вивільнення «супроводжуючого» ланцюга (passenger-strand) зв'язаної з ним dsRNA, а отже, сприяє комплементарній взаємодії між завантаженими в білок siRNAs та їхніми РНК-мішенями (Рис.2.3.2). Вищеописане свідчить, що ядерна РНКі, а особливо комплементарна взаємодія «siRNA–РНК-мішень», є необхідною для поширення гетерохроматину, явища, яке спочатку було описане як **ефект положення** (position effect variegation). Центральна роль у інтеграції процесів транскрипції та модифікування хроматину належить комплексу RITSC. Крім того, існує позитивний зворотній зв'язок між утворенням siRNA, локалізацією RITSC та метилюванням H3K9. Цікавим наслідком є те, що метилювання H3K9 є необхідним для генерування siRNA. Взаємозв'язок між транскрипцією, утворенням siRNA та сайленсингом у *S. pombe* свідчить, що TGS відбувається у цис-положенні; проте у рослин TGS також може відбуватись і у транс-положенні.

Ядерна RNAi в S. pombe: CTGS. Залежність локалізації RITSC від комплементарної взаємодії з ncRNA транскриптами являє собою цікавий парадокс: локуси-мішені РНКі **повинні транскрибуватися, щоб бути сайленсованими**. Таку ідею підтверджують результати генетичного скринінгу порушення сайленсингу у *S. pombe,* а саме було ідентифіковано дві точкові мутації в субодиницях RNAPII, які роз'єднували транскрипцію та RITSC в прицентромерних ділянках. Модель зв'язку транскрипції, РНКі та формування гетерохроматину має сенс в контексті клітинного циклу. Дослідження демонструють, що транскрипція з прицентромерних повторів, які є мішенями для РНКі, відбуваються впродовж S-фази, тоді ж, коли відбувається реплікація ДНК і повинні передатися модифікації хроматину. Реплікація ДНК та транскрипція також повинні бути розділені у часі, щоб запобігти зіткненню цих процесів з наступною зупинкою реплікативної вилки. Було виявлено, що РНКі

є необхідною для полегшення вивільнення RNAPII з ДНК та запобігання транскрипції під час реплікації ДНК. Можна припустити, що РНКі може інгібувати елонгацію транскрипції, тим самим призводячи до дисоціації RNAPII з ДНК. На основі вищеописаного було сформульовано модель CTGS у *S. pombe*.

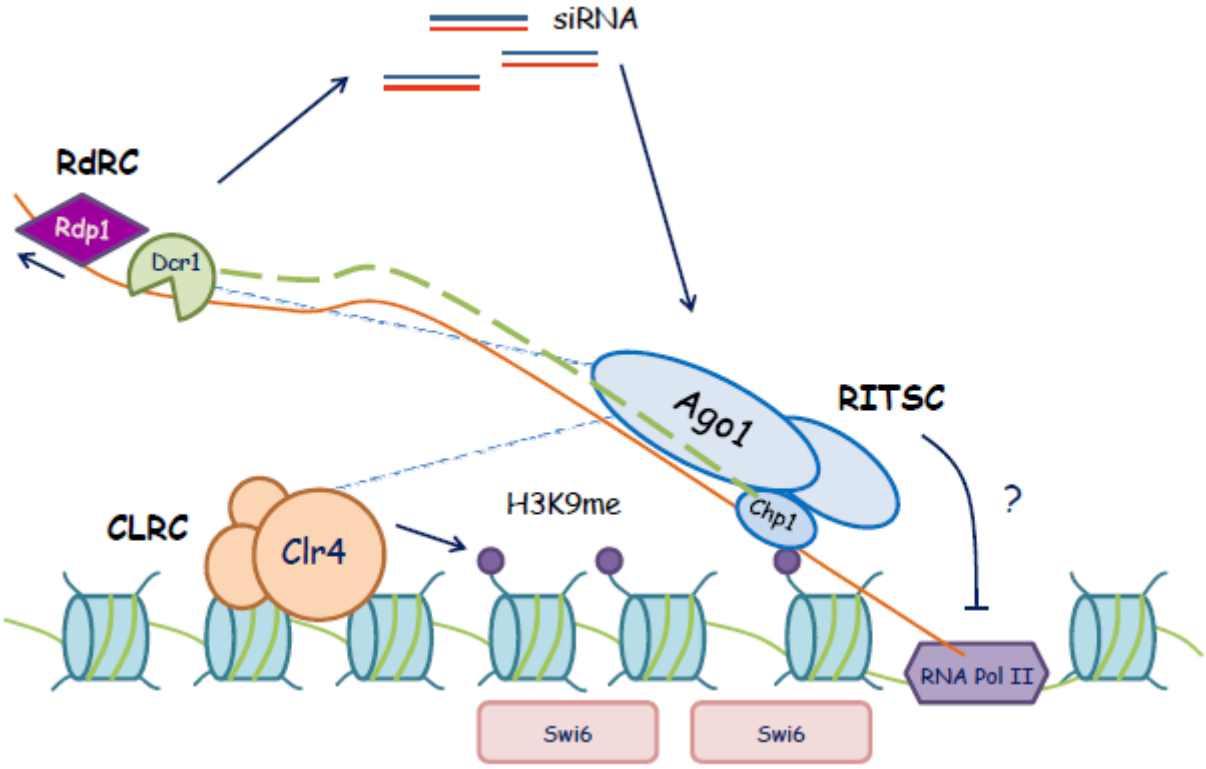


Рис.2.3.2. Механізм ко-транскрипційного генного сайленсингу у *S. pombe*.

Модель CTGS дозволяє пояснити парадокс TGS. Новоутворені транскрипти РНК є необхідними для ініціації направлення РНКі локусу; після цього ядерний комплекс RNAi може сприяти транскрипційному сайленсингу на рівні хроматину та зумовлювати дисоціацію RNAPII невідомим поки що шляхом. Залишаються не зрозуміли наступні питання: як саме розпочинається транскрипція у гетерохроматиновому середовищі та який саме механізм зумовлює дисоціацію RNAPII.

З'являють все нові докази того, що РНКі може ко-транскрипційно регулювати локуси і поза конститутивним гетерохроматином у *S. pombe*. Було показано, що РНКі відіграє роль у запобіганні одночасній транскрипції конвергентно транскрибованих генів, ймовірно також шляхом полешення

дисоціації RNAPII. Крім того, Dcr1 здатен фізично взаємодіяти з генами в еухроматині, тому можна припустити його роль в регуляції генів без залучення модифікацій гістонів. І дійсно, ядерний Dcr1 грає роль «термоперемикача» (‘thermoswitch’) під час регуляції генів відповіді на тепловий стрес. В клітинах, які не зазнали стресу, Dcr1 знаходиться в ядрі і негативно регулює гени відповіді на стрес; під дією температури він експортується з ядра, що зумовлює активацію даних генів.

РНК-залежне метилювання ДНК (RNA-directed DNA methylation, RdDM) у A. thaliana. У рослин спрямоване вірусною РНК трансгенне метилювання ДНК було відкрите задовго до того, як стала відома роль РНКі; пізніше залучення сигнальних шляхів за участі малих РНК та РНКі в процес TGS було вперше запропоновано саме для *A. thaliana*. Можна провести багато паралелей між процесами RdDM у *A. thaliana* та CTGS у *S. pombe*. Наприклад, для обох організмів спільними рисами є необхідність транскрипції для сайленсингу та локалізація саме в гетерохроматинових локусах, які містять повтори. RdDM відрізняється від CTGS у *S. pombe* необхідністю покрокової транскрипції двома полімеразами (RNAPIV та RNAPV). Транскрипти RNAPIV слугують субстратами для генерації siRNA, тоді як новоутворені транскрипти RNAPV є мішенями РНКі. Ініціаторні матриці для RNAPIV невідомі, але, ймовірно, вони є локусами, де відбуватиметься RdDM. RNAPIV фізично взаємодіє з РНК-залежною полімеразою 2 (RNA-dependent polymerase 2; RDR2), яка продукує dsRNAs з її транскриптів; dsRNAs в результаті процесуються за участі DICER-LIKE 3 (DCL3) в siRNA довжиною 24 нуклеотиди. Ці siRNA експортуються в цитоплазму, де вони завантажуються в комплекс Argonaute (Рис 2.3.3).

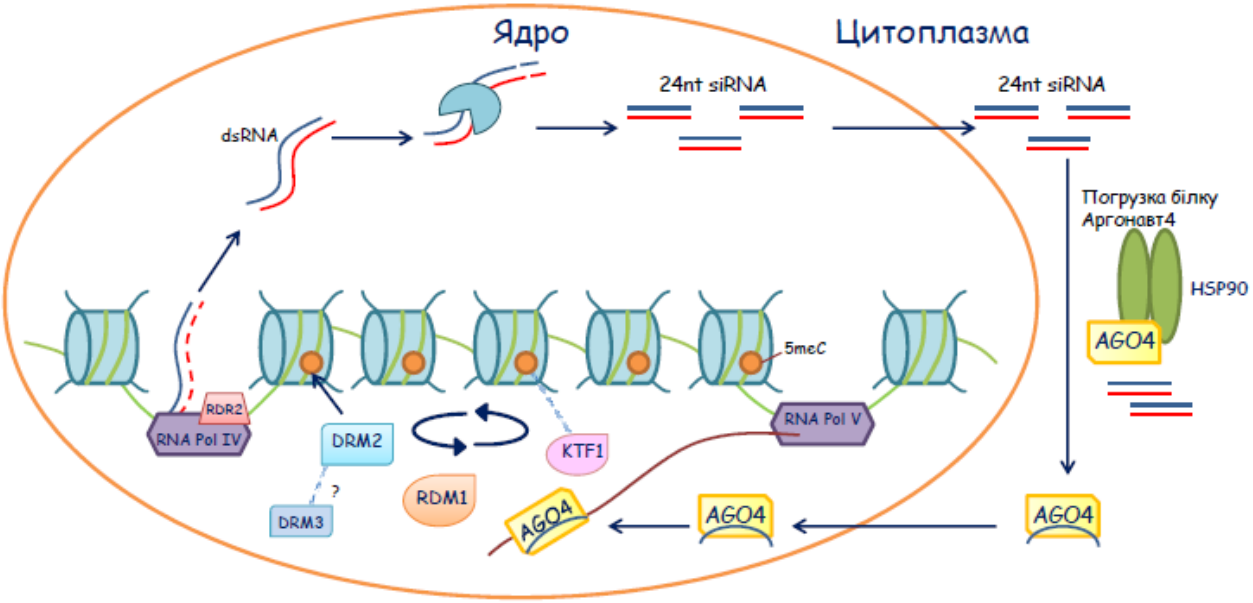


Рис. 2.3.3. РНК-залежне метилювання ДНК у *A. thaliana*.

Щонайменше 3 з 10 білків Argonaute, виявлених в *A. thaliana*, залучені в процеси RdDM, проте першим був ідентифікований AGO4. Після завантаження 24 нуклеонидних siRNA, яке відбувається у цитоплазмі, комплекс імпортується в ядро та спрямовується до мішеней - комплементарних до siRNA некодуючих транскриптів, синтезованих RNAPV. Вважається, що певну роль у цьому процесі відіграють безпосередні білок-білкові взаємодії з субодиницею RNAPV NUCLEAR RNA POLYMERASE E1 (NRPE1) та RNAPV-асоційованим KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (KTF1).

Такий ко-транскрипційний сайленсинг за участі процесів РНКі в кінцевому результаті призводить до зміщення репресуючого метилювання цитозину в локуси, які транскрибуються RNAPV. У *A. thaliana* метилювання цитозину *de novo* каталізується ДНК метилтрансферазою DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2) в локусах-мішенях RdDM. DRM2 може бути частиною ефекторного комплексу RdDM, що підтверджується тим фактом, що білок RDM1 (RNA-DIRECTED DNA METHYLATION1), який є компонентом такого комплексу, взаємодіє і з AGO4, і з DRM2, і є необхідним для процесів RdDM. Для нормального функціонування RdDM також необхідна

присутність DRM3, каталітично неактивного паралогу DRM2, проте його роль невідома. Після залучення у потрібне місце DRM2 метилює цитозин у будь-якому нуклеотидному контексті, включаючи асиметричні CHH сайти (де H – будь-який нуклеотид), для полегшення формування гетерохроматину та TGS. Можливо, аналогічно до ролі Chp1 в спрямуванні RITSC до гетерохроматину у *S. pombe,* AGO4-асоційований білок RDM1 у *A. thaliana* зв'язується з одноланцюговою метильованою ДНК, і таким чином спрямовує AGO4 до напівметильованих регіонів, посилюючи ефект.

Виявлені **варіації канонічного RdDM сигнального шляху**. Так, білок AGO6 відіграє частково таку ж роль, як і AGO4, а AGO9 завантажується 24 нуклеотидними siRNAs у клітинах жіночої зародкової лінії, де його активність є необхідною для сайленсингу транспозонів, проте безпосередня роль у метилюванні ДНК ще не з'ясована. Існують також докази того, що транскрипти RNAPII (яка в основному транскрибує еухроматинові гени), на противагу RNAPV, є також мішенями RdDM, проте значення цього залишається незрозумілим.

У рослин RdDM сигнальний шлях може бути залучений у метилювання H3K9, хоча не з'ясовано, чи відіграє РНКі в цьому безпосередню роль, як у *S. pombe.* Існує перехресний зв'язок між цими шляхами, оскільки метилювання ДНК необхідне для рекрутування H3K9 метилтрансферази SUVH4. Щонайменше два гомологи SUVH потребуються для процесів RdDM, а малі РНК-транскрипти з інвертованих повторів впливають на метилювання H3K9 в більшій мірі, ніж на метилювання цитозину.

RdDM, можливо, є не єдиним механізмом ядерної РНКі у *A. thaliana.* Є докази того, що інший ядерний сигнальний шлях РНКі, за участі білка DCL4, відіграє **ко-транскрипційну роль в термінації транскрипції**. DCL4 безпосередньо взаємодіє з хроматином в 3'-регіоні генів, які транскрибуються RNAPII, і зумовлює розріз новоутворених транскриптів та термінацію транскрипції.

Кілька прикладів у інших рослин, ніж *A. thaliana,* вказують на те, що miRNAs можуть впливати на метилювання ДНК. Так, у рису малі РНК довжиною 24 нуклеотидів утворюються з попередників (так званих **long miRNAs**; lmiRNAs) незалежно від активності RDR2 та процесуються DCL3, після чого завантажуються в AGO4, який у *A. thaliana* зазвичай асоційований саме з RdDM. Ці lmiRNAs здатні направляти високоспецифічне метилювання цитозину у власних локусах (в цис-положенні) та комплементарних локусах (у транс-положенні). Деякі lmiRNAs були ідентифіковані і у *A. thaliana;* проте, їх вплив на метилювання ДНК не показаний. Також у моху *Physcomitrella patens* показано кілька 21 нуклеотидні miRNAs, які впливають на метилювання цитозину. Хоча обидва приклади демонструють вплив інших класів малих РНК на метилювання ДНК, жоден з них не означає існування принципово нового сигнального шляху поза процесами RdDM.

*Ядерна РНКі в соматичних клітинах тварин***.** Хоча роль ядерної РНКі у клітинах зародкової лінії тварин є зрозумілою, проте є суперечливі дані, які дозволяють припустити, що TGS відбувається і в соматичних клітинах. Годування *C. elegans* dsRNA, для яких мішенями є ендогенні гени, є тригером переходу метилювання H3K9 в таргетних локусах соматичних клітин у процес, який залежить від ядерного шляху РНКі [відомий як сигнальний шлях NRDE (Nuclear RNAi defective) у *C. elegans*] та від активності РНК-залежної РНК-полімерази RRF-1. Виявлено багато генів-мішеней ендогенних siRNAs, і деякі, але не всі, демонструють зниження метилювання H3K9 у мутантів *nrde.* У соматичних клітинах *D. melanogaster* мутації в *Dcr2* чи *Ago2,* які залучені у siRNA сигнальний шлях, впливають на експресію репортерного гену у центромерах і призводять до зниження рівня метилювання центромерного H3K9.

У соматичних клітинах багатоклітинних тварин, як і у дріжджів, що діляться, білки, залучені до процесів RNAi, взаємодіють з транскрипційною машинерією, що може свідчити про консервативність CTGS. Так, у клітинах

людини та *D. melanogaster* білок AGO1 взаємодіє з RNAPII, а у S2 клітинах *D. melanogaster* AGO2 та DCR2 безпосередньо зв'язуються з хроматином та RNAPII і необхідні для інгібування експресії генів теплового шоку за відсутності стресу шляхом утримування RNAPII на паузі та запобігання тим самим елонгації транскрипції. Підсумовуючи, сучасні дані свідчать про консервативність взаємодій ядерної РНКі та транскрипційної машинерії, що відповідає ко-транскрипційній моделі.

Ядерна РНКі в клітинах зародкової лінії

В клітинах зародкової лінії особливе значення має сайленсинг МГЕ, оскільки будь-які зміни будуть успадковуватись нащадками. У тварин це досягається завдяки активності сигнального шляху piRNA, а у рослин – за участі siRNAs.

Ядерна РНКі в клітинах зародкової лінії A. thaliana. У рослин клітини зародкової лінії виникають на пізніх стадіях розвитку з **соматичних стовбурових клітин** (на відміну від тварин, де ці клітини виникають на ранніх етапах), тому транспозони повинні бути сайленсованими впродовж всього розвитку. Загалом, хроматинові мітки, які присутні протягом соматичного розвитку, повинні бути встановленими заново в клітинах зародкової лінії. В соматичних клітинах транспозони підтримуються в неактивному стані як за рахунок активностей RdDM, так і підтримуючих ДНК-метилтрансфераз, хоча ці зміни в клітинах-супутниках зародкової лінії (**companion cells**) не роблять внеску в генетичну складову наступного покоління. **Білок DDM1** (DNA methylation 1), який бере участь в ремоделюванні хроматину, є основним регулятором транспозонів, а його експресія знижена у вегетативних ядрах, що призводить до активації транспозонів та утворення 21 нуклеотидних малих РНК, антизмістовних транспозонам. Ці малі РНК можуть вимикати репортерні гени, які експресуються в сперматозоїдах. Що стосується метилювання ДНК, то на відміну від тварин, у яких відбувається повногеномне деметилювання під

час сперматогенезу, в клітинах чоловічої зародкової лінії *A. thaliana* підтримується симетричне метилювання на рівнях, подібних до таких у соматичних клітинах, але спостерігається зниження рівня асиметричного метилювання послідовностей низки транспозонів, які пізніше реметилюються в ембріонах, що розвиваються.

В жіночому гаметофіті репресована ДНК-метилтрансфераза **MET1** (methyltransferase 1), а ДНК-глікозилаза DEMETER, яка знімає метилювання цитозину, експресується в диплоїдній центральній клітині (яка потім стане екстраембріональним ендоспермом). Це призводить до тотального деметилювання цитозину в ендоспермі, що супроводжується зростанням рівня експресії 24 нуклеотидних siRNAs, що в свою чергу зумовлює гіперметилювання в контекстах нуклеотидів поза CpG в цільових сайтах, які часто представляють собою ретротронспозони. Ці 24 нуклеотидні siRNAs зв'язуються з білком AGO9 в центральній клітині і забезпечують контроль функціональної специфікації макроспори. На сьогодні нема прямих експериментальних доказів, які демонструють переміщення таких siRNAs або AGO9 з центральної клітини до яйцеклітини. Проте, у мутантів за *ago9* МГЕ активовані в яйцеклітині, де *ago9* не експресується, а miRNA, які експресуються, в центральній клітині можуть вимикати репортерні гени в яйцеклітині. Отже, транспозони спостерігаються в супутніх клітинах і потім використовуються для утворення малих РНК, які зумовлюють вимкнення транспозонів у клітинах зародкової лінії, хоча невідомо чи можуть вони впливати на TGS через шлях РНКі. Таке переміщення малих РНК між клітинами зародкової лінії має значення для епігенетичного успадкування.

piRNA сигнальний шлях у D. melanogaster. Серед тваринних об'єктів роль сигнального шляху piRNA у сайленсингу МГЕ найкраще описана для оваріол *D. melanogaster*. В оваріолах piRNA сайленсують транспозони в соматичних фолікулярних клітинах, харчуючих клітинах та власне в ооциті. Соматичні фолікулярні клітини продукують лише антизмістоні piRNAs з локусу *flamenco;*

вони не беруть участь в пінг-понг циклі, а замість цього процесуються і завантажуються виключно в білки PIWI. Для цих piRNAs головними мішенями є елементи *gypsy*, які представляють собою LTR-ретротранспозони. Елементи родини *gypsy* здатні розмножуватися шляхом продукування вірусних частинок в фолікулярних клітинах, які можуть інфікувати клітини зародкової лінії, тому сигнальний шлях *flamenco*-похідних piRNA вважається еволюційним антагоністом даного класу транспозонів.

У харчуючих клітинах та оваріолах працює **пінг-понг цикл**, який забезпечує захист від різних типів МГЕ за участі всіх кластерів piRNA та mRNA активних транспозонів. У цьому випадку шлях piRNA призводить до деградації транскриптів транспозонів та обумовлює сайленсинг транскрипції транспозонів шляхом метилювання H3K9. Показано, що білки PIWI специфічно взаємодіють з білком HP1A, який вважається основним компонентом гетерохроматину. Крім того, ядерна локалізація PIWI є необхідною для хроматин-опосередкованої репресії ряду транспозонів, що може свідчити про безпосередню участь в цих процесах. В той же час, сайленсинг самих кластерів piRNA, які розміщені у гетерохроматині, був би несприятливим, оскільки запобігає участі первинних piRNAs в циклі. Це вирішується за допомогою білка Rhino – варіанту HP1, який обмежується ядрами клітин зародкової лінії і специфічно локалізується в кластерах piRNA і сприяє транскрипції гетерохроматинових кластерів. Механізми локалізації Rhino саме в кластерах piRNA, а не в активних транспозонах залишаються незрозумілими.

Сигнальний шлях piRNA у мишей. Сигнальний шлях за участі білків PIWI високонсервативний у тварин і відіграє у клітинах зародкової лінії мишей роль, подібну до такої у дрозофіли. У мишей два гомологи білків PIWI - **MILI** (Mouse PIWI; також відомий як PIWIL2) та **MIWI2** (MIWI-like; також відомий як PIWIL4) – є необхідними для сайленсингу транспозонів у клітинах зародкової лінії самців. Втрата будь-якого білку спричинює переміщення транспозонів та стерильність особин. Проте, є відмінності у piRNA сигнальних

шляхах у *D. melanogaster* та мишей. У клітинах зародкової лінії самців мишей транспозони тотально дерепресуються через тотальне деметилювання цитозину впродовж ранніх етапів розвитку. Потім piRNA сигнальний шлях запускається окремими транспозонами та відбувається відновлення патернів метилювання впродовж розвитку. Оскільки MIWI2 знаходиться в ядрі, то, схоже, він є ефектором Argonaute РНК-спрямованого метилювання ДНК у мишей. Участь MIWI2 у встановленні метилювання ДНК в клітинах зародкової лінії може не бути безпосередньою (на відміну від ролі AGO4 у *A. thaliana* чи Ago1 для H3K9me у *S. pombe*), так як експерименти по ко-імунопреципітації не показали взаємодії між MIWI2 та *de novo* метилтрансферазами DNMT3A та DNMT3B.

Роль ядерної РНКі в спрямуванні метилювання ДНК у ссавців продемонстрована в імпринтованому локусі ***Rasgfr1*** (Ras protein-specific guanine nucleotidereleasing factor 1), де сигнальний шлях piRNA необхідний для метилювання *de novo* в клітинах зародкової лінії самців. У даному локусі вище від диференційно метильованого регіону (differentially methylated region; gDMRs) знаходяться LTR, які комплементарні piRNAs, що вступають у цикл пінг-понг; ці piRNAs напевно можуть генеруватися внаслідок наявності копії LTR в кластері piRNA. LTR міститься в межах гена ncRNA, який специфічно транскрибується під час сперматогенезу, коли відбувається метилювання *de novo*. Ця новоутворена ncRNA є мішенню для piRNAs і ко-транскрипційно сайленсується шляхом депозиціонування метилювання ДНК. Це сприяє поширенню направленого сайленсингу в поблизу розташований локус *Rasgfr1*, що і призведить до імпринтингу. Не виключають, що сайленсинг за допомогою piRNAs може бути непрямим. Проте локус *Rasgfr1* є не єдиним прикладом імпринтингу чи сайленсингу ендогенних генів за участі механізму РНКі. Наступний генетичний та біохімічний аналіз необхідний для того, щоб зрозуміти, чи piRNAs відіграють безпосередню роль в метилюванні ДНК, і якщо так, то яким є детальний механізм цього процесу.

Ядерна РНКі та збереження цілісості геному

Ядерна РНКі відіграє ключову роль в підтримані цілісності геному, запобігаючи переміщенню транспозонів. Проте, з'являються дані про пряму роль цього механізму в збереженні геному та репарації ДНК.

РНКі та структура хромосом. Конденсація хромосом є необхідною для сегрегації хромосом під час мітозу. У *S. pombe* порушення РНКі викликає значний рівень затримки розходження хромосом при мітозі та підвищену чутливість до ліків інгібіторів мікротрубочок. Також у клітинах зародкової лінії *D. melanogaster* DEAD-бокс вмісна РНК-хеліказа VASA сприяє локалізації конденсації конденсину I (condensin I), що зумовлює конденсацію хромосом і залежить від компонентів piRNAs сигнального шляху AUB та spindle E (SPNE). Білок BELLE, паралог VASA, діє аналогічно в соматичних клітинах та потребує для виконання своїх функцій AGO2 та DCR2, компонентів шляху siRNA. Цікаво, що роль РНКі в локалізації когезину була передбачена і у *S. pombe*, що, можливо, свідчить про консервативність ролі РНКі у локалізації когезину та/чи конденсину для забезпечення належної конденсації хромосом.

Теломери *D. melanogaster* унікальні через їх транспозонний механізм подовження. З'ясовано, що шлях piRNA регулює теломерні транспозони в клітинах зародкової лінії і тому може регулювати довжину теломер. Наприклад, у *Ago3*⁻мутантних ембріонів спостерігається підвищений рівень транспозиції теломерних транспозонів, і як наслідок збільшена довжина теломер. Крім цього, *aub* і РНК геліказа *armitage* залучені в продукування теломер-специфічних piRNAs, і їх втрата зумовлює більшу частоту злиття теломер, що може свідчити про роль piRNA в організації теломер. Ядерна РНКі також є необхідною для належного функціонування теломер у *S. pombe*. Субтеломерні регіони містять ділянку, яка гомологічна прицентромерним повторам та яка сприяє РНКі-залежному формуванню гетерохроматину. Припускається, що ядерна РНКі відіграє консервативну роль у підтримці стабільності теломер у різних організмів.

Еукаріотичні геноми містять значні регіони повторюваної ДНК, яка залучена в рекомбінацію, і може викликати несприятливі зміни в структурі хромосом. Є докази того, що шляхи РНКі можуть бути залучені в репресію рекомбінації в повторюваних регіонах. Так, порушення РНКі в клітинах *S. pombe* призводить до збільшення мейотичної рекомбінації. Подібне спостереження було зроблене і для *D. melanogaster*, в якої РНКі-опосередкована супресія рекомбінації є необхідною для підтримки стабільності повторюваних послідовностей ДНК.

*Відповідь на пошкодження ДНК***.** Роль малих РНК у відповідь на пошкодження ДНК (DNA damage response, DDR) вперше спостерігалась в *N. crassa*, у яких малі РНК утворювались з повторів рибосомальної ДНК (rDNA) при обробці клітин ДНК-пошкоджуючими агентами. Пізніше було показано безпосередню участь механізмів РНКі у репарації ДНК у *A. thaliana*. Дволанцюгові розриви ДНК індукують утворення 21-нуклеотидних малих РНК. Ці малі РНК синтезуються на ділянках поряд з дволанцюговими розривами, а їх біогенез потребує активностей як RNAPIV та DCRL. Вони рекрутуються до місця розриву за участі AGO2 та опосередковують репарацію, а мутації в *Ago2* чи генах інших факторів біогенезу таких РНК спричинюють зниження ефективності репарації дволанцюгових розривів. Припускають, що AGO2 рекрутує комплекс репарації дволанцюгових розривів в місце пошкодження аналогічно з локалізацією комплексів метилювання ДНК у процесі RdDM. Такий механізм спостерігався і в клітинних лініях людини, вказуючи на консервативність ролі РНКі в репарації дволанцюгових розривів ДНК. Крім того, подібні процеси відбуваються і у клітинах *D. melanogaster*, в яких розриви індукують утворення siRNA, для чого також необхідні AGO2 та DCR2, які є компонентами ендогенного шляху siRNA. Після утворення дволанцюгового розриву активується шлях DDR, який може зупиняти проліферацію клітин. Dicer- та Drosha-залежні малі РНК є необхідними для активації даного шляху у людей, мишей та *Danio rerio*. Тому ймовірно, що DDR шлях може пов’язувати

процеси РНКі та репарації ДНК, хоча специфічні функції малих РНК залишаються невідомими.

РНКі та цільова елімінацію геному. Можливо, найбільш незвичною роллю РНКі в стабільності геному є цільова елімінація геному у *Tetrahymena spp.* та *Paramecium spp*. *Tetrahymena spp*. зберігає два ядра: генеративний мікронуклеус та соматичний макронуклеус. Після утворення зиготи нове макроядро розвивається шляхом видалення ~6,000 IESs (internal eliminated sequences). Перед видаленням у хроматині, що належить до цих ділянок IESs, збільшується рівень метилювання H3K9 та з нього синтезуються 28-нуклеотидні **scan RNAs** (scnRNAs), які зв'язуються з білком Twi1 (Tetrahymena PIWI). РНК-геліказа Ema1 сприяє взаємодії між Twi1 та хроматином, зумовлюючи комплементарну взаємодію РНК, завантаженої у нього, з новоутвореними транскриптами, що відповідає ко-транскрипційній моделі. Припускають, що це призводить до поширення мітки метилювання H3K9 подібним до такого у *S. pombe* шляхом, що потім слугує міткою для елімінації ДНК в макронуклеусі.

РОЗДІЛ 3. ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ У РІЗНИХ ГРУП ОРГАНІЗМІВ

3.1. БАКТЕРІЇ. ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

Як і у еукаріот, у прокаріот метилювання ДНК включає пост-реплікативне додавання метильних груп до азотистих основ за участю ДНК-метилтрансфераз. **C^5-метилцитозини** та **N^6-метиладеніни** були виявлені і у еукаріот, і у прокаріот, тоді як **N^4-метилцитозини** характерні тільки для бактерій. У даному розділі буде розглянуто лише роль метилювання аденінів у регуляції клітинного циклу прокаріот.

Спорідненість деяких ДНК-зв'язуючих білків залежить від статусу метилювання послідовностей ДНК (метильованого, напівметильованого або повністю неметильованого). Оскільки N^6-метиладенін знижує термодинамічну стабільність та змінює кривизну ДНК, його наявність в певній послідовності можна розглядати в якості маркеру взаємодії регуляторних білків з ДНК. Рух реплікативної вилки супроводжується змінами в метилюванні ДНК внаслідок утворення двох напівметильованих сестринських хромосом та наступної активації аденін-метил-трансфераз відповідно.

Бактеріальні аденін-метил-трансферази

Dam-метилаза γ-протеобактерій. Фермент **Dam** (Deoxyadenosine methylase) має у своєму складі два домени, один з яких зв'язує донор метильної групи S-аденозил-метионін (S-adenosyl-methionine; SAM), інший ДНК. Субстратами Dam є неметильовані або напівметильовані послідовності GATC. У ході одного зв'язування з ДНК Dam метилює близько 55 аденінів у складі сайтів GATC за рахунок поступального ковзання вздовж ДНК. Гомозиготи за мутантними алелями гена *dam* не життєздатні у *Vibrio cholera* та *Aeromonas hydrophila*, а також у деяких штамів *Yersinia*, що вказує на те, що метилювання аденіну важливо для проходження клітинного циклу у цих видів бактерій. У

інших видів, таких як *Escherichia coli*, мутанти за геном *dam* виживають, проте демонструють різноманітні мутантні фенотипи.

Швидкість метилювання визначається кількістю молекул метилази та їх процесивністю разом з іншими кінетичними параметрами у контексті швидкості реплікації. Лише близько 130 молекул метилтрансферази Dam накопичується у кожній клітині *E. coli,* що призводить до зниження рівня метилювання у *de novo* синтезованій ДНК позаду реплікативної вилки. Отже, послідовність ДНК залишається напівметильованою протягом декількох хвилин після реплікації (Рис. 3.1.1). В той же час невелика кількість регуляторних сайтів GATC підтримуються напівметильованими протягом більш довгого періоду, та можуть навіть ставати неметильованими після наступної реплікативної вилки. Мінімум 25 з приблизно 20 000 сайтів GATC *E. coli* недометильовані внаслідок: 1) зв'язування білків, які захищають ці GATC-сайти від метилювання Dam, та/або 2) наявності послідовностей, які безпосередньо фланкують GATC-сайти та упереджують ре-метилювання за допомогою Dam. За надекспресії Dam новосинтезовані послідовності ДНК негайно метилюються, що знижує патогенність певних бактеріальних штамів та порушує реплікацію у *E. coli.*

CcrM-метилаза α-протеобактерій. Білок-регулятор клітинного циклу **CcrM** (cell-cycle regulated methyltransferase) був вперше описаний у *Caulobacter crescentus*, де він поступально метилює залишки аденінів у межах мотиву GANTC переважно у напів-метильованих сайтах. У *C. crescentus* існує єдиний сайт ініціації реплікації ДНК. Транскрипція гену *ccrM* та деградація білку CcrM жорстко контролюються під час клітинного циклу, так щоб CcrM накопичувався тільки перед поділом клітин, що збігається з часом закінчення реплікації бактеріальної хромосоми. Сайти GANTC стають напівметильованими після проходження реплікативної вилки та залишаються в такому напівметильованому стані аж до постсинтетичної стадії клітинного

циклу. Тривалість напівметильованого періоду певного GANTC-сайту залежить від його розміщення на хромосомі (Рис.3.1.1).

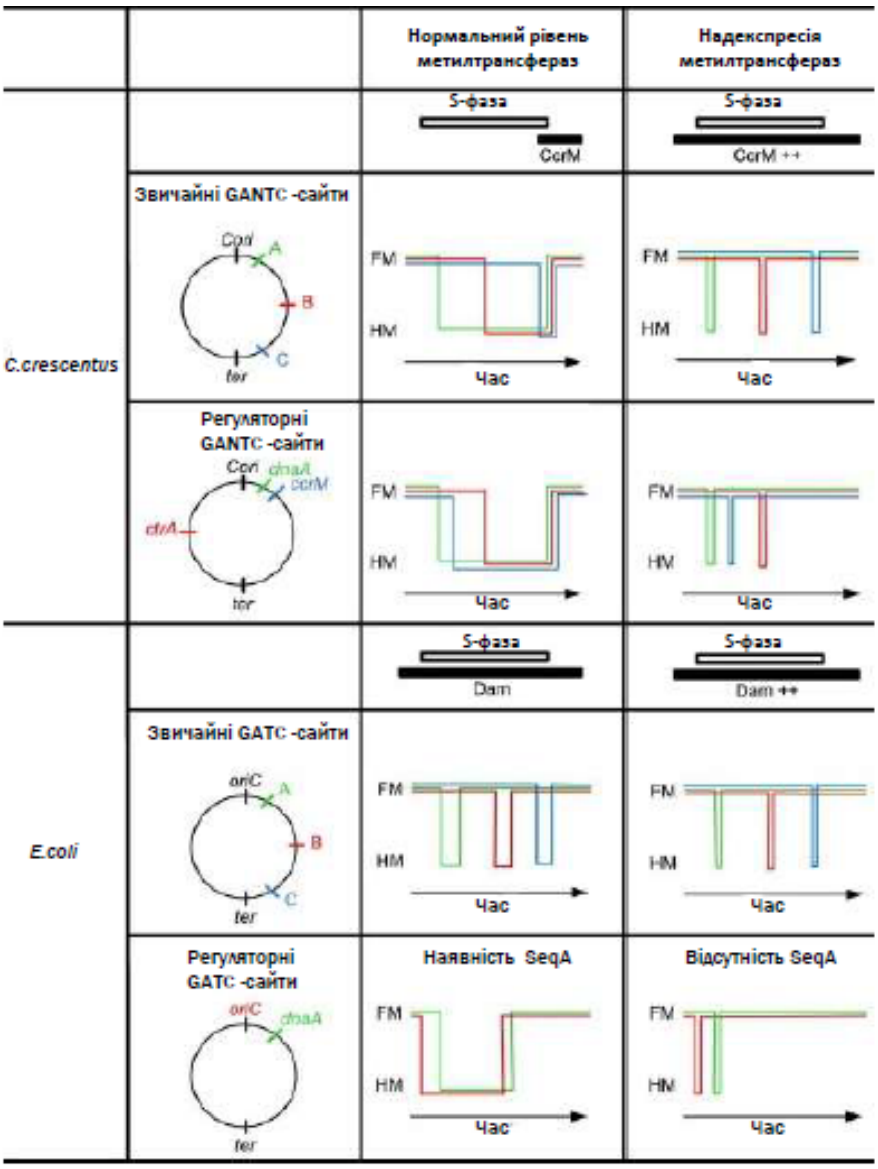


Рис.3.1.1. Часова динаміка метилювання бактеріальної хромосоми протягом S-фази (відтворено зі змінами з Colier, 2009). *Хвилі змін метильованого стану залежать від часу реплікації ДНК та активності ДНК-метилтрансфераз. У другій колонці схематично зображено бактеріальну хромосому з локалізаціями оріджинів (Cori та OriC) та термінаторів (ter) реплікації, генів dnaA, ccrM та ctrA, а також три гіпотетичні сайти метилювання A, B та C. У третій та четвертій колонках продемонстрований час реплікації ДНК (S-фаза), накопичення метилтрансфераз Dam CcrM у*

клітині та коли локуси знаходяться у напівметильованому (HM) та повністю метильованому стані (FM).

Відсутність функціонального CcrM не сумісна з існуванням таких бактерій як *C. crescentus, Agrobacterium tumefaciens* та *Brucella abortus,* що свідчить про критичну роль метилювання ДНК у контролі клітинного циклу у α-протеобактерій. Також, коли сайти GANTC протягом всього клітинного циклу підтримуються у повністю метильованому стані за рахунок надекспресії гену *ccrM* або стабілізації білка CcrM, клітина часто акумулює більше двох бактеріальних хромосом, характеризується нетиповою морфологією та зниженою пристосовуваністю.

Повногеномний аналіз метилювання аденінів у геномах α-протеобактерій *Mesorhizobium loti, Bradyrhizobium japonicum* та *A. tumefaciens*, які колонізують рослинні організми, виявив наявність стабільно неметильованих послідовностей GANTC. Відсутність метилювання в контексті вказаної послідовності може бути наслідком конкуренції між CcrM та ДНК-зв'язуючими білками. Двома такими конкуруючими кандидатами у *M. loti* є головний регулятор клітинного циклу CtrA та транскрипційний фактор NodD, які зв'язуються з певними неметильованими сайтами.

Метилювання ДНК та експресія генів у бактерій

Відомо, що метилювання ДНК регулює експресію декількох бактеріальних генів (Таблиця 3.1.1). Ці гени кодують білки або антизмістовні РНК та залучені у різноманітні процеси, включаючи і контроль клітинного циклу. Експресія вказаних генів активується або навпаки пригнічується метилюванням їх промоторних регіонів у одиничних або множинних сайтах, які інколи перекриваються з білок-зв'язуючими мотивами. Цікаво, що регуляторні сайти метилювання були виявлені перед або після +1 точки старту транскрипції (TSS). У випадку регуляції транскрипції за допомогою метилювання ДНК завжди наявні ДНК-зв'язуючі білки, які зв'язуються з промоторними регіонами

в залежності від статусу метилювання останніх. Наприклад, ДНК-зв'язуючі білки Lrp (Leucine-responsive regulatory protein) та OxyR зв'язуються переважно з неметильованими або напівметильованими регуляторними сайтами, та вони конкурують за ці сайти з метилтрансферазою Dam у *E. coli*. Тим самим білки Lrp та OxyR можуть захищати певні GANTC-сайти від повторного метилювання Dam, що могло б відбуватися після проходження реплікативної вилки. У промоторі гену *traJ* (transfer gene) у *Salmonella enterica* приєднання Lrp до напівметильованої ДНК залежить від того, в якому саме ланцюзі ДНК метильована послідовність GANTC, а отже, дві копії промоторів *traJ* після реплікації перебувають у двох різних епігенетичних станах.

Таблиця 3.1.1. **Приклади генів бактерій, які регулюються метилюванням аденіну**

Вид бактерії	**Ген**	**Кількість сайтів метилювання**	**Позиція регуляторних сайтів метилювання**	**Білки-регулятори**	**Активний стан гену**	**Функція гену**
C.crescentus	*dnaA*	2	Промотор	GcrA? DnaA?	Повністю метильований	Ініціація реплікації ДНК та регулятор транскрипції
C.crescentus	*ctrA* P1	1	Промотор	CtrA GcrA	Геміметильований	Ініціація реплікації ДНК та регулятор транскрипції
C.crescentus	*ccrM*		Промотор і нижче +1	CtrA	Геміметильований	Метилювання аденіну в сайтах GANTC
E.coli	*pap* operon	6	Промотор	Lrp Papl	Комплексна регуляція	Синтез F-пілей
E.coli	*agn43*	3	Нижче +1	OxyR SeqA	Повністюметильований	Синтез нефімбріального адгезину
E.coli	*dnaA*P2	6	Промотор і нижче +1	DnaA SeqA YccV?	Повністю метильований	Ініціація реплікації ДНК та регулятор транскрипції
S.enterica	*traJ*	2	Промотор	Lrp H-NS	Геміметильований (залежить від ланцюга)	Транскрипційний активатор кон'югації
S.enterica	*finP*	?	?	H-NS	Повністюметильований	Антизмістовна РНК, яка інгібує

						кон'югацію
S.enterica	*std* operon	3	Промотор	SeqA HdfR RosE	Неметильований	Синтез Std фімбрій

Аналіз послідовностей геному *E. coli* виявив, що GATC зосереджені частіше у промоторних регіонах, ніж у кодуючих частинах генів. Повногеномний аналіз експресії генів у штамів *E. coli* показав, що регуляція генів порушується за відсутності метилтрансферази Dam. Послідовності GATC були виявлені у промоторних регіонах більшості таких генів, що свідчить про безпосереднє регулювання їх транскрипції шляхом метилювання аденінів.

Транскрипція гену dnaA у E. coli та C. crescentus. Білок **DnaA** надзвичайно консервативний у бактерій, де він служить **ініціатором реплікації ДНК** та транскрипційним фактором. Промоторний регіон гену *dnaA* містить шість GATC-сайтів у *E. coli* та два GANTC-сайти у *C. crescentus*. У обох видів бактерій сила промотора *dnaA* залежить від метилювання цих сайтів, а саме наявність цієї модифікації в обох ланцюгах призводить до посилення експресії гену. Оскільки ген *dnaA* локалізований справа від точки початку (**ориджину**) реплікації (*origin of replication*) у *E. coli* та *C. crescentus,* то реплікація та формування напівметильованого стану відбувається зразу після ініціації реплікації. Таким чином, транскрипція гену *dnaA* зупиняється одразу після того, як білок DnaA запустив ініціацію реплікації ДНК, що синхронізує ефективність синтезу цього білка з циклом реплікації ДНК. У *C. crescentus* промотор *dnaA* підтримується у напівметильованому стані до того часу, поки метилтрансфераза CcrM не буде повторно напрацьовуватися у клітинах перед поділом. У *E. coli* промотор гену *dnaA* захищений від метилювання метилтрансферазою Dam білком SeqA, який безпосередньо зв'язується з напівметильованим промоторним регіоном *dnaA* (Рис.3.1.1). Причини того, що напівметилювання послаблює промотор гену *dnaA*, до кінця не зрозумілі. Важливо відмітити, що промоторний регіон *dnaA* і у *E. coli,* і у *C. crescentus* також містить послідовності, які здатні зв'язувати білок DnaA (так звані **DnaA-**

бокси), а продукт цього гену репресує транскрипцію *dnaA* у *E. coli,* а на цей процес загалом впливає статус метилювання ДНК.

Транскрипція гену ctrA у C. crescentus. Як і DnaA, **CtrA** є білком з подвійною функцією, який зв'язується з ориджином реплікації та з багатьма промоторами у геномі *C. crescentus*. CtrA інгібує ініціацію реплікації ДНК, його концентрація у клітині залежить від стадії клітинного циклу. Ген *ctrA* має два промотори, один з яких, *ctrA*P1, містить послідовність GANTC та регулюється метилюванням ДНК. Активність *ctrA*P1 підвищується у його напівметильованому стані після реплікації. *ctrA*P1 також активується за допомогою білка GcrA та репресується продуктом цього гена білком CtrA, що свідчить про можливість впливу метилювання на зв'язування GcrA та/або CtrA з цим промотором. Слід відмітити, що DnaA та CtrA мають протилежний вплив на ініціацію реплікації ДНК, при цьому *dnaA* активується метилюванням та репресується білком GcrA, тоді як *ctrA* репресується метилюванням та активується GcrA.

Транскрипція ccrM у C. crescentus. Третім геном, експресія якого, можливо, регулюється метилюванням ДНК у *C. crescentus*, є ген *ccrM*. Як і у випадку *ctrA,* транскрипція з промотора *ccrM* репресується CcrM. Промотор цього гену також активується білком CtrA та сайт зв'язування розміщений між двома послідовностями GANTC, одна з яких відповідає за репресію транскрипції гену.

Метилювання ДНК та реплікація і розходження бактеріальних хромосом

Регуляція реплікації, організації та розходження хромосом за допомогою Dam та SeqA. Мутанти *E. coli* за геном *dam* характеризуються порушенням експресії гена *dnaA*, що свідчить про дефекти у контролі реплікації, які можуть бути пов'язані саме з аномальним рівнем DnaA у клітинах. Проте, коли 5 з 6

послідовностей GATC у межах *ctrA*P2, з якими зв'язується білок DnaA, порушені, то реплікація такої хромосоми все ж ініціюється синхронно, що демонструє, що Dam не впливає саме на цей процес під час реплікації ДНК.

Ориджин реплікації *E. coli (OriC)* містить 11 послідовностей GATC, які не ре-метилюються метилтрансферазою Dam одразу після ініціації реплікації. Білок SeqA зв'язується з цим напівметильованим *OriC* та в свою чергу запобігає його ре-метилюванню Dam протягом приблизно третини клітинного циклу. Зв'язування білків DnaA з високо спорідненими DnaA-боксами у *OriC*, ймовірно, також сприяє підтриманню напівметильованого стану *OriC* після реплікації. У *OriC*, білок SeqA блокує зв'язування DnaA DnaA-боксами, які мають низьку спорідненість до цього білка, що сприяє обмеженню ініціації реплікації ДНК за участю DnaA одноразово за весь клітинний цикл.

Білок SeqA локалізується позаду реплікативної вилки, оскільки він здатний зв'язуватися тільки з напівметильованою ДНК. Хромосоми у клітинах *E. coli* за відсутності або надекспресії білка SeqA характеризуються порушеннями в організації, а отже, саме коректне зв'язування SeqA з напівметильованою ДНК може відповідати за ре-організацію хромосомних регіонів на постреплікативних ділянках. SeqA також необхідний для зупинки клітинного циклу в *E. coli* у відповідь на голодування, спричинене молекулами ppGpp (guanosine tetraphosphate; речовина інгібує синтез білка, що призводить до голодування).

Клітини *V. cholera* містять дві хромосоми, кожна з яких має ориджин реплікації з декількома GATC-сайтами, які, ймовірно, можуть бути захищені білком SeqA від метилювання метилтрансферазою Dam. Dam необхідна для реплікації обох хромосом, що може пояснити, чому цей ген є дуже важливим для виживання *V. cholera.*

Білок ccrM та регуляція реплікації і розходження хромосом. Якщо хромосоми *C. crescentus, B. abortus* та *R. meliloti* підтримуються повністю метильованими протягом клітинного циклу за рахунок надекспресії *ccrM,*

клітини накопичують множинні хромосоми, що вказує на численні акти ініціації реплікації ДНК. Такий фенотип може бути результатом одночасного підвищення рівня білка DnaA та зниження рівня CtrA у таких клітинах за рахунок повнометильованого стану промоторів *dnaA* та *ctrAP1* протягом клітинного циклу. Іншим поясненням може бути пряма регуляція білком CcrM ініціації реплікації ДНК за рахунок метилювання GANTC-сайтів у ориджині реплікації. Проте GANTC-сайти не є універсальними для ориджинів всіх штамів вказаних видів бактерій, що в свою чергу свідчить про те, що метилювання ориджинів не є визначальним для правильного визначення часу ініціації реплікації ДНК у *α-протеобактерій*.

3.2. ОСОБЛИВОСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ МОДИФІКАЦІЙ У ДРІЖДЖІВ

Дослідження останніх трьох десятиліть на двох видах нижчих еукаріотів, дріжджах, які розмножуються брунькуванням, *S. cerevisiae* та дріжджах, які розмножуються діленням, *S. pombe*, надали велику кількість інформації з приводу механізмів регуляції перегрупування генів та їх сайленсингу. Інформація, яка була отримана з використанням цих простих модельних систем, буде визначати напрямок майбутніх епігенетичних досліджень, включаючи дослідження еволюційно більш складних організмів.

Дріжджі *S. pombe* є надзвичайно ефективною моделлю для дослідження основних клітинних процесів. Роботи на *S. pombe* забезпечили суттєвий прогрес у розумінні регуляції клітинного циклу, про що свідчить присудження у 2001 Нобелівської премії з фізіології та медицини Паулю Ньорсу (Paul Nurse), який працював з цим об’єктом. Відомо, що багато модифікацій хроматину *S. pombe* відповідають таким у багатоклітинних еукаріот. Структурна організація центромер та асоційованих з ними модифікацій гістонів *S. pombe* є більш складною та подібною до таких у багатоклітинних організмів, ніж у *S. cerevisiae*. Крім того, даний вид має тільки 3 хромосоми та у багатьох випадках тільки одну копію генів ключових регуляторних білків. У 2002 році

дослідження на *S. pombe* засвідчили, що механізми РНК-інтерференції (РНКі) беруть участь у сайленсингу прицентромерного хроматину (обумовлюючи його гетерохроматиновий стан) та встановленню модифікацій гістонів. Даний механізм був виявлений також у низки багатоклітинних організмів.

Далі буде розглянуто основні шляхи епігенетичного регулювання активності генів у дріжджів *S. pombe.*

Метилювання ДНК у клітинах дріжджів

Питання метилювання цитозинів у клітинах дріжджів залишається дискусійним. У ранніх роботах метилювання ДНК не було виявлено. Проте пізніші дослідження за допомогою більш чутливих методів продемонстрували наявність метилювання цитозинів у геномах як *S. cerevisiae,* так і *S. pombe*. Рівень метилювання у дріжджів (в залежності від штаму від 0.014 до 0.364%) виявився на 1-2 порядки нижчим за рівень метилювання у клітинах ссавців (1-3%). Тому вважається, що епігенетичний контроль експресії генів у дріжджів здійснюється за рахунок змін у структурі хроматину.

Модифікації гістонів у *S. pombe*

Нуклеосомний повтор у *S. pombe* складає 154 пн. У дріжджів, як і у інших еукаріотів, з еухроматином асоційовані ацетилювання та метилювання лізину 4 гістону H3 (H3K4Me2/3), а гетерохроматин характеризується низьким рівнем ацетилювання та метилюванням лізину 9 гістону H3 (H3K9Me2/3). Різні модифікації гістонів формуються різними групами ферментів (Таблиця 3.2.1.). У дріжджів наявні HATs та HDAC, серед яких є як ферменти з широкою субстратною специфічністю, так і ті, які характеризуються більш вузьким колом мішеней. Так, HDAC Clr3 у *S. pombe* специфічна до гістону H3K14, тоді як HDAC Clr6 того ж організму має широкий спектр активності та здатна деацетилювати всі протестовані мітки ацетилювання. Всі гістон-метилтрасферази та гістон-деметилази мають більш вузьку специфічність до одного-двох певних лізинових залишків у складі гістонів. До складу гістон-

метилтрансфераз входить особливий **SET-домен**. Крім модифікацій канонічних корових гістонів, нуклеосоми також можуть містити інші варіанти гістонів, що впливає на властивості самих нуклеосом.

Таблиця 3.2.1. **Фактори, залучені у формування хроматину у дріжджів та їх гомологи у людини**

Тип фактору	**Організм**		
	H. sapiens	*S. pombe*	*S. cerevisiae*
Гетерохроматиновий білок, HP1	HP1α, HP1β, HP1γ	Swi6, Chp1, Chp2	відсутні
Гістон-деацетилази Гістон-деацетилаза I класу Гістон-деацетилаза II класу Гістон-деацетилаза III класу	HDAC1, 2, 3, 8 HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10 Sirtuins (SIRT1-7)	Clr6, Hos2 Clr3 Sir2, Hst2, Hst4	Rpd3, Hos1, Hos2 Hda1, Hos3 Sir2, Hst1, Hst2, Hst3, Hst4
Гістон лізин метилази Гістон-метилтрансфераза (H3K9)	SUV39H1, SUV39H2, Eu-HMTase1, G9a, SETDB1	Clr4	відсутні
Гістон лізин деметилази Гістон лізин деметилази (H3K4, H3K9) JmjCродина гістон лізин деметилаз (H3K36)	LSD1, LSD2 JHDM1A, JHDM1B	Lsd1, Lsd2 Epe1	відсутні Jhd1
Машинерія РНКі Ендонуклеаза dsRNA Невеликі РНК-зв'язуючі білки (Argonaute/PIWI родина) РНК-залежна РНК полімераза	Dicer Argonaute відсутня	Dcr1 Ago1 Rdp1	відсутні

РНК-інтерференція у дріжджів

На відміну від *S. cerevisiae*, дріжджі *S. pombe* містять машинерію РНКі (шлях процесингу та функціонування siRNAs) (Таблиця 3.2.1). Окрім беззаперечної ролі у посттранскрипційному генному сайленсингу, була виявлена участь цього шляху у встановленні гетерохроматинового (репресованого) стану певних регіонів хромосом (**ко-транскрипційний генний сайленсинг**). Хоча природа такої участі у епігенетичному сайленсингу і

механізми впливу машинерії РНКі на структуру хроматину залишаються зрозумілими не до кінця, даний процес у загальному вигляді досліджений у дріжджів. Транскрипція повторюваних послідовностей ДНК у центромерах, регіонах, що детермінують стать, та теломерах, особливо протягом S-фази клітинного циклу, запускає машинерію РНКі. Це, в свою чергу, призводить до рекрутування факторів хроматину, таких як H3K9-метилтрансфераза Clr4 та білків з хромодоменами. Сайти транскрипції та наступного накопичення ново синтезованих siRNA і є **сайтами формування гетерохроматину**. Одного разу утворившись, гетерохроматиновий стан поширюється, аж поки не досягне елементів, які здатні зупинити цей процес. У центромерних регіонах цей шлях є основним для ініціації формування гетерохроматину, тоді як існують надлишкові механізми для встановлення гетерохроматину у статевому та прителомерному регіоні. Так, у регіонах, що детермінують стать, залучення факторів сайленсингу може відбуватися за участю Atf1/Pcr1, а у прителомерних регіонах фактор Taz1 (Tafazzin 1) може ініціювати зв'язування Swi6 (хромодоменовий білок гетерохроматину у дріжджів).

Як вже зазначалося, до складу **машинерії РНКі** у *S. pombe* входить РНК-залежна РНК-полімераза (RNA-dependent RNA polymerase; Rdp1), яка синтезує на матриці одноланцюгових РНК (ssRNA) дволанцюгові РНК (dsRNA). Останні процесуються у siRNA довжиною 21-23 пн за участю рибонуклеази (RNase) III типу, ферменту, який відомий як Dicer, та завантажуються на білок Argonaute (Ago1), який входить до складу комплексу RITS (RNA-induced transcriptional gene silencing).

Якщо гени білків Dicer та Ago1 видалити з геному дріжджів, то спостерігається надмірне накопичення комплементарних транскриптів центромерних послідовностей, які повторюються, разом з втратою H3K9me у центромерному хроматині та порушенням функціонування центромер і сайленсингу трансгенів, інтегрованих у ці регіони. Нещодавно було показано, що Dicer у *S. pombe* локалізується по периферії ядра, вкриваючи таким чином внутрішню сторону ядерної мембрани, хоча при цьому він не колокалізується з

гетерохроматиновими ділянками хромосом. Крім того, вважається, що машинерія РНКі бере участь у формуванні хроматинових структур вищих за нуклеосомний рівнів, оскільки є необхідною для кластеризації теломер.

Гетерохроматин

Гетерохроматинова модифікація H3K9me2/3 встановлюється за участю декількох типів білків, які містять SET-домен, наприклад, у Drosophila це HMT Su(var)3–9. У *S. pombe* гомолог Su(var)3–9 відомий як Clr4 (Cryptic loci regulator 4). Мітка H3K9me2/3 є однією з найбільш однозначних модифікацій гістонів, оскільки вона створює сайт для зв'язування структурного компоненту гетерохроматину - білка HP1. Модифікація H3K9me2/3, і білок HP1 є високо консервативними у людини, дрозофіли та дріжджів, які діляться. У останніх білок HP1 називається Swi6. З іншої сторони, у дріжджів *S. cerevisiae* відсутні як модифікація гістонів H3K9me2/3, так і білки HP1.

Як вже зазначалося, гетерохроматин поділяють на два типи – конститутивний та факультативний. Коститутивний гетерохроматин формує важливі хромосомні структури, а саме центромери та теломери. Центромери *S. pombe* містять **коровий центромерний регіон**, який складається з центральної послідовності (central sequence; *cnt*) та двох фланкуючих **внутрішніх інвертованих повторів** (inverted inner repeats; *imr*), які повністю ідентичні та в свою чергу фланковані **прицентромерними зовнішніми повторами**, що містять багатокопійні повтори *dg* та *dh*. Такі прицентромерні повтори відсутні у дріжджів *S. cerevisiae*. У *S. pombe* за залучення когезинів, які утримують разом дві сестринські хроматиди та створюють кінетохор перед вступом до сегрегації під час мейозу, відповідає прицентромерний гетерохроматин. Як відомо, гетерохроматинове оточення ускладнює транскрипцію, проте не абсолютно. Так, у *S. pombe* низький рівень транскрипції, особливо протягом S-фази клітинного циклу, є умовою встановлення прицентромерного гетерохроматину. Цікаво, що саме білки Swi6

рекрутують білок джуманджи Epe1, який в свою чергу рекрутує RNAPII, яка транскрибує повтори *dg* та *dh* у центромерах.

Крім того, існують інші частини геному, які містять конститутивний гетерохроматин, наприклад, *S. pombe* має спеціалізований регіон у 2 хромосомі, який забезпечує можливість спарювання. У даному регіоні розміщений локус *mat1*, послідовність якого визначає статус клітин, які спарюються. Далі ми зупинимося більш детально на процесі так званого **«перемикання статі»** (mating-type switching) у дріжджів.

Встановлення статевого типу клітин

S. pombe розмножуються за допомогою поділу довгих паличкоподібних клітин на приблизно однакові за розміром сестринські клітини. У процесі росту статева диференціація цих клітин не відбувається, тому вони є стерильними і не спарюються. В умовах голодування, особливо за нестачі нітрогену, клітини починають проявляти свій статевий тип. Ті, які містять генетичну інформацію *Plus* (*P*) у специфічному локусі *mat1* (mating-type locus; *mat1-P*) мають клітинний тип (стать) P, тоді як клітини з алелем *mat1-M* демонструють клітинний тип *M* (*Minus*). Кожен локус *mat1* містить два регуляторних гени, які транскрибуються в різних напрямках. Експресія саме цих генів індукується голодуванням. Аналіз передбаченої амінокислотної послідовності *P*- та *M*-генів продемонстрував наявність канонічного гомеодоменного мотиву у першому випадку, який характерний для ДНК-зв’язуючих білків, та навність домену HMG (high-mobility group) у другому. Тільки один з двох генів кожного *mat1* необхідний для спарювання, тоді як обидва транскрипти кожного алелю необхідні для мейозу та споруляції, оскільки ці гени кодують регуляторні фактори, які контролюють багато специфічних для певного типу клітин генів.

Коли клітини обох типів зростають на плашках з бідним поживним середовищем, вони припиняють рости та затримуються на стадії G1, демонструючи свій статевий тип, та згодом зливаються (спарюються) з клітинами протилежного типу, в результаті чого утворюються диплоїдні

зиготи. Після цього протягом 2-3 днів зливаються ядра та в результаті стандартного мейозу з кожної зиготи утворюються чотири гаплоїдних мейотичних продукти, які називаються **аскоспорами**. Дві з таких аскоспор містять алелі *mat1-P*, тоді як дві інші містять алель *mat1*. Отже статевий тип клітин успадковується як менделююча ознака.

Зміни в локусі mat1 відбуваються за рахунок транспозицій ДНК. **Гомоталомні** (homothallic) дріжджі, тобто ті, які здатні до перемикання типу спарювання, і як наслідок самоспаровування з клітинами того самого штаму, продукують колонії, які містять різні за статевим типом клітини (P та M в рівних кількостях), що є результатом змін в локусі *mat1*. Виявилося, що таке перетворення відбувається за рахунок транспозиції певної послідовності з так званого «донорного локусу» *mat2/3* у активний локус *mat1*. Картування даної ділянки хромосоми показало, що локуси *mat2/3* розміщені у межах 1 сМ від *mat1*(Рис 3.2.1). Транспозиція відбувається за рахунок спрямованої у одному напрямку події конверсії генів, в результаті якої копія *mat2-P* або *mat3-M* «донорного локусу» переміщується у межі *mat1* та заміняє існуючу там послідовність. Локус *mat2* розміщений на відстані 17 кб від *mat1*, а між *mat2* та *mat3* міститься так званий **К-регіон** довжиною 10,9 кб. Штами дикого типу з стандартною конфігурацією *mat1, mat2* та *mat3* локусів характеризуються здатністю 90% їх клітин до спаровування та мейозу в умовах голодування, тому називаються h^{90} (для гомоталомних, 90% споруляції). Існують і **гетероталомні** штами, в яких наявні клітини лише єдиного статевого типу, а отже і не здатні до мейозу самі по собі. Такі гетероталомні штами є результатом спонтанних (рідких, $1x10^{-4}$ подій на поділ клітини) реорганізацій локусу *mat1*.

Оскільки у дріжджів майже не спостерігається метилювання ДНК, епігенетичний контроль *mat*-локусів відбувається за рахунок змін у організації хроматину. Одразу після описання послідовностей ДНК та транскриптів *mat*-локусів стало зрозуміло, що експресивно активним є локус *mat1,* тоді як *mat2* та *mat3* сайленсовані. Успішна репресія *mat2* та *mat3* забезпечується ефектом

положення, оскільки послідовності промоторів та кінців кодуючої частини *mat1* є ідентичними до таких у *mat2* та *mat3* локусах, Іншою незвичайною властивістю регіону *mat2/3* є тотальне пригнічення мітотичної та мейотичної рекомбінації у К-регіоні. Більш того, внесення додаткових послідовностей, наприклад, гену *ura4*, у середину чи поблизу регіону *mat2/3*, призводить до змін в їх експресії, або ж навіть до повної репресії.

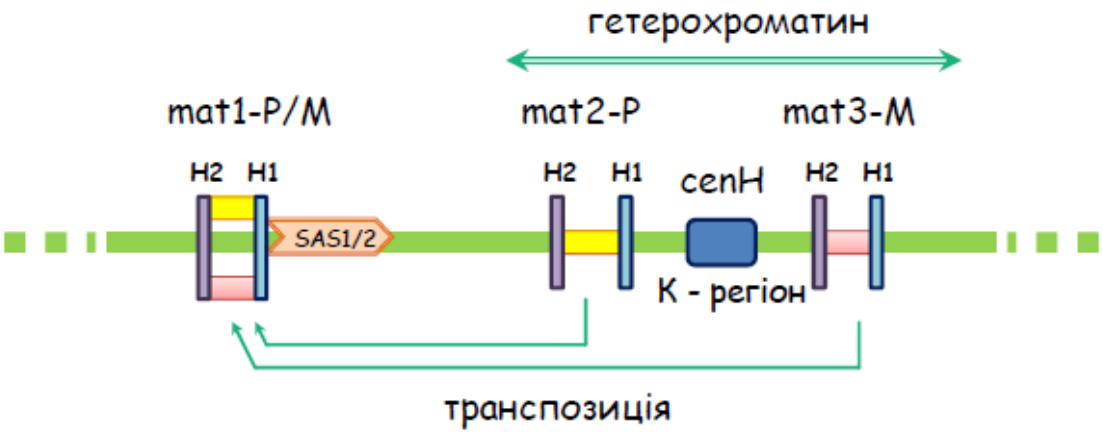


Рис. 3.2.1. Схема статевого регіону *S.pombe*.

Транс- та цис-регуляторні фактори сайленсингу mat-локусів. Як відомо, транс-регуляторними називають білкові фактори транскрипції, які регулюють активність генів. Цис-регуляторні елементи – це послідовності ДНК, які розміщені поблизу гена, у регуляції якого вони беруть участь. За допомогою генетичних досліджень вдалося ідентифікували низку **транс-факторів** та визначити їх роль у епігенетичному контролі сайленсингу регіону *mat2/3*. Були ідентифіковані гени *clr1-clr4* (від *c*ryptic *l*oci *r*egulators), *rik1* (*r*ecombination *i*n K) та *swi6*, які необхідні для сайленсингу.

Цікаво, що майже всі мутації генів, які впливають на епігенетичний контроль, спричиняють тільки часткову дерепресію донорного локусу *mat2/3*. Так, близько 5-10% гаплоїдних клітин переходять до так званого **гаплоїдного мейозу** (перехід до звичайного мейозу у дріжджів відбувається за наявності

двох активних копій локусів *mat,* які присутні у диплоїдних клітинах; гаплоїдні клітини вступають у мейоз за наявності дуплікацій цього локусу чи активації локусу *mat2/3*) у мутантних клітинах за геном *clr1*. Крім цього у цих клітинах заблокована транспозиція з локусів *mat2/3* в *mat1,* оскільки сайти SAS1 та SAS2 (switch activating sites; контролюють транспозицію локусів, розміщені у *mat1*) делетовані у статевому локус (такий алель називається *mat1-M smt0).* У той же час, якщо будь-яка з мутацій генів сайленсингу зустрічається в одному геному разом з делецією регіону довжиною 1,5 kb, який розташований зліва від *mat2*, то більше 90% клітин *mat1-M smt0* демонструють перехід до галоїдного мейозу, що відбувається в результаті дерепресії *mat2-P*. Така ситуація свідчить про наявність додаткового сигнального шляху регуляції сайленсингу локусів *mat2/3*. Секвенування геному та запровадження біоінформатичних технік пошуку генів-кандидатів дозволило ідентифікувати багато генів, участь яких у механізмі сайленсингу була підтверджена експериментально. Наприклад, делеція *hda1*, продукт якого, як передбачено, є гістоновою деацетилазою, посилює сайленсинг локусу *mat2/3*. Два інших білка, які містять хромодомен, Chp1 та Chp2 (CHromodomain Protein 1 та 2) також беруть участь у контролі сайленсингу.

Перші чотири передбачені **цис-регуляторні елементи,** розташовані поряд з локусом *mat2,* було ідентифіковано із застосуванням послідовностей, введених у плазміду. Хромосомні делеції двох з цих чотирьох елементів продемонстрували незначний вплив на репресію. Проте, ці делеції значно підвищують експресію *mat2,* коли наявні разом з мутаціями у будь-якому з генів *clr1-clr4* або *swi6.* Подібний аналіз хромосомних делецій виявив існування репресорного елемента, розміщеного в межах 500 пн з проксимального боку від *mat3.* Аналіз послідовності К-регіону довжиною 10,9 кб показав, що ділянка довжиною приблизно 4,3 кб (***CenH***) на 96% ідентична послідовності центромерних повторювальних елементів dh та dg, які притаманні центромері *S. pombe.* Цікаво, що інші маркери, інсертовані у центромеру, також сайленсуються за участі тих самих факторів, які характерні для К-регіону.

Було виявлено два ідентичні інвертовані повтори довжиною 2,1 кб, один з яких розміщений зліва, а інший справа від регіону *mat2/3*. Така сама організація статевого локусу, включаючи ці повторювальні елементи, характерна і для близького виду *Schizosaccaharomyces kambucha*. Згадані елементи слугують бар'єрами для поширення сайленсингу у регіони поза *mat2-K-mat3*.

Механізми епігенетичного контролю статевого перемикання дріжджових клітин. Регіон *mat2/3* конститутивно залишається сайленсованим та недоступним для міжхромосомної рекомбінації у мітозі та мейозі. Як було вказано вище, цей сайленсинг відбувається за рахунок епігенетичних механізмів. Вважається, що такий епігенетичний контроль забезпечується гетерохроматиновою організацією регіону *mat2/3*, яка унеможливлює доступ транскрипційним факторам до регіону цієї ділянки. Структурні мотиви, характерні для продуктів генів трансфакторів, свідчать про їх роль у організації хроматину. Один з таких мотивів називається модифікатором організації хроматину, **хромодоменом**, і був вперше ідентифікований у білках HP1 та Pc *Drosophila*. Хромодомен було виявлено у білках Swi6, Clr4, Chp1 та Chp2. Білок Swi6 також містить споріднений **хромо-шедоу** (chromo-shadow) домен. Хромо- та хромо-шедоу домени характерні для багатьох білків, які беруть участь у формуванні білкових комплексів, асоційованих з хроматином. Мутація у консервативних ділянках хромодомену білка Clr4 призводить до дефектів сайленсингу. Білок Clr4 також містить SET-домен, мутації в якому утруднюють сайленсинг. Домен SET є еволюційно консервативним, оскільки він ідентифікований також у білках *Drosophila,* таких як Su(var)3-9, енхансері Zeste та Trithorax, де він необхідний для стабільного підтримання специфічних станів експресії генів протягом розвитку. Clr4 демонструє високу гомологію з послідовністю білка Su(var)3-9. Обидва гени кодують H3-метилтрансферази, які вибірково метилюють лізин 9 на N-кінці гістону H3 (H3K9me) *in vitro*. Крім того, у дріжджів, які розмножуються поділом, були ідентифіковані ортологи факторів сайленсингу MAR1/SIR2 *S. cerevisiae*.

Гени *clr3, clr6* та *Hda1* (*histone deacetylase* 1*)* кодують гістон-деацетилази, які впливають на організацію хроматину та, внаслідок цього, на механізм сайленсингу. Було показано, що рекрутування Swi6 до регіону *mat2/3*, центромер та теломер, залежить від Rik1 та Clr4 білків. А поширення епігенетичних міток підтримується компонентами хроматину, такими як Swi6.

Контроль сайленсингу – це динамічний процес, який забезпечується балансом позитивного та негативного регулювання. Так, мутація у гені ферменту Rhp6, який взаємодіє з убіквитином, викликає порушення сплайсингу мРНК, що призводить до зниження сайленсингу у локусі *mat2/3* штамів, які змінюють *mat1*, а у штамів *smt0*, які не здатні до зміни статевого типу, такого ефекту мутації не спостерігається. Білок Rhp6 відіграє роль у постреплікативній репарації ДНК за рахунок убіквітинювання білків, зокрема гістонів. Можливо, що у цих мутантів порушене відновлення сайленсингу після копіювання локусу *mat2/3* з наступною транспозицією копії у локус *mat1*. Однак, таке порушення не спостерігається при подвоєнні цієї ділянки ДНК за реплікації. Делеція гена *hda1*, який кодує гомолог гістон-деацетилази, викликає підвищення сайленсингу центромерного регіону. Отже, наведені приклади свідчать про часткове дублювання функцій в системі сайленсингу.

РНК-інтерференція та сайленсинг локусу mat2/3. Нещодавно стало зрозуміло, що машинерія РНКі залучена і у сайленсинг регіону *mat2/3*. Як вже зазначалося, у К-регіоні було виявлено центромерні повтори *dg* та *dh* у послідовності довжиною 4,3 кб – регіон *cenH*. Даний регіон є РНКі-залежною точкою ініціації формування гетерохроматину, який поширюється потім і на весь локус *mat2/3,* включаючи інвертовані повторювальні елементи, які його фланкують. При введенні у К-регіон маркерного гену та одночасній делеції регіону *cenH* спостерігається експресія маркерного гену, проте донорний локус залишається неактивним. І дійсно, роль РНКі у сайленсингу цього регіону дублюється іншим незалежним механізмом, який потребує залучення транскрипційного фактору Atf1, що ініціює формування гетерохроматину у

іншому сайті К-регіону поза *cenH* та без участі Swi6 і Clr4. Було показано, що Clr4 спричинює модифікації H3K9me у хроматині, що, у свою чергу, забезпечує формування сайту-зв'язування для хромодоменних білків Swi6/HP1 та Chp2, які стимулюють подальше поширення метилювання гістонів та залучення Swi6 у регіон, який визначається певними елементами. У свою чергу Swi6 також рекрутує HDACs, які деацетилюють гістони. Мультиферментний ефекторний комплекс SHREC (Snf2/Hdac-containing Repressor Complex), до складу якого входять білки Clr1, Clr2, Clr3 та Mit1, виконує деацетилювання за рахунок активності Clr3 та рекрутується до гетерохроматинових регіонів статевого локусу, центромер та теломер. Парадоксально, що для підтримання сайленсингу у регіонах, які містять центромерні повторювальні послідовності, необхідна транскрипція повторів для забезпечення нормальної кількості siRNA. Однак була ідентифікована мутація, яка призводить до поширення сайленсингу за межі вказаного регіону. Цей фактор, Ере, необхідний для транскрипції центромерних повторів у сайленсований регіонах. Ере1 містить домен jmjC, який зазвичай знаходять у білках, що відповідають за деметилювання гістонів. Отже, баланс протилежних хроматин-модифікуючих активностей формує основу підтримання гетерохроматину. Повногеномні дослідження виявили низку регіонів, на які мають вплив як РНКі-залежний, так і РНКі-незалежний механізми сайленсингу.

Загалом показано, що багато з транс-факторів, участь яких була спочатку ідентифікована у сайленсингу регіону *mat2/3,* необхідні для сайленсингу центромерних та теломерних послідовностей.

3.3. ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ У *Drosophila*

Метилювання ДНК у *Drosophila*

До недавнього часу вважалося, що метилювавння геномної ДНК у *Drosophila* повністю відсутне. Такий висновок базувався на тому факті, що більшість дослідників зазнавали невдачі у намаганнях детектувати метильовані

основи у геномі плодових мух. Отже, припускалося, що дрозофіли належать до виняткової групи організмів, разом із дріжджами та нематодами, у яких немає епігенетичних модифікацій ДНК, характерних для представників різних видів від бактерій до людини. Вказані виключення обумовили припущення, що метилювання ДНК може бути необов'язковим для менш складних геномів або для геномів з неканонічними центромерними послідовностями. Проте, геном дрозофіли не можна визнати простим, а його центромерна організація притаманна широкому колу організмів, включаючи людину. Крім того було показано, що метилювання ДНК наявне у низки інших видів комах.

Секвенування геному *Drosophila* показало наявність одного гену-кандидату, ДНК-метилтрансферази, яка відноситься до родини Dnmt2 еукаріотичних ДНК-метилтрансфеаз. Коли у *Drosophila* був вперше описаний ген *Dnmt2,* припустили, що білок Dnmt2 є ферментативно неактивним. Таке передбачення базувалося головним чином на тому факті, що ДНК-метилтрансферазна активність цього білка не була виявлена *in vitro*. Тим не менш, білки Dnmt2 загалом є надзвичайно еволюційно консервативними, а їх каталітичний ДНК-метилтрасферазний домен демонструє повну консервативність. Виключення складає тільки гомолог Dnmt2 дріжджів, які розмножуються поділом, оскільки містить інсерційну мутацію в одному з головних каталітичних мотивів. Цікаво, що при видаленні цієї інсертованої амінокислоти спостерігається втрата каталітичної активності. Вищевикладені факти свідчать, що білки Dnmt2 являють собою активні ДНК-метилтрансферази.

Наявність гену ймовірної ДНК-метилтрансферази у геномі *Drosophila* дозволило припустити, що метилювання ДНК у цього організму могло не детектуватись в минулому в силу методичних причин. У додаткових експериментах було показано, що *Dnmt2* характеризується різними рівнями експресії у процесі розвитку, з найвищим рівнем мРНК в ранньому ембіогенезі. Таким чином ембріональні особливості метилювання ДНК у *Drosophila* не можна екстраполювати на інші стадії розвитку мушки. Подібне обмеження

також стосується і інших досліджень, які демонструють відсутність метилювання у імаго дрозофіл. Хроматографічний аналіз геномної ДНК ембріонів ранніх стадій дійсно виявив низький, проте реальний рівень метилювання цитозинів. Цікаво, що більшість 5-метилцитозинів була виявлена у контексті динуклеотидів CpT/A. Таке відкриття представляє значний інтерес, оскільки це означає, що метилювання ДНК у *Drosophila* не підтримується за рахунок симетричного метилювання динуклеотидів CpG. Отже, у попередніх дослідженнях не вдавалося ідентифікувати метилювання CpG саме через те, що ця модифікація у дрозофіли стосується іншої пари динуклеотидів. Крім того, на відміну від клітин хребетних, які зазвичай стабільно підтримують свій патерн метилювання протягом розвитку, метилювання ДНК у *Drosophila* видається тимчасовим епігенетичним сигналом, притаманним лише раннім стадіям розвитку.

Особливості ДНК-метилтрансфераз родини Dnmt2. Родина білків Dnmt2 відома низкою характерних ознак: 1) Вона є найбільш консервативною родиною еукаріточних ДНК-метилтрансфераз, гомологи яких описані у низки організмів, від найпростіших до людини. 2) Білки Dnmt2 характеризуються компактною структурою, яка схожа на структуру бактеріальних метилаз. 3) Dnmt2 у своєму складі містять тільки ДНК-метилтрансферазний каталітичний домен, у них відсутні довгі регуляторні домени як у інших еукаріточних ДНК-метилтрансфераз. Оскільки геном *Drosophila* містить лише Dnmt2, то очевидно, що вони необхідні та достатні для метилювання ДНК. Якщо Dnmt2 виключити за допомогою РНКі, метилювання ДНК у ембріонів повністю втрачається. Якщо ж Dnmt2 надекспресується у імаго, то спостерігається достовірне гіперметилювання. Таким чином Dnmt2 є єдиною ДНК-метилтрансферазою *D. melanogaster*. Ознаки іншого ферменту обмежуються виявленням невідомого білка за допомогою специфічних до Dnmt1 антитіл та не можуть бути обумовленими наявними послідовностями геному. Отримані дані показують, що ДНК дрозофіли метилюється на низькому рівні за участю Dnmt2 під час

ембріогенезу. Ці характеристики формують головні відмінності від системи метилювання ДНК ссавців, яка сильно залежить від роботи ферментів Dnmt1 та Dnmt3, які є надзвичайно активними на пізніх стадіях розвитку організму. Тим не менш, висока консервативність білків Dnmt2 вказує на те, що вони є предковими ДНК-метилтрансферазами еукаріот, а також що білки Dnmt1 та Dnmt3 з'явилися у ході еволюції пізніше. На додаток, існують більш очевидні докази еволюційної консервативності системи метилювання за участі Dnmt2: геноми *Drosophila psedoobscura* та *Anopheles gambiae* також містять єдиний передбачуваний гомолог ДНК метилтрансфераз, який належить до родини Dnmt2. Ембріони *D. psedoobscura* та *A. gambiae,* як виявилося, також демонструють низькі, але достовірні рівні 5mC. Отже, система метилювання Dnmt2 видається консервативною принаймні протягом останніх 250 млн років, за які відбулася дивергенція *D. melanogaster* та *A. gambiae.*

У світлі високої еволюційної консервативності білків Dnmt2 дуже цікаво визначити функції метилювання за їх участю. Ембріональні клітини мишей з порушеним геном *Dnmt2* нормально проліферують та не демонструють виражених фенотипових змін. Виявлено, що нокдаун Dnmt2 за допомогою РНКі не змінює життєздатності ембріонів *Drosophila.* Проте, присутність модифікованих фенотипів на постембріональних стадіях свідчить про те, що метилювання ДНК необхідне для поки що невідомих клітинних функцій.

Метилювання ДНК та структура хроматину

У *Drosophila* встановлено взаємозвязок між метилюванням ДНК та метилюванням гістонів. Як вже зазначалося, у дрозофіл гістон-метилтрансфераза Su(var)3-9 специфічно метилює лізин 9 у складі гістону Н3 (Н3К9). У личинок, мутантних за геном *Su(var)3-9,* спостерігається суттєве зменшення центромерного хроматину, що скоріше за все пояснюється недометилюванням хвостів гістонів на цих ділянках хромосом. Проте нульові мутанти *Su(var)3-9* є життєздатними та фертильними, так само як і миші з виключеними генами, гомологічними генам *Suv39h1* та *Suv39h2* дрозофіли.

Імунофлуорисцентне пофарбування ембріонів нульових мутантів *Su(var)3-9* продемонструвало різке зниження до повної відсутності метилювання ДНК, що свідчить про консервативність взаємозвязків між метилюванням ДНК та метилюванням гістонів.

Крім того, метилювання гістонів відіграє важливу роль у передачі епігенетичної інформації стосовно метилювання ДНК та репресованих конформацій хроматину. Ектопічна експресія ДНК-метилтрансферази мишей DNMT3a у *Drosophila* призводить до летальності, а на рівні хромосом загиблі особини характеризуються нерівномірною конденсацією хроматину та порушенням регуляції модифікування гістонів. Однак особини можуть вижити, якщо ектопічна експресія DNMT3a відбувається у мутантів за геном *Su(var)3-9*. Ці результати, разом із даними по *Arabidopsis,* у якого робота ДНК-метилтрансферази залежить від активності гістон-метилтрансферази, свідчать про комплексну та двосторонню взаємодію метилювання ДНК та метилювання хвостів гістонів.

Метил-ДНК-зв'язуючий білок MBD2/3

Епігенетична інформація, закодована метилюванням ДНК, повинна бути переведена «на мову» специфічних хроматинових структур як з метою репресії генів, так і задля встановлення певної геномної компартменталізації. У хребетних цю функцію виконує родина білків, які специфічно зв'язуються з метильованими динуклеотидами CpG за рахунок наявності в них метил-CpG-зв'язуючого домену (methyl-CpG binding domain; MBD). Першим ідентифікованим метил-ДНК-зв'язуючим білком був MeCP2 у людини. Точкова мутація у межах домену MBD у MeCP2 призводить до розвитку синдрому Ретта, порушення розвитку дитячої нервової системи. Було показано, що MeCP2 взаємодіє з корепресорним комплексом SIN3. До цього комплексу входить корепресор SIN3 та інші білки, серед яких гістон-деацетилази HDAC1 та HDAC2. Подібні взаємодії були описані також для іншого представника родини білків MBD, MBD2. MBD2 рекрутує комплекс MI-2/NuRD (nucleosome

remodeling and histone deacetylase) до метильованих сайтів ДНК. Останній комплекс також характеризується гістон-деацетилазною активністю, а також АТФ-залежною ремодулюючою нуклеосоми активністю, яка опосередкована MI-2.

Геном *Drosophila* містить гомологи всіх субодиниць комплексу NuRD хребетних, багато з який є критичними для розвитку плодової мушки. Мутанти *MI-2 Drosophila* гинуть на першій або другій личинковій стадії, що свідчить про важливість MI-2 у процесі ембріогенезу. Гістон-деацетилаза RPD3, яка входить до комплексу NuRD *Drosophila,* важлива для нормальної сегментації ембріонів. У геномі плодової мушки також міститься ген, який кодує білок з метил-ДНК-зв'язуючим доменом, означений як MBD2/3. Цей білок демонструє більш ніж 70%-ну подібність до метил-CpG-зв'язуючих білків хребетних MBD2 та MBD3. У результаті альтернативного сплайсингу гену утворюються дві різні ізоформи білка - довга та коротка. Довга ізоформа містить три різних домени: метил-ДНК-зв'язуючий домен, специфічний для *Drosophila* та суперскручений домен (coiled-coil domain), тоді як у складі короткої ізоформи відсутні специфічний для *Drosophila* домен та частина метил-ДНК-зв'язуючого домену. Довга ізоформа ідентифікується протягом раннього та середнього ембріогенезу, тоді як короткий білок спостерігається у середньому та пізньому ембріогенезі. Експресія цього білка не виявлена на пост-ембріональних стадіях. Таким чином, функціонування MBD2/3 спостерігається практично одночасно з роботою Dnmt2 та наявністю метильованої ДНК у геномі *Drosophila.*

Було показано, що MBD2/3 функціонує як транскрипційний корепресор. Також було продемонстровано, що обидві ізоформи MBD2/3 репресують транскрипцію, можливо, за рахунок рекрутування деацетилаз гістонів та ремодулюючої нуклеосоми активностей. Асоціація MBD2/3 з RPD3 та MI-2 була передбачена на основі експериментів щодо ко-імунопреципітації. Біохімічне фракціонування білкового екстракту також засвідчує присутність MBD2/3 у складі комплексу MI-2/NuRD дрозофіл.

Отже, білок MBD2/3 пов’язаний з ДНК протягом ембріогенезу. Під час поділів-дроблення та стадії синцитіальної бластодерми білок не пов'язаний з ДНК. Ці патерни сильно змінюються на стадії клітинної бластодерми, коли білок формує яскраві осередки, які точно колокалізуються з ДНК. Більше того, білок MBD2/3 також пов’язаний з активованою Y-хромосомою у первинних сперматоцитах. Тут білок формує виражені ядерні острівці, тоді як такий сигнал не детектується у мутантів з відсутньою активною Y-хромосомою. Ці дані вказують на те, що білок MBD2/3 може бути залучений у епігенетичну регуляцію геному *Drosophila* протягом великомасштабної геномної активації.

Подібно до мишей, у яких виключені гомологічні гени, нульові мутанти *MBD2/3 Drosophila* є життєздатними та фертильними, проте демонструють дефекти сегрегації хромосом, що свідчить про важливу роль MBD2/3 у стабілізації прицентромерного гетерохроматину. Крім того, встановлена роль MBD2/3 у рекрутуванні комплексу MI-2 на ДНК, подібно до хребетних. Проте остаточної відповіді на питання про подібність функцій білків MBD2/3 *Drosophila* та MBD2 ссавців не має, особливо неоднозначною є метил-ДНК-зв’язуюча властивість MBD2/3. Експерименти по зв’язуванню вказаного білка з CpG були безрезультативними, але використання метильованих цитозинів у контексті CpA та CpT засвідчило специфічне зв’язування з довгою ізоформою білка MBD2/3, але не з його короткою ізоформою. Більше того, експериментальне деметилювання геному дрозофіли за рахунок РНКі вимкнення ДНК-метилтрансферази Dnmt2 або обробки інгібітором ДНК-метилтрансфераз 5-азацитидином призводить до дисоціації MBD2/3 та ДНК. Ці результати надають додаткових доказів функціональній схожості білків MBD2/3 *Drosophila* та MBD2 ссавців.

Регуляція експресії генів білками груп Polycomb та Trithorax

Білки груп Polycomb (Polycomb group; PcG) та **Trithorax** (Trithorax group; TrxG) були вперше ідентифіковані як компонети регуляторної системи, яка підтримує активний стан гомеозисних генів (*Hox) Drosophila*. Продукти

генів *Hox* необхідні для детермінації сегментів. Рівень їх експресії встановлюється у ранньому ембріогенезі за участю регуляторів транскрипції, які кодуються **генами материнського ефекту та сегментації**. Зі зниженням експресії генів сегментації протягом середнього ембріогенезу білки PcG та TrxG беруть на себе та продовжують підтримувати сайленсовані та активні стани, відповідно, протягом всіх наступних періодів розвитку. На сьогоднішній день зрозуміло, що білки PcG та TrxG регулюють експресію генів *Hox* всіх багатоклітинних організмів від *C. elegans* до ссавців. Окрім *Hox* генів у PcG та TrxG ідентифіковані додаткові гени-мішені. Крім того, встановлено роль білків PcG та TrxG у інактивації X-хромосоми ссавців, розвитку раку та визначенні долі стовбурових клітин.

Комплекси білків PcG та TrxG функціонують як антагоністи, що неодноразово було підтверджено експериментально. Це виявляється у балансі двох хроматинових міток – метилювання H3K27, встановлення якого каталізується комплексами PcG, та метилювання H3K4, опосередковане певними комплексами TrxG.

Обидві групи білків, PcG та TrxG, працюють як мультисубодиничні білкові комплекси, змінюючи структуру хроматину в місцях розташування цільових генів. Генетичні дослідження на *Drosophila* дозволили виявити низку *цис*-регуляторних елементів довжиною декілька сотень пн, які називаються **PcG-відповідаючі елементи** (PcG response elements; PREs) або **модулі клітинної пам'яті** (cellular memory modules; CMMs). Ці елементи відповідають за зв'язування білків PcG з ДНК та забезпечують таким чином підтримання стану транскрипційної репресії відповідного гену. Незважаючи на невелику кількість генетично ідентифікованих цільових локусів білків PcG та TrxG, вони зв'язуються з більш ніж 200 хромосомними локусами на політенних хромосомах. Проте через низьку роздільну здатність хромосомного цитологічного картування неможливо зробити висновок про точну локалізацію PREs та відповідні чутливі до PcG/TrxG гени. Останнім часом з'явилися нові алгоритми, які дозволяють на повногеномному рівні прогнозувати локалізацію

PREs у *Drosophila*. За допомогою такого біоінформаційного підходу було ідентифіковано 167 передбачених PRE та генів, які ймовірно регулюються ними (Таблиця 3.3.1.). Вони можуть локалізуватися на відстані десятків кілобаз вище або нижче цільового промотора, у межах інтронів або у багатьох випадках поряд з сайтом початку транскрипції. Оскільки PREs можуть бути локалізованими на відстані десятків кілобаз від ефекторних генів, але тільки частина передбачених PREs збігаються безпосередньо з послідовностями ідентифікованих генів, функціональні взаємовідносини між цими генами та новими PREs залишаються нерозкритими. Тим не менш, ці дані надають нове розуміння можливому, більш широкому спектру сигнальних шляхів, які регулюються групами білків PcG та TrxG, та потенційно мають виявити нову інформацію про системи у ссавців, у яких дотепер не ідентифіковано послідовності PRE.

Таблиця 3.3.1. **Класи передбачуваних PcG/TrxG–регульованих генів**

Кількість генів	Молекулярні функції/процес протягом розвитку
26	Транскрипційні фактори (10 гомеодомен-вмісних білків)
7	Визначення шляху розвитку окремих клітин ембріона
10	Овогенез
27	Пізня специфікація клітин (розвиток нервової системи - 13), (розвиток ока - 10)
2	Гени-упресори пухлин (p53 подібні транскрипційні фактори)

Комплекси TrxG. Більшість білків TrxG була вперше виявлена у *D.melanogaster* в якості супресорів мутацій PcG. Відповідно до виявленого генетичного антагонізму білки TrxG загалом функціонують як активатори транскрипції. З даними білками та їх комплексами пов’язують низку хроматин-модифікуючих активностей, а саме метилювання H3K4, ацетилування гістонів

та АТФ-залежне ремоделювання нуклеусом (Таблиця 3.3.2). Крім того, деякі гістонові деметилази також можуть бути віднесені до білків TrxG.

Важливим питанням є те, як саме діють білки TrxG: протидіють PcG або функціонують як загальні активатори транскрипції, які важливі також і для активації генів-мішеней PcG. Так, білок Kohtalo входить до складу медіаторного комплексу *D. melanogaster*, який функціонує повсюдно у процесі активації транскрипції, об'єднуючи транскрипційні активатори та РНК-полімеразу. Інший білок цієї групи, Kismet, відіграє розповсюджену роль в якості загального активатору транскрипції. Проте деякі білки TrxG можуть безпосередньо впливати або підлягати впливу PcG.

Таблиця 3.3.2. **Білки групи Trithorax у *D. melanogaster***

TrxG білки *D. melanogaster*	**Гомологи у ссавців**	**Біохімічна роль**
Trithorax	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia proteins 1-3	Субодиниця, яка містить SET домен, метилтрансферази H3K4
Absent small and homeotic disks protein 1 (ASH1)	ASH1-like	Субодиниця, яка містить SET домен, метилтрансферази H3K4та/або H3K36
Brahma (BRM)	BRM (відомий як SMARCA2) та BRG1(відомий як SMARCA4)	АТФазна субодиниця комплексу ремоделювання нуклеосом типу SWI/SNF
Kismet	Chromodomain helicase DNA-binding protein 7	АТФазна субодиниця передбачуваного комплексу ремоделювання нуклеосом, який бере участь у елонгації транскрипції
Nejire (також відомий як CBP)	?	Субодиниця комплексу TAC1, який обумовлює ацетилювання гістонів

*Комплекси PcG та TrxG***.** Молекулярні механізми регуляції генів групою білків PcG/TrxG остаточно ще не з'ясовані. Найголовнішими з невирішених питань є наступні: 1) що конкретно є мішенню білків PcG та TrxG, 2) які механізми їх епігенетичного успадковування в процесі реплікації ДНК та

мітозу, та 3) як поєднуються їх протидіючі та перехресні регуляторні (cross-regulatory) активності. Біохімічне очищення та характеристика комплексів PcG та TrxG дозволили ідентифікувати супроводжуючі ензиматичні активності цих комплексів та надали нового розуміння їх антагоністичним функціям та тому, як саме вони створюють епігенетичні сигнали, які підтримуються протягом мітозу та реплікації ДНК.

У *Drosophila* було виявлено два фізично та функціонально різних класи комлексів PcG (Таблиця 3.3.3). **Репресивний комплекс Polycomb 1** (Polycomb repressive complex 1; PRC1) та пов'язаний з ним хроматин-асоційований комплекс сайленсингу гомеозисних генів (chromatin-associated silencing complex for homeotics; CHRASCH) містять білок PcG групи, який отримав назву Polycomb (Polycomb protein; PC). Асоційовані з цими комплексами білки групи Polycomb наявні у *Drosophila* та хребетних, проте не ідентифікуються у рослин та *C. elegans*. Інший комплекс (PRC2) містить у якості основних компонентів білки групи Polycomb Extra sex combs (ESC), Enhancer of zeste [E(Z)] та Suppressor of zeste 12 [SU(Z)12]. Ці білки були виявлені у всіх модельних багатоклітинних організмів від рослин до ссавців. Далі ми зупинимося на молекулярних взаємодіях та ферментативних активностях комплексів PcG та асоційованих з ними білків, а також будемо співвідносити їх з відомими антагоністичними активностями білків TrxG.

Таблиця 3.3.3. **Компоненти корових комплексів PRC1 та PRC2 у *D. melanogaster* та людини**

Субодиниці комплексів у *D. melanogaster*	**Характерні домени**	**Гомологічні субодиниці у людини**
Polycomb repressive complex 1 (PRC1)		
E3 ubiquitin-protein ligase RING1 (також відомий як Sce)	RING	RING2 (також відомий як RING1B та RNF2) та RING1 (також відомий як RING1A та RNF1)
Posterior sex combs (Psc) та Suppressor of zeste 2 (Su(z)2)	RING	BMI1 (також відомий як PCGF4) та MEL18 (також відомий як PCGF2)
Polyhomeotic-proximal (Ph-p) та Polyhomeotic-distal (Ph-d)	Sterile α-motif (SAM) та цинковий палець	Polyhomeotic-like protein 1 (PHCl; також відомий як

		EDR1). PHC2 (також відомий як EDR2) and PHC3 (також відомий як EDR3)
Polycomb (Pc)	Chromodomain	Chromobox protein homologue 2 (CBX2), CBX4, CBX6, CBX7 ата CBX8
Sex comb on midleg (Scm)	Malignant brain tumor (MBT), SAM та цинковий палець	Sex comb on midleg homologue 1 (SCMH1) та Sex comb on midleg-like protein 2 (SCML2)
Polycomb repressive complex 2 (PRC2)		
Enchancer of zeste (E(z))	SANT, CXC та SET (Su(var)3-9 – Enchancer of zeste - Trithorax)	Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2; також відомий як KMT6) та EZH1
Extra sex combs (Esc) та Extra sex combs-like (Escl)	WD40	EED
Supressor of zeste 12 (Su(z)12)	Zinc-finger та VEFS (VRN2-EMF2-FIS2-Su(z)12)box	SUZ12
Chromatin assembly factor 1 subunit Caf 1	WD40	Histone-binding protein RBBP4 (також відомий як RBAP48) та RBBP7 (також відомий як R8AP46)
Jing	Цинковий палець	Zinc-finger protein AEBP2

Комплекси PcG, які містять білок Polycomb, та компактизація хроматину. Коровий склад **PRC1**, виділеного з ембріонів *Drosophila* та клітин людини HeLa, є консервативним, хоча комплекси *Drosophila* мають додаткові другорядні білки (Таблиця 3.3.3). Відповідно до гіпотези, згідно з якою комплекси PcG репресують активність генів за рахунок впливу на структуру хроматину, очищений PRC1 інгібує ремоделювання хроматину комплексом SWI/SNF (hSWI/SNF) людини *in vitro*. Комплекс hSWI/SNF є гомологом комплексу Brahma (BRM) *Drosophila*, великої АТФ-залежної ремодулюючої хроматин молекулярної машини, яка містить білки TrxG, BRM, Moira (MOR), OSA, та SNR1. Відтворений рекомбінантний PRC1 коровий комплекс (PRC1 core complex; PCC), який складається з чотирьох корових компонентів – **PC, Polyhomeotic (PH), Posterior sex combs (PSC) та dRING/Sex combs extra (SCE)**, - також інгібує ремоделювання та репресує транскрипцію з штучно створеного фрагменту хромосоми.

Результати інкубації зразка хроматину з PRC1 свідчать, що цей комплекс не інактивує SWI/SNF, а безпосередньо модифікує хроматиновий субстрат, що

призводить до неможливості його ремоделювання. Компактизація хроматину відтвореного фрагменту ДНК з нуклеосомами, опосередкована коровим комплексом PRC1 (PCC), досліджувалась електронно-мікроскопічно. Після інкубації такого фрагменту з PCC, релаксована конформація у вигляді «бісеру на нитці» перетворювалася на компактну структуру, у якій не можливо було ідентифікувати окремі нуклеосоми. Виявлена таким чином компактизація хроматину була не пов'язана з хвостами гістонів та не опосередковувалась лінкерною ДНК, проте це не дозволяє виключити важливої ролі хвостів гістонів у регуляції експресії генів за участі PcG/TrxG *in vivo*. Ключову роль у інгібуванні ремоделювання хроматину та транскрипції *in vitro* відіграє компонент комплексу Posterior sex combs (PSC), тоді як Polyhomeotic (PH) є несуттєвим для таких функцій PRC1. Крім того, було показано, що саме C-кінцевий домен PSC необхідний для компактизації хроматину та інгібування ремоделювання хроматину та транскрипції.

Іншою функцією *in vitro* корового комплексу PRC1 мишей та *Drosophila* є стабілізація вторинної структури хроматину. Як вже зазначалось, PREs сайти зв'язування білків групи *Polycomb* можуть бути розміщені на відстані десятків кілобаз від генів, активність яких вони регулюють. Проте білки PcG ідентифікувалися і біля промоторних регіонів. Крім того, передбачення сайтів зв'язування білків PcG у *Drosophila* продемонструвало гіпотетичну наявність таких сайтів біля або навіть у промоторах генів, які містять PRE. Така ситуація вказує на механізм поширення ефекту сайленсингу білків групи *Polycomb* шляхом одночасної взаємодії зв'язаних з PRE білків з промоторами відповідних генів. Взаємодія PcG з промоторами була пізніше засвідчена наявністю асоційованих з промотором факторів, подібних до TBP (TATA-box binding protein), та деяких TBP-асоційованих факторів (TAFs) як додаткових компонентів комплексів PRC1, виділених з ембріонів *Drosophila*. Такими додатковими компонентами ймовірно є білки Polyhomeotic та Polycomb, які колокалізувалися разом з базальними транскрипційними факторами TFIIB та TFIIF у промоторах *Hox* генів у ембріонах *Drosophila*.

Також разом з PRC1 *Drosophila* були виділені два додаткові білки групи *Polycomb* - **Sex comb on midleg (SCM) та Zeste**. Білок Zeste є специфічним до послідовності ДНК-зв'язуючим білком, який пов'язаний як з опосередкованим PcG генним сайленсингом, так і з опосередкованою TrxG активацією генів. Цей білок локалізується у багатьох сайтах зв'язування білків *Polycomb* на політенних хромосомах, також показана його участь у підтримані репресованого стану хроматину. Включення білка Zeste у рекомбінантний коровий комплекс PRC1 підвищує інгібіторну активність цього комплексу та опосередковує вибір ним зразків, які містять сайти зв'язування цього білка. В той же час, на противагу вказаній властивості, білок Zeste може залучатися до активованих мінімальних сайтів зв`язування (PRE) гену Fab-7, що, у свою чергу, призводить до зв'зування ремоделюючого комплексу Brahma і веде до активації генів.

Спроба виявити білковий комплекс, який відповідає за убіквітинювання гістону H2A, з клітин HeLa людини призвела до ідентифікації ще одного комплексу PcG, який містить білки Ring1 та Ring2, Bmi1 та HPH2 (гомологи dRing/SCE, корового комплексу PSC та Polyhomeotic відповідно). Через подібність цього комплексу до PRC1 *Drosophila* (наявні всі компоненти крім білка *Polycomb*) його назвали PRC1-подібний комплекс людини. Було виявлено, що dRing/SCE та Ring2 є убіквітинлігазами E3 (тип убіквітинлігаз), які каталізують приєднання убіквітину до 119 лізину гістону H2A. Точкова мутація у домені RING білка dRing/SCE *Drosophila*, яка веде до втрати його ферментативної активності, призводить до дерепресії гену *Ultrabithorax* (один з *Hox* генів *Drosophila*) у імагінальних дисках крила. Оскільки dRing/SCE є коровим компонентом комплексу PRC1, то не дивно, що PRC1 також демонструє здатність до убіквітинювання гістону H2A.

З клітинної лінії *Drosophila* було виділено ще один комплекс, подібний до PRC1, - комплекс CHRASCH. Основною відмінністю є його асоційованість з PcG-білком Pipsqueak (PSQ), який обумовлює зв'язування комплексу зі

специфічними сайтами PREs, що містять мотив (GA)n. Отже, комплекс CHRASCH може бути залученим у регуляцію специфічної групи генів.

Комплекси, які містять білки ESC/E(Z), деацетилювання і метилювання гістонів. Вважається, що комплекси, які містять білок Polycomb, відповідають за пряму репресію генів, тоді як комплекси, які містять ESC/E(Z), є **необхідними для попереднього встановлення молекулярних міток**, які будуть ініціювати сайленсинг за участю PcG. Білок ESC займає особливе місце серед відомих білків групи Polycomb. Його мРНК експресуються тільки під час овогенезу та в перші години ембріонального розвитку. Другий білок, E(Z), необхідний для зв'язування інших білків PcG з хромосомами та їх колокалізації з іншими білками PcG у багатьох місцях.

Були виділені та охарактеризовані як ESC/E(Z)-комплекси людини, так і дрозофіли (Таблиця 3.3.3). Всі комплекси містять подібні білки PcG: ESC**, E(Z) та SU(Z)12, гістон-зв'язуючий білок p55**, який також є компонентом ремоделюючих нуклеосоми комплексів NuRD та NURF, та фактор збирання хроматину **CAF-1**.

Під час ембріонального розвитку та розвитку личинок *Drosophila* склад ESC/E(Z)-комплексів зазнає динамічних змін. У ембріональному екстракті можна виділити два комплекси, 600-kDa (названий PRC2) та 1-MDa, які не ідентифікуються у кінці ембріогенезу; у екстракті личинки починає виявлятися новий комплекс 3-MDa. На додаток до чотирьох основних компонентів, комплекс 1-MDa також містить деацетилазу гістонів RPD3 та білок Polycomb-like (PCL), а до складу комплексу 3-MDa додатково входять дві гістонові деацетилази - RPD3 та SIR2. Мутації у генах *Rpd3* та *Sir2* не призводять до появи фенотипів, пов'язаних суто з прушенням функцій PcG, але підсилюють фенотип мутантів PcG, що вказує на роль продуктів *Rpd3* та *Sir2* у регуляції активності PcG.

Крім того, комплекси ESC/E(Z) мають гістон-метилтрансферазну ферментативну активність завдяки наявності у їх білках метилтрансферазного

домену SET. Зокрема, комплекси PRC2 можуть метилювати 9 та 27 лізини у складі H3. Білок ссавців E(Z) метилює 26 лізин гістону H1 за певних умов. Така специфічність E(Z) спрацьовує у випадку його взаємодії з певною ізоформою EED (гомолога білка E(Z) у ссавців). Комплекси з коротшою ізоформою EED метилюють H3K27, а комплекси з довшою ізоформою метилюють гістон H1. Додатковий домен, який входить до складу довшої ізоформи і відповідає за таке метилювання, взагалі відсутній у комплексах *Drosophila*. А отже, комплекси ESC/E(Z) впливають на структуру хроматину саме шляхом деацетилюання та метилювання гістонів.

Механізм впливу комплексів, які містять білки PcG та TrxG, на експресію генів. Як саме комплекси, які містять білки PcG та TrxG, беруть учать у регуляції активності генів, до кінця не з'ясовано. Вважається, що сайти зв'язування білків PcG (PREs) підтримуються в активному стані за рахунок ацетилювання гістонів. Так, продемонстровано безпосередню взаємодію білків TrxG з гістон-ацетилтрансферазами, оскільки компонентом одного з TrxG-вмісних комплексів TAC1 є гістон-ацетилтрансфераза dCBP. Крім того, було встановлено, що порушення опосередкованого PREs сайленсингу у трансгенних особин *Drosophila* супроводжується локальним накопиченням гіперацетильованих гістонів H4 у нуклеосомах.

Сайленсинг, опосередкований комплексами PcG, досягається у два етапи. Спочатку ESC/E(Z) метилюють H3K9 та H3K27 завдяки їх метилтрансферазній активності. Після цього компонент іншого комплексу PRC1 білок Polycomb, який містить хромодомен, зв'язується з конкретними мітками, а саме H3K9me та H3K27me. Така взаємодія може потенційно стабілізувати комплекси PRC1 на сайтах зв'язування. Як відомо, по-різному метильовані гістони наявні у різних генах, що може бути механізмом специфікації дії вищезгаданого комплексу. Було показано, що білки групи Trithorax TRX (Trithorax) та ASH1 (Absent Small або Homeotic discs 1), які присутні у двох різних комплексах *Drosophila*, є антирепресорами, необхідними протягом ембріонального розвитку для протидії ефектам сайленсингу білків PcG. Обидва білки містять домен SET та

підсилюють специфічну до 9 лізину гістону H3 метилтрансферазну активність, яка корелює з активацією генів.

3.4. ЕПІГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ У РОСЛИН

Хоча механізми контролю експресії генів за рахунок змін стану хроматину загалом у еукаріот дуже консервативні, у рослин ці процеси мають певну специфіку.

Особливості метилювання у рослин

У рослин метилювання цитозину відбувається у контексті будь-якої послідовності - у симетричних сайтах CG та CHG (де H – це A, T або C) та несиметричних сайтах CHH - за рахунок активності специфічних ферментів, які встановлюють та послідовно підтримують патерн 5mC протягом реплікації ДНК. Крім того, відбувається видалення 5mC основи за допомогою ДНК-глікозилазної активності. Через те, що в часі метилювання пов’язане з реплікацією ДНК, воно є класичним прикладом епігенетичної мітки, яка стабільно спадкується. Як відомо, метилювання ДНК пов’язане з репресією генної активності, оскільки ця модифікація призводить до рекрутування за рахунок зв’язування з білками MDB комплексів ремоделювання хроматину, які встановлюють більш компактну структуру хроматину.

У низки видів квіткових рослин (арабідопсис, рис, кукурудза та тополя) здійснено повногеномний аналіз 5mC з використанням різних стратегій. Обробку метил-чутливим ферментом McrBC або імунопреципітацію з специфічними до 5mC антитілами (MeDIP) застосовували разом з гібридизацією до високомпактного хроматину (high density genome assay). Інший підхід базувався на бісульфітному секвенуванні, принцип якого було описано вище. За допомогою перших двох методів визначали зміни у рівні метилювання, тоді як бісульфітне секвенування забезпечило створення карти

метильованих сайтів з дуже високою роздільною здатністю (до 1 нуклеотида). В результаті проведених експериментів було виявлено, що 5mC зустрічаються переважно у послідовностях, які повторюються (більше 90% є метильованими), зокрема транспозонах, проте приблизно у 20% генів цитозин теж метильований. Загалом рівень 5mC у геномі *Arabidopsis thaliana* у контекстах послідовностей CG, CHG та CHH складає приблизно 24%, 6,7% та 1,7% відповідно, проте метилювання у межах послідовностей генів обмежується сайтами CpG та спостерігається здебільшого саме у кодуючих регіонах. Порівняння метильованих послідовностей з даними аналізу транскриптому виявили, що кодуючі частини генів, які помірно експресуються, більш ймовірно метилюються, тоді як кодуючі частини генів з високими рівнями експресії є переважно не метильованими. Рівень 5mC у промоторах генів *A. thaliana* дуже низький (менше 5%) та пов'язаний з підвищенням тканиноспецифічної експресії генів. Аналіз метиломів ендосперму *A. thaliana* та рису свідчить, що гени, які експресуються в ендоспермі, характеризуються гіпометилюванням CpG вище точки старту транскрипції (TSS). Отже, загальний рівень 5mC негативно корелює з активацією генів, однак така кореляція стає не однозначною, якщо розглядати цей ефект у кодуючій частині гену.

У рослин наявна специфічна ДНК-метилтрансфераза CHROMOMETHYLASE 3, яка необхідна для підтримання метилювання у контексті послідовностей CHG. Метилювання ДНК, яке відбувається поза послідовностями CpG (CHG та CHH), довгий час вважалося характерним тільки для рослин. Проте нещодавній аналіз метилому людини виявив, що навіть у ссавців наявні ці епігенетичні мітки. Вважається, що таке метилювання поза сайтами CpG у ссавців обмежується специфічними типами клітин. Крім того, можливо, таке метилювання є частиною механізму, який зберігає плюрипотентний стан ембріональних стовбурових клітин. На відміну від цього, у рослин метилювання поза сайтами CpG обмежується впливом на мобільні генетичні елементи, кількість яких в геномах цих організмів інколи сягає 90%,

але воно не асоційоване з активацією транскрипції та підтримується під час розвитку організму.

Позиціонування нуклеосом та особливості посттрансляційних модифікацій хвостів гістонів у рослин

Нуклеосомні білки переважно асоціюються з послідовностями ДНК, які характеризуються найбільшою спорідненістю до них, а контролюється цей процес АТФ-залежними комплексами ремоделювання. Крім того, певні спеціалізовані комплекси залучені до змін складу нуклеосом за рахунок заміни канонічних гістонів на інші варіанти цих білків, а ці процеси в свою чергу можуть впливати на рівень конденсації хроматину. На сьогоднішній день позиціонування нуклеосом добре досліджено у *A. thaliana* на повногеномному рівні з використанням низки методик. Такий повногеномний аналіз показав, що більшість активних генів є збідненими на нуклеосоми у їх TSS, а отже, формують вільні від нуклеосом ділянки, які супроводжують транскрипційно компетентний стан хроматину у всіх еукаріот. Крім того, 5'-кінцеві послідовності генів є збагаченими на варіант гістону H2A.Z, який характеризується антагонгістичним патерном розміщення 5mC. Тим не менш наявність H2A.Z не обов'язково корелює з активною транскрипцією, що свідчить про його роль лише у наданні регіону транскрипційно компетентного стану, а не про вплив на саму транскрипцію.

Посттрансляційні модифікації гістонів досліджують за допомогою методу імунопреципітації хроматину (chromatin immunoprecipitation; ChIP) з використанням специфічних до певних модифікацій антитіл. Повногеномний аналіз у поєднанні ChIP з мікрочіпом (ChIP-chip) або з високоточним секвенуванням (ChIP-seq) дозволив виявити у *A. thaliana,* рису та кукурудзи низку відмінностей у особливостях модифікацій гістонів та їх функцій у рослин та тварин, зокрема, відмінності у розподілі H3K9me2 та H3K9me3. У рослин H3K9me2 є класичною міткою гетерохроматину, тоді як H3K9me3 здебільшого локалізовані у межах генів. У тварин ситуація є протилежною: H3K9me2

зазвичай асоціюється з транскрипційно сайленсованими еухроматиновими генами, а H3K9me3 знаходиться у прицентромерних гетерохроматинових ділянках. Відмінності також встановлені для модифікації H3K4me3, оскільки у рослин ця модифікація супроводжує виключно гени, які активно транскрибуються, тоді як у ссавців вона ідентифікується в промоторах як активних, так і неактивних генів. Врешті-решт спостерігаються деякі відмінності у розподілі консервативної у багатоклітинних організмів мітки транскрипційного сайленсингу H3K27me3, локалізованої у межах ділянок з високою щільністю генів, а також білків, які з цією міткою взаємодіють. Повногеномний аналіз у різних видів рослин показав, що модифіковані H3K27me3 згруповуються у невеликі домени довжиною менше 1 кб, які охоплюють кодуючу частину конкретного гену. На противагу такій ситуації у ссавців та плодової мушки хромосомні домени H3K27me3 є великими (більше 100 кб) та включають багато генів. Більше того, у рослин H3K27me3 локалізуються разом з LHP1 (like heterochromatin protein 1), тоді як у тварин вони пов’язані з білками репресорного комплексу Polycomb (PRC1). Оскільки у рослин до сьогодні не були ідентифіковані ортологи компонентів комплексу PRC1, то LHP1 може бути аналогом цього репресорного комплексу, який сайленсує гени, марковані модифікацією H3K27me3 у рослинних організмів. Цікаво, що LHP1 демонструє гомологію з білком гетерохроматину HP1 багатоклітинних та *S. pombe*, який залучений у формування та підтримання гетерохроматину. А отже, HP1 є прикладом «епі-регулятора», який має різні функції у різних груп еукаріот, незважаючи на збереження гомології послідовності. В той же час варто зазначити, що функції білків HP1 не суттєво відрізняються у рослин та багатоклітинних тварин, адже обидва типи білків беруть участь у формуванні гетерохроматину, хоча і шляхом впізнання різних міток.

Крім того, рослини мають свої особливості у наборі ферментів, які здійснюють посттрансляційні модифікації гістонів, а також у розподілі та кореляції з транскрипційно-активним станом цих епігенетичних міток.

Наприклад, у рослин присутня особлива гістон-деацетилаза (типу HD-2) та наявні специфічні механізми регуляції активності гістон-деацетилаз.

Репресія транскрипції та передача сайленсованого стану на прикладі модельної системи *FLC* (FLOWERING LOCUS C)

Регуляція експресії репресора цвітіння *FLC* (FLOWERING LOCUS C) у *A. thaliana* є найкраще вивченим прикладом епігенетичної регуляції транскрипції генів у рослин. Крім того, сайленсинг локусу *FLC* є цікавим ще й тому, що він спричиняється модифікаціями гістонових білків, які стабільно успадковуються. Такі модифікації проходження зберігаються протягом мітотичних поділів навіть після припинення дії низьких температур, які і індукують формування такого репресивного стану.

Репресія локусу *FLC* регулюється окремими сигнальними шляхами у різних екотипах *A. thaliana.* У озимих представників цього виду цвітіння у пермісивних температурних умовах забезпечується завдяки тривалій експозиції до холоду під час зимового сезону (так званої яровизації). Було показано, що яровизація спричиняє залучення до *FLC* комплексу PHD–PRC2, який містить чотири гомологічні репресорному PRC2 *Drosophila* субодиниці та три рослинних гомеодоменних білка (plant homeodomain proteins; PHD). Вказаний комплекс сприяє накопиченню мітки H3K27me3 у даному хроматиновому регіоні. Крім того, яровизація призводить до серії інших репресивних посттрансляційних модифікацій гістонів, серед яких деацетилювання гістонів, диметилювання H3K9 та H3K27, деметилювання H3K4, а отже, видалення міток активної транскрипції. Після цього модифікація H3K27me3 впізнається білком LHP1 (like heterochromatin protein 1), який сприяє формуванню сайленсованого стану хроматину у локусі *FLC* та забезпечує передачу такого сайленсованого стану при реплікації аж поки рослина не зазнає сигналу індукції цвітіння в теплих умовах зростання.

У представників *A. thaliana* з раннім цвітінням, які зростають влітку, експресія *FLC* підтримується на низькому базальному рівні з причини

відсутності функціонування локусу *FRIGIDA*, який є активатором *FLC,* або може пояснюватися наявністю слабкого алеля *flc*. Крім того, повна репресія *FLC* досягається за рахунок активності генів автономного сигнального шляху *FCA* та *FPA* (кодують РНК-зв'язуючі білки, що містять домен RRM), *FY* (фактор поліаденілування та процесингу 3'-кінця РНК), генів гістондеметилаз, *FLD* (LSD1-подібний білок, специфічний до H3K4me), *REF6* (джуманджи-подібний білок, специфічний до H3K36me), *FVE* (кодує білок з WD-повторами). Встановлено, що деякі представники цього автономного сигнального шляху, зокрема FVE, FLD, та REF6, є компонентами комплексів, які видаляють посттрансляційні модифікації гістонів, асоційовані з активацією транскрипції. На додаток, нещодавні дослідження виявили, що білки FCA та FPA безпосередньо зв'язуються з серединою або 3'-кінцевим регіоном локусу *FLC,* відповідно, створюючи тим самим альтернативне поліаденілування антизмістовних транскриптів *FLC.* Було висунуто припущення, що відбір цих специфічних сайтів поліаденілування є умовою запуску FLD-залежного деметилювання H3K4 у 3'-регіоні локусу *FLC.* Таким шляхом визначається встановлення несприятливого для тр анскрипції стану хроматину та ініціація термінації транскрипції. Цікаво, що яровизація призводить до накопичення антизмістовних транскриптів *FLC* та довгих некодуючих РНК, які називаються COLDAIR та залучені до впізнання *FLC* комплексом PHD–PRC2. Це означає, що вибіркове напрацювання антизмістовних транскриптів – ключова подія і у автономному сигнальному шляху, і у репресії *FLC* в процесі яровизації. А отже, даний приклад демонструє новий механізм формування репресивного хроматинового оточення, в якому специфічні антизмістовні транскрипти діють як сигнали для залучення епі-регуляторів та/або безпосередньо заважають роботі РНК-полімерази II під час ініціації та елонгації змістовної транскрипції. Оскільки коекспресія змістовної та антизмістовної РНК є розповсюдженим явищем у рослин та інших організмів, можна передбачити, що регуляція за участю антизмістовних РНК є важливим та консервативним механізмом регуляції транскрипції генів.

Участь мобільних генетичних елементів та повторів у регуляції активності генів

Велику частину геномів еукаріотичних організмів складають МГЕ та послідовності, які повторюються. Відомо, що МГЕ та повтори являють собою загрозу стабільності геному. МГЕ можуть вбудовуватися у гени хазяїна або викликати значні хромосомні перебудови за рахунок негомологічної рекомбінації, такі як транслокації, делеції та інсерції, крім того, послідовності, які повторюються, можуть підвищувати кількість небажаних рекомбінаційних подій. З цих причин епігенетичні механізми, переважно опосередковані активністю сигнального шляху малих РНК (sRNA), розвиваються у напрямку підтримання цих елементів ДНК у неактивному стані за рахунок спрацьовування гіперметилювання цитозинів (процесу, який має назву **РНК-залежного метилювання ДНК** (RNA-directed DNA methylation; RdDM) та внесення репресивних модифікацій гістонів. МГЕ та повтори мають тенденцію до накопичення у гетерохроматині (центромерних, теломерних та прицентромерних ділянках), де вони відіграють ключову роль у формуванні епігенетичної архітектури цих регіонів. Крім того, МГЕ зустрічаються у еухроматині у межах генів та міжгенних послідовностей. Це особливо очевидно у великих геномах рослин, таких як геном кукурудзи, в якому МГЕ-пов’язані гетерохроматинові кластери розмежовують гени. Проте інколи трапляється і протилежна ситуація, а саме, гени розміщуються у гетерохроматинових регіонах, де міститься велика кількість МГЕ.

Для уникнення поширення гетерохроматинового стану з МГЕ на гени, клітини розвивають ізоляційні механізми, які різко обмежують їх еухроматинові домени. Варто зазначити, що повногеномне визначення особливостей розміщення 5mC та модифікацій гістонів у різних видів рослин виявило чітке розташування епігенетичних міток, яке визначає транскрипційно компетентні ділянки незалежно від їх локалізації у геномі. Наприклад, гени, збагачені на еухроматинові модифікації гістонів H3K4me2, можуть

експресуватися, навіть якщо вони входять до гетерохроматинових доменів. Тим не менше, порушення у підтриманні таких епігенетичних кордонів може іноді призводити до формування епіалелей, яким притаманні спадкові зміни експресії генів. Присутність МГЕ (як повнорозмірних, так і неповнорозмірних елементів) та складних повторювальних послідовностей було ідентифіковано як таке, що характерно для деяких епіалелів рослин. Один з прикладів представлений переходом алелю кукурудзи *B-Intense* (активно експресується) у епіалель *B'* (сайленсований), який пов'язаний з присутністю семи тандемних повторів, що розміщені на 100 пн вище кодуючого регіону *b1*. У інших випадках епіалелі виникають внаслідок дуплікації генів, які можуть включати послідовності цілого гена або його частини, що було показано для деяких алелів кукурудзи r1 та p1. Крім того, дуплікації генів можуть епігенетично впливати на експресію фланкуючих некодуючих послідовностей, як було продемонстровано для епіалеля рису *DWARF1*. І, врешті-решт, ймовірно, що деякі асоційовані з МГЕ гени зазнають епігенетичних змін у результаті активування сигнального шляху RdDM (RNA-directed DNA methylation).

Вищезгадані епіалелі хоча потенційно є еволюційно важливими, демонструють особливі випадки викликаної МГЕ/повторами регуляції експресії генів, яка обмежена певними сортами/екотипами видів рослин. Однак, молекулярний аналіз важливих процесів розвитку, таких як геномний імпринтинг, та характеристика епі-регуляторних мутантів показали, яким чином близькі МГЕ послідовності можуть обиратися клітинами для регуляції генів хазяїв. Яскравими прикладами є епіалельні варіанти генів *FWA* та *BONSAI (BNS),* які описані у епі-регуляторних мутантів *Arabidopsis* зі зниженням експресії *DNA methylation 1 (DDM1)* та *methyltransferase 1 (MET1)*, в яких метилювання CG сильно послаблене.

Ген *FWA* кодує білок з гомеодоменом та його промотор містить дві пари тандемних повторів, які беруть початок від МГЕ класу SINE (short interspersed nuclear element). У рослин дикого типу ген *FWA* сайленсований у вегетативних тканинах, але він експресується у ендоспермі таким чином, що активним є

лише алель, отриманий від матері. У мутантів *ddm1* та *met1* ген *FWA* ектопічно експресується та обумовлює фенотип пізнього цвітіння. Було показано, що експресія *FWA* пов'язана зі зменшенням кількості у промоторі 5mC та H3K9me2 (гетерохроматинові мітки). Згідно запропонованої моделі для пояснення регуляції даного гену, присутність елементу SINE вище кодуючого регіону *FWA* дозволяє формування дволанцюгових РНК, які за участю сигнального шляху РНКі процесуються у sRNA довжиною 24 нуклеотиди, які в свою чергу запускають формування 5mC та H3K9me2 у промоторі *FWA* за допомогою targeting комплексів RdDM. Ектопічна експресія гену у мутантах *ddm1* та *met1* відбувається за рахунок усунення H3K9me2 та загального зниження рівня 5mC. Крім того, оскільки білки DDM1 та MET1 впливають на підтримання 5mCG, гіпометильований та транскрипційно активний епіалель *FWA* стабільно спадкується навіть після інтрогресії у лінії дикого типу, в яких локуси DDM1 та MET1 є функціональними. Дана модель також пояснює специфічну транскрипцію материнського алеля гена *FWA* у ендоспермі. Виявилося, що сайленсингу цього материнського алеля протидіє деметилювання промотору опосередковане ДНК-глікозилазою DEMETER. А отже, регуляція гену *FWA* є прикладом пов'язаного з послідовностями МГЕ тканиноспецифічного контролю експресії генів.

Ген *BNS* кодує білок, подібний до регулятора клітинного циклу ссавців Swm1/Apc13. Ретротранспозон класу LINE (long interspersed nuclear element) розташовується нижче 3′UTR даного гена. У рослин дикого типу ген *BNS* конститутивно експресується, тоді як у мутантів *ddm1* та *met1* експресія цього гену знижується після декількох циклів самозапліднення рослин. Перші покоління мутантів *ddm1* демонструють посилену транскрипцію LINE, що призводить до поширення метилювання з послідовності мобільного елементу на кодуючу частину гену *BNS* та накопичення sRNA довжиною 24 нуклеотиди, комплементарних цьому гену. Це свідчить про те, що мутація гена *ddm1* викликає вивільнення послідовності LINE з щільно упакованої структури хроматину, таким чином сприяючи синтезу антизмістовних транскриптів *BNS* з

наступним формуванням sRNA, які впливають на експресію даного гену за участю сигнального шляху RdDM. Отже, на відміну від гена *FWA,* нормальна експресія гена *BNS* потребує активного сайленсингу LINE-елементу.

Варто зазначити, що мутація гена *FWA,* яка призводить до втрати його функції, не змінює фенотип цвітіння та розвиток насіння, що свідчить про необов'язкову участь цього гена у розвитку вказаних ознак у *Arabidopsis.* Однак, промотори даного гена у низці екотипів є консервативними, а послідовність SINE була ідентифікована в районі даного гену у близьких до *Arabidopsis* видів рослин. Загалом ці факти вказують на те, що інсерція МГЕ у промоторний регіон даного гену може бути адаптивною. У зв'язку з цим присутність послідовності SINE може надавати дуже гнучку та динамічну стратегію регуляції експресії гена *FWA,* а реверсія епігенетичного сайленсингу цього гену може відбуватися за конкретних умов зростання, тим самим контролюючи період розмноження рослини. Подібно до цього, було встановлено, що інсерція LINE-елементу у локус *BNS* є дуже консервативною та ідентифікована у 96 випадках рослин *A. thaliana* з природних популяцій. Враховуючи ефект, який LINE може мати на експресію гену *BNS*, таке співіснування не може бути випадковим. Наприклад, відсутність активності *BNS* детермінує загальну редукцію структур рослини, які можуть бути корисним за певних стресових умов.

3.5. ОСОБЛИВОСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ МОДИФІКАЦІЙ У ССАВЦІВ

Як і у випадку інших багатоклітинних, організм ссавців розвивається з єдиної клітини, в ДНК якої закодована інформація про всі наступні зміни в цьому організмі та типи клітин, з яких він сформується. Така ситуація потребує складної регуляції експресії генів у складі геному, яка разом з наявністю транскрипційних факторів забезпечується епігенетичними механізмами, такими як метилювання ДНК, модифікації хвостів гістонових білків та ncRNA. Епігенетичні механізми у ссавців досліджені досить детально на багатьох рівнях. Основним модельним об'єктом у цьому випадку були миші *Mus*

musculus. Крім того, нещодавно було опубліковано перші результати вже згаданого проекту ENCODE та активно йде робота над ще одним масштабним дослідженням Human Epigenome Project (HET). Метою останнього є встановлення патернів метилювання ДНК на рівні цілого геному у клітинах всіх основних тканин людини. На початок 2014 р. опубліковано результати аналізу патернів метилювання ДНК 6, 20 та 22 хромосом.

Метилювання ДНК

У геномах ссавців метилювання ДНК відбувається переважно у контексті послідовностей CpG, де модифікується C^5 атом цитозину. Крім того, у ембріональних клітинах мишей геномна ДНК включає також метильовані цитозини у контексті динуклеотидів CpA, CpT та CpG. Тим не менше, 5mC складають лише близько 1% всіх нуклеотидів ДНК, а отже, входять до складу 70-80% всіх динуклеотидів CpG геному. Як вже зазначалося, динуклеотиди CpG розподілені нерівномірно у геномі людини, вони сконцентровані у CpG-острівцях (CGIs). Патерн метилювання певної клітини є результатом динамічних незалежних процесів метилювання та деметилювання. У ссавців патерн метилювання геномів диференційованих соматичних клітин загалом є стабільним та спадкується. **Репрограмування** епігеному (що включає його послідовне деметилювання та метилювання) має місце під час двох стадій розвитку – **у клітинах зародкового шляху** та **у преімплантаційних ембріонах**. На відміну від загального повногеномного деметилювання у первинних статевих клітинах, геноми зрілих сперматозоїдів та яйцеклітин є значно більш метильованими у порівнянні з соматичними клітинами.

Хоча у геномі більшість CpG є метильованими, дані динуклеотиди у складі промоторів з CGIs зазвичай залишаються неметильованими протягом розвитку, а також у звичайних типах тканин (не злоякісних або не старіючих). Зазвичай CGIs – це ділянки геному довжиною 200 пн, до складу яких входить більше 50% нуклеотидів CG. Аналіз розподілу метилювання 21 та 22 хромосом людини показав, що такі регіони асоційовані саме з 5’ кінцевими частинами

генів. CpG-острівці перекриваються з 50-60% промоторів генів людини. Тим не менш, деякі промотори з CGIs тканиноспецифічно метилюються протягом розвитку, такі промотори є виключенням з загального правила, згідно якого метилювання CGIs обмежується інактивованою Х-хромосомою та імпринтованими генами. Продемонстровано, що такі метильовані промотори з CGIs перебувають у деметильованому стані у клітинах зародкової лінії. Крім того, 6-8% CGIs геномної ДНК є метильованими у клітинах мозку, м'язів та селезінки людини. Таке метилювання CpG-острівців спостерігається у генах, необхідних для розвитку організму.

Іншою цікавою обставиною, пов'язаною з метилюванням ДНК у ссавців, є те, що черговий акт метилювання розпочинається зразу після тотального повногеномного деметилювання, яке спостерігається відразу після запліднення. Реметилювання (метилювання *de novo*) більшої частини геному відбувається після стадії бластоцисти та завершується протягом останніх періодів розвитку. Цей феномен остаточно не є зрозумілим, проте вважається, що ці процеси можливі завдяки взаємодії між білками, які модифікують хроматин, та метилюванням ДНК.

У ссавців відомо декілька **метилтрансфераз,** які поділяють на два класи в залежності від субстратів та функцій, які вони виконують. Ферменти DNMT3A та DNMT3B є *de novo* метилтрансферазами, які відповідають за встановлення патерну метилювання цитозину на неметильованій ДНК. Саме ці ферменти працюють при тотальному метилюванні геному *de novo* на ранніх стадіях ембріогенезу після повногеномного деметилювання. Також у ссавців виявлена метилтрасфераза DNMT1, яка відповідає за стабільне підтримання метилювання після проходження поділу клітин. Вона працює під час реплікації ДНК та метилює напівметильовані сайти. У мишей виявлено дві ізоформи ферменту DNMT1 (Dnmt1s та Dnmt1o), які беруть участь у підтриманні метилювання на передімплантаційній стадії ембріонів мишей. Порушення активності метилтрансфераз у ссавців призводить до порушення нормального розвитку цих організмів. Крім того, була описана метилтрансфераза DNMT2,

функції якої не до кінця зрозумілі, оскільки вона демонструє низький рівень активності *in vitro* та її відсутність не викликає помітного впливу на рівень метилювання цитозинів.

Модифікації хвостів гістонів

Разом з метилюванням ДНК модифікування хвостів гістонів відіграє важливу роль у регуляції активності генів та підтриманні сайленсованого стану хроматину. Роль таких модифікацій на сьогоднішній день переважно залишається не встановленою. Особливості основних ферментів та білкових комплексів ссавців, які відповідають за встановлення та усунення модифікацій хвостів гістонових білків наведені у Таблиці 3.5.1.

Таблиця 3.5.1. **Гістон-модифікучі ферменти ссавців**

Фермент	**Субстрати**	**Фермент**	**Субстрати**
Ацетилтрансферази		**Деацетилази**	
HATI	H4 (K5, K12)	SirT2-3	H4K16
GCN5, PCAF	H3 (K9, K14, K18)	**Лізин-демителази**	
		LSD 1/BHC110	
CBP, P300	H3 (K14, K18). H4 (K5, K8), H2AK5, H2B, (K12,K15)		H3 (K4, K9)
TIP60/PLIP	H4 (K5, K8, K12, K16), H3K14	JHDMla-b	H3K36
HBOl	H4 (K5,K8, K12)	JHDM2a-b	H3K9
		JMJD2A/JHDM3A	
		JMJD2B-C	H3 (K9, K36)
Лізин-метилтрансферази		JMID2D	H3K9
SUV39H1-2	H3K9	JARID1A-D	H3K4
G9a	H3K9	UTX	H3K27
EuHMTase/G LP	H3K9	JMJD3	H3K27
ESET/SETDB1	H3K9	**Серин/треонін кінази**	
CLL8	H3K9	Haspin	H3T3
MLL1-5	H3K4	MSK1-2	H3S28
SET1A-B	H3K4	CKII	H4S1
ASH1	H3K4	Mstl	H2BS14
SET2	H3K36	Rsk2	H3S10
NSDl	H3K36	**Убіквітилази**	

SYMD2	H3K36	Bmi/Ringla	H2AK119
DOT1	H3K79	RNF20/RNF40	H2BK120
Pr-SET7/8	H4K20	**Аргінін-метилтрансферази**	
SUV4 20H1-2	H4K20	CARM1	H3 (R2,R17, R26)
EZH2	H3K27	PRMT4	H4R3
SET7/9	H3K4	PRMT5	H3R8, H4R3
RIZ1	H3K9		

Компенсація дози гена та геномний імпринтинг

У ссавців зазвичай самка має дві Х-хромосоми (XX), тоді як самець – лише одну (XY). Така хромосомна особливість у різних статей призводить до необхідності функціонування системи компенсації для корекції дози генів, які містяться у Х-хромосомі. У самок ссавців компенсація дози генів здійснюється шляхом інактивації однієї з двох Х-хромосом під час раннього ембріонального розвитку. Інактивація включає великомасштабне перетворення ділянок Х-хромосоми з еухроматинового стану на дуже компактний гетерохроматиновий. Таке перетворення хроматину регулюється за участю епігенетичних механізмів, таких як активність ncRNA, метилювання ДНК та модифікування гістонів, воно призводить до блокування транскрипції більшості, але не всіх, генів на інактивованій хромосомі. Більш детально епігенетичні механізми інактивації Х-хромосоми у ссавців будуть розглянуті у РОЗДІЛІ 7.

Диплоїдні організми, до яких належать і ссавці, мають по дві копії усіх аутосомних генів, по одному від кожного з батьків. У більшості випадків обидва батьківські алелі характеризуються однаковим потенціалом експресії у клітині. Проте частина аутосомних генів є предметом **геномного імпринтингу**, завдяки якому обмежується експресія одного з двох батьківських алелів в залежності від того, кому саме з батьків він належав. Геномний імпринтинг є консервативним у ссавців епігенетичним механізмом, порушення якого викликає дефекти ембріонального та неонатального розвитку та може призводити до нейрологічних захворювань таких я к синдром Прадера-Віллі. У

мишей було ідентифіковано близько 80 імпринтованих генів, більшість з яких знаходиться у кластерах, але невелика кількість розташовується поза кластерами. Кожний кластер імпринтованих генів містить декілька кодуючих білки генів та має довжину 100-3000 кб і хоча б один ген ncRNA. Більш детально механізми геномного імпринтингу будуть розглянуті у РОЗДІЛІ 8.

Епігенетичні механізми репресії МГЕ

Секвенування геномів людини та мишей показало, що МГЕ відіграють важливу роль у формуванні геномів ссавців, зокрема, у їх еволюції. Ці елементи складають 45% та 37% геному людини та мишей відповідно. МГЕ поділяють на декілька основних груп – ДНК-транспозони, LTR-ретротранспозони (long terminal repeats), елементи LINE та SINE. Вважається, що елементи LINE складають близько 17% геному людини. Вони не містять довгих кінцевих повторів та невелика частина цих автономних МГЕ залишається активними у геномі людини. LTR-ретротранспозони містять довгі повтори в кінцевих регіонах, у геномі мишей активними елементами цієї родини є IAPs (intracisternal A particles), MaLR та Etn. SINE - неавтономні елементи без довгих кінцевих повторів, активність яких підтримується за рахунок ферментів LINE. *Alu*-елемент є найбільш поширеним SINE у геномі людини та складає близько 10% всіх послідовностей геному. В геномі мишей найбільш поширеними елементами SINE є B1 та B2 (належать до родини *Alu*). Що стосується ДНК-транспозонів, то у геномах ссавців активних елементів цієї родини виявлено не було, проте наявна велика кількість неактивних копій транспозонів.

У ссавців існують механізми захисту геному від активності МГЕ, які включають метилювання ДНК та модифікації хвостів гістонів (зокрема метилювання H3K9 та деацетилювання лізинів). У мишей транскрипція IAPs зазвичай є репресованою, але ці елементи активні у ембріонах, в яких відсутній фермент DNMT1, що свідчить про участь метилювання у формуванні репресованого стану цих елементів. У дослідах *in vitro* було показано, що

метилювання певних динуклеотидів CpG у промоторі LINE є достатнім для припинення транскрипції цього елементу. У низці ракових клітин було виявлено зниження метилювання елементів LINE у порівнянні з нормальними клітинами. Зниження метилювання LINE може відбуватися на ранніх етапах формування пухлин, зокрема при онкологічних захворюваннях товстої кишки та простати. У більшості інших типів онкології (лейкемія, уротеліальна, оваріальна та рак молочної залози) деметилювання LINE збільшується зі ступенем злоякісності.

Модифікації гістонів також відіграють певну роль у репресії транскрипції МГЕ. У ділянках, в яких наявні МГЕ, хроматин збагачений на метильовані H3K9 у нуклеосомах, що є сигналом для репресії транскрипції. Мутації у гені, який кодує метилтрансферазу лізину 9 гістону H3 Suv39, призводить до активації транскрипції МГЕ у культурі ЕСК мишей. Іншим механізмом регуляції активності МГЕ є регуляція за участю мікроРНК. Такий механізм сайленсингу МГЕ є добре вивченим у *A. thaliana*, проте він не ідентифікований у ссавців.

РОЗДІЛ 4. ЗВ'ЯЗОК МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ І ЕПІГЕНЕТИЧНИМИ ЧИННИКАМИ

Взаємозв'язок між геномом та епігеномом

Епігеном є стабільною, але водночас і пластичною системою, що дозволяє йому швидко змінюватись протягом диференціювання клітин, а також під впливом зовнішніх факторів. Епігенетичний статус генів є значно більш динамічним, ніж послідовність нуклеотидів в молекулі ДНК. Як вже зазначалося, епігенетичні мітки вважаються відносно стабільними у клітинному циклі та протягом розвитку організмів, що забезпечується за рахунок соматичного підтримання (**мітотична передача**). Однак, під час перепрограмування у гаметах та ембріонах ранніх стадій, відбувається повне усунення епігенетичних міток, які потім встановлюються заново. Деякі мітки можуть не підлягати цьому процесу, що призводить до їх успадковування на рівні цілісних організмів (зазвичай - протягом кількох поколінь), що було названо **трансгенераційною передачею**.

Чіткий перебіг змін епігенетичних міток є вкрай важливим для нормального розвитку організму, а його порушення призводять до запуску патогенних процесів. Першим з-поміж захворювань, щодо яких було виявлено зв'язок з епігенетичними чинниками, був рак. Епігенетичну природу цього захворювання було виявлено ще у 1983 році. Показано, що клітини колоректального раку демонструють загальну втрату метилювання ДНК у порівнянні з нормальними клітинами тієї ж тканини. Таке гіпометилювання призводить до геномної нестабільності, хромосомних перебудов та спричиняє аберантну активацію певних генів. Подальші роботи виявили, що гіпометилювання ДНК у промоторних регіонах генів-супресорів пухлин є звичайною подією у перероджених клітинах. Пізніше було показано, що інші епігенетичні механізми, зокрема, модифікації хвостів гістонів, також аномально відбуваються у клітинах пухлин.

Точні механізми, які призводять до встановлення аберантних епігенетичних патернів у ракових клітинах досьогодні залишаються не зрозумілими. Цікаво, що численні порушення у генах, які кодують білки епігенетичної машинерії, в свою чергу призводять до змін у нормальній експресії генів, що свідчить про те, що мутації у генах, які кодують епігенетичні ферменти, можуть відігравати визначальну роль у патогенезі раку та інших комплексних захворювань. Отже, епігенетичні процеси підлягають загальному генетичному контролю.

Генетичний контроль метилювання ДНК

Порушення нормального патерну метилювання ДНК характерно для таких хвороб як безпліддя, аутоімунні захворювання, деякі генетичні синдроми (Таблиця 4.1), раку, а також старіння. Проте молекулярні механізми, які призводять до встановлення аберантних патернів метилювання ДНК, до кінця не зрозумілі.

Таблиця 4.1. **Епігенетичні зміни за захворювань людини**

Залучений ген	Хвороба	Епігенетичні зміни
Метилювання ДНК		
DNMT3B	Синдром імунодефіциту, центромерної нестабільності, лицевих аномалій	Мутація в послідовності *DNMT3B* призводить до хромосомної нестабільності у зв’язку з втратою метилювання в повторювальних послідовностях ДНК
MeCP2	Синдром Ретта	Мутації *MeCP2* викликають порушення метилювання ДНК, ацетилювання гістонів та підвищення транскрипції LINEI, що і порушує функціонування мозку
	Системний червоний вовчак	Мутації в гені*MeCP2* призводять до аномального метилювання ДНК та дерегуляції аутоімунних пов’язаних з запаленням генів
FMR1	Синдром ламкої Х-хромосоми	Відбувається експансія CGG-повтору у промоторі гена *FMR1*, призводячи до транскрипційного сайленсингу шляхом гіперметилювання ДНК
FRG1, FRG2 ANT1, DUX4,	Форма міопатії Ландузі-Дежерина	Молекулярні перебудови в D4Z4, індуковані гіпометилюванням та порушенням функціонування розташованих поряд генів
Посттрансляційні модифікації гістонів		

CBP, EP300	Синдром Рубинштейна-Тейбі	Мутації в HAT домені генів *CBP* та *EP300* призводять до аномального ацетилювання гістонів
RSK2	Синдром Кофіна-Лоурі	Мутації у *RSK2* порушують фосфорилювання гістонів та їх взаємодію з CBP через HAT домен
NSD1	Синдром Сотоса	Знижується метилювання гістонів у зв'язку з втратою функціонування в результаті мутації *NSD1* гену
ITG15 (huntingtin)	Хвороба Гентінгтона	Експансія CAG-повторів спричиняє утворення поліглутамінового мотиву в гентінгтоніні, що перешкоджає зв'язуванню CBP з HAT доменом та інгібує його функцію, що призводить до зниження рівня ацетилювання
Ремоделювання хроматину		
ATRX	Синдром альфа-таласемії та розумової відсталості	Мутації в гені *ATRX* викликають порушення формування гетерохроматину та метилювання повторювальних послідовностей ДНК
CHD7	CHARGE синдром	Зміна структири хроматину у зв'язку з неефективним зв'язуванням вкороченого білка CHD7 з H3K4me3
CSB	Синдром Кокейна	Мутації в *CSB* перешкоджають його взаємодії з хроматином і блокують механізми ексцизійної репарації нуклеотидів

Можливим джерелом інформації щодо вищезгаданих процесів є використання модельних систем, наприклад, мутантних ліній *agouti* та *axin-fused* у мишей та *white* у *D. melanogaster*. Крім того, важливу роль відіграють дослідження мутацій генів ферментів, які переносять метильні групи на ДНК, та таких, які є учасниками метаболізму карбону, а тому є можливими чинниками порушень метилювання ДНК.

Тваринні моделі епігенетичних змін, викликаних мутаціями. Термін **«метастабільні епіалелі»** (metastable epialleles) було введено для визначення явища, коли за відсутності генетичної гетерогенності фенотипи особин, які несуть ці алелі, різняться. Таким чином, різниця в експресії таких алелів може пояснюватись особливостям їх епігенетичного стану. Одним з прикладів прояву метастабільних епіалелів є життєздатні жовті миші, які несуть алель *agouti* (A^{vy}). Ген дикого типу *agouti* кодує білок, який визначає відносний вміст чорного (еумеланін) та жовтого (феомеланін) пігментів у шерсті мишей. Один з TSS

даного гена розмішений у межах 2-го екзону, а експресія гену змінюється в ході розвитку організму, що призводить до появи жовтої ділянки у передверхівковій частині кожного чорного або коричневого волоска (агуті – це типовий коричневий колір шерсті мишей дикого типу). Алель A^{vy} є результатом інсерції інвертованого ретротранспозону IAP вище точки старту транскрипції гену *agouti*. Внаслідок цього нормальна та змінена експресія гену *agouti* спостерігається не тільки у клітинах волосяних фолікулів, а і в усіх інших клітинах. Миші, які несуть алель A^{vy}, характеризуються жовтою шерстю, ожирінням, діабетом та більшою вірогідністю захворювання на рак. Цікаво, що метилювання у контексті CpG у наново встановленому IAP-промоторі алелю A^{vy} знижує експресію гена *agouti*, а гіпометилювання цієї ділянки призводить до варіацій кольору хутра від жовтого (за повної відсутності метилювання) до псевдоагуті (за наявності метилювання) у мишей A^{vy}/a. Інтенсивність метилювання динуклеотидів CpG залежить від харчування матері та впливів навколишнього середовища на її організм протягом раннього розвитку плоду.

Іншим прикладом метастабільних епіалелів є *axin-fused* ($Axin^{Fu}$), який було ідентифіковано у 1937 році. Білок аксин, який кодується вказаним геном, регулює формування білатеральної осі симетрії у хребетних. Подібно до алелю A^{vy}, алель $Axin^{Fu}$ містить ретротранспозон IAP, але у межах 6 інтрона. Типовому фенотипу $Axin^{Fu}$ притаманний перекручений хвіст, що спричиняється порушенням формування осі симетрії протягом ембріогенезу. Крім типового прояву спостерігаються також варіації даного фенотипу від нормального і до перегнутого хвоста, які корелюють з різним ступенем метилювання послідовності IAP. Фенотип демонструє епігенетичну пластичність щодо складу материнської дієти. Епігенетичний стан і алелю $Axin^{Fu}$, і алелю *agouti* може успадковуватись трансгенераційно, від матері у випадку *agouti*, від обох бітьків у випадку *axin-fused,* що є успадкуванням фенотипу, причиною чого імовірно є порушення репрограмування епігенетичних міток протягом гаметогенезу.

На додаток до вищевказаних прикладів, зміни активності генів або розподілу їх продуктів у тканинах та протягом різних стадій розвитку можуть відбуватися за рахунок **ефекту положення гена**. У 1930 році Герман Меллер (H. Muller) описав зміни забарвлення очей в залежності від положення гену *white D. melanogaster*, що пояснювалось інактивацією гену у деяких клітинах за рахунок його переміщення в гетерохроматин. Ген *white D. melanogaster*, який в нормі розміщений на дистальному кінці Х хромосоми та є предметом дозової компенсації, проявляється в пігментації Мальпігієвих канальців, сім'яників та очей плодової мушки, а його експресія залежить від етапу розвитку та є тканиноспецифічною. Певні хромосомні перебудови зумовлюють переміщення гену в блок центромерного гетерохроматину у деяких клітинах, що викликає зміну експресії даного гену, яка в свою чергу призводить до різнокольорового фенотипу очей, обумовленого наявністю груп клітин з перебудовами (білі або безколірні ділянки очей) та клітин з нормальною експресією алелів (червоно-коричневі ділянки очей). Переміщення гену *white* з гетерохроматинових ділянок у різні еухроматинові сайти геному призводить до протилежного ефекту, що демонструє позиційну причину фенотипових змін, які спостерігаються, і виключає ефект зміни послідовності гену.

Епігенетичні зміни, спричинені генетичними порушеннями ДНК-метилтрансфераз. Як вже зазначалося, у ссавців наявні декілька типів метилтрансфераз - DNMT1 (підтримуюча), DNMT3A та DNMT3B (метилтрансферази *de novo*), а також гомолог метилтрансфераз DNMT3L, який не має метилтрансферазної активності, проте допомагає іншим ферментам цієї родини здійснювати метилювання. На гомозиготних нокаутних за генами метилтрансфераз організмах було продемонстровано, що всі метилтрансферази необхідні для виживання організмів. Так, вимкнення генів *Dnmt1* та *Dnmt3b* у мишей призводить до ембріональної смертності таких мутантів, а у випадку вимкнення гену *Dnmt3a* миші помирають одразу після народження. У експериментах з мишами, які характеризуються нуль-алелями гену *Dnmt3l*, було

показано, що гетерозиготні нащадки від нокаутних мишей демонструють втрату імпринтингу або випадковий імпринтинг, або біалельну експресію імпринтованих генів.

Генетичні дефекти DNMT3B та синдром імунодефіциту, центромерної нестабільності та лицьових аномалій. **Синдром ICF** (immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies syndrome) – це рідке аутосомно-рецесивне захворювання, яке вперше було описано у 1970-х роках. Діти з даним синдромом характеризуються періодичним імунодефіцитом, що є результатом рецидивуючих інфекцій, спричинених хромосомними порушеннями у прицентромерному гетерохроматині 1, 9 та 16 хромосом, а також у гетерохроматинових регіонах Y хромосоми та інактивованої X-хромосоми. Синдром ICF досі є єдиним відомим захворюванням, яке спричинене мутацію у зародковій лінії у гені *de novo* метилтрансферази *DNMT3B.* В залежності від наявності чи відсутності мутацій у гені *DNMT3B* розрізняють синдром ICF двох типів. Синдром ICF першого типу об’єднує пацієнтів, у яких наявні одночасно два різних мутантних алелі гену *DNMT3B*, тоді як у хворих на синдром ICF другого типу не ідентифікуються мутації у екзонах гену *DNMT3B*, хоча більшість пацієнтів характеризується гіпотметилюванням центромерних тандемних повторів сателітної ДНК (Satα).

Симптоми даного захворювання імовірно пояснюються дефектами метилювання ДНК. Так, лімфоцити хворих на синдром ICF характеризуються гіпометильованими послідовностями сателітної ДНК (Sat2 та Sat3) у прицентромерному гетерохроматині 1, 9 та 16 хромосом, що і використовується у діагностиці даного синдрому. Також менш метильованими є акроцентричні (NBL2) та прителомерні (D4Z4) тандемні повтори хромосом таких лімфоцитів у порівнянні з нормальними клітинами. Таке гіпометилювання імовірно і є причиною хромосомних перебудов (розриви, делеції цілих плечей та розгалужені хромосоми) та деконденсації хроматину, що є характерним для хворих на це захворювання людей. Такі цитогенетичні ефекти в клітинах

хворих дуже схожі на події у нормальних клітинах, які зазнали впливу 5-азоцитидину, який також призводить до дефекту метилювання. Нещодавно було описану ще одну особливість клітин хворих на синдром ICF – у них спостерігається аномально підвищений рівень теломерних РНК TERRA (telomeric repeat-containing RNA) та вкорочення теломер.

Більшість відомих пацієнтів з синдромом ICF є гетерозиготами, у яких наявні різні місенс-мутації в частині DNMT3B гена, де розміщуються 10 консервативних мотивів, відповідальних за його каталітичну активність. Такі мутації послаблють каталітичну активність метилтрансферази, проте ефект досягається різними шляхами. Іноді пацієнти з синдромом ICF несуть мутації, розміщені у N-термінальному регіоні каталітичного домену, які не впливають на здатність ферменту переносити метильні групи, проте впливають на здатність взаємодіяти з DNMT3L, який підсилює активність DNMT3B. Інші точкові мутації впливають на локалізацію ферменту, а також на здатність зв'язуватись з субстратами та здатність до олігомеризації.

Для кращого розуміння механізмів виникнення синдрому ICF було запропоновано декілька мишиних моделей. Делеція каталітичного домену *Dnmt3b* призводить до ембріональної смертності, подібно до мишей без гену *Dnmt3b*. Однак, при введені в геном мишей одночасно двох різних місенс-мутацій у каталітичному домені, характерних для людей з синдромом ICF, ембріональної смертності не спостерігається. Такі миші у постнатальному періоді мають ознаки синдрому ICF: низьку вагу при народженні, лицьові аномалії (зокрема менший ніс та ширшу спинку носа) та гіпометилювання повторів ДНК. Такі дані вказують на те, що у хворих, можливо, наявна залишкова активність метилтрансферази, тоді як гомозиготні нульові мутанти *DNMT3B* взагалі її не мають і тому спонтанно абортуються протягом ембріогенезу.

Причини та симптоми синдрому ICF вказують на те, що неправильна регуляція DNMT3B призводить до гіпометилювання сателітних ділянок ДНК, які розміщені у прицентромерному гетерохроматині певних хромосом, що в

свою чергу викликає зміни експресії генів з причини аномального видалення транскрипційних факторів, змін архітектури ядра та експресії некодуючих РНК.

Дефекти генів ДНК-метилтрансфераз та онкологічні захворювання. У 1983 році була опублікована одна з перших робіт, у якій було встановлено зв'язок між метилюванням ДНК та раком. У цій роботі було вставлено значне гіпометилювання певних генів у клітинах перероджених тканин у порівнянні з відповідними нормальними тканинами. Метилювання ДНК у перероджених клітинах втрачається переважно на послідовностях, які повторюються, зокрема гіпометильованими є МГЕ. Функціональне значення такої втрати метилювання ДНК полягає у хромосомній нестабільності, реактивації МГЕ та імпринтованих генів. Крім того, у клітинах пухлин спостерігається аберантне сайт-специфічне гіпертметилювання. *de novo* гіперметилювання CpG-острівців, які представлені у промоторах близько половини генів людини та є зазвичай неметильованими у нормальних клітинах, призводить до сайленсингу генів-супресорів пухлин, генів-регуляторів клітинного циклу, генів, залучених в апоптоз та репарацію ДНК. Описані епігенетичні зміни можуть обумовлюватись мутаціями або поліморфізмами генів DNMT, а також певних генів, які кодують ферменти метаболізму вуглецю та можуть впливати на функціонування ДНК-метилтрансфераз.

Гени DNMT зазвичай надекспресуються у деяких типах пухлин. Зокрема спостерігається достовірна надекспресія *DNMT3B*, тоді як у *DNMT1* та *DNMT3A* вона є підвищеною, але нижчою за таку у *DNMT3B*. Вважається, що DNMT1 та DNMT3B безпосередньо причетні до формування зміненого патерну метилювання ДНК у перероджених клітинах, а також до хромосомної нестабільності. Крім того, метилювання CpG може сприяти формуванню транзицій C-T у генах, залучених до канцерогенезу, та підвищувати імовірність впливу факторів навколишнього середовища на виникнення пухлин.

Ген ***DNMT3B*** розміщений на хромосомі 20q11.2., його довжина складає приблизно 47 кб, він містить 23 екзони та 22 інтрони. Описано близько 345

однонуклеотидних поліморфізмів (single-nucleotide polymorphisms; SNPs) цього гена, але тільки декілька з них призводять до амінокислотних замін у послідовності білка (частота таких поліморфізмів є дуже низькою). Як відомо, SNPs у людини є найбільш поширеними формами генетичних варіацій та у багатьох випадках їх наявність підвищує ризик виникнення певних захворювань. Хоча функціональне значення більшості SNP залишається остаточно не з'ясованим, деякі з цих варіантів можуть обумовлювати зміну активності DNMT3B, а отже, і метилювання ДНК, що в свою чергу може бути причиною генетичної схильності до онкології. З іншого боку, SNP у промоторному регіоні можуть впливати на зв'язування з ним транскрипційних факторів, що в свою чергу призводить до зміни експресії гену. І дійсно, у промоторному регіоні гену *DNMT3B* виявлено три SNP, які можуть бути можливими генетичними чинниками схильності до раку: −149 C > T (rs2424913), −283 T > C (rs6058870) та −579 G > T (rs1569686). Перші дві заміни призводять до достовірного збільшення активності промотору, проте жодного ефекту не виявлено для третього варіанту. Незважаючи на такий неоднозначний вплив, частоти саме цих SNP як факторів ризику розвитку раку, оцінювались у різних популяціях людей. Цікаво, що такі роботи демонструють суперечливі результати – деякі з них свідчать про прямий зв'язок цих поліморфізмів з виникненням деяких видів раку, тоді як інші показують відсутність такого зв'язку. Роботи по вивченню наявності декількох SNP одночасно є ще менш переконливими. Проте сумарні докази свідчать, що для адекватної оцінки впливу генетичних поліморфізмів на схильність до онкологічних захворювань необхідно брати до уваги і інші фактори, такі як особливості життєвого шляху, етнічну приналежність, проживання у певному географічному районі, дієту, вплив факторів зовнішнього середовища тощо.

Іншим можливим джерелом змінених патернів метилювання ДНК у перероджених клітинах, окрім SNP, є вкорочені білки. Так, транскрипти гену *DNMT3B,* які синтезуються з промотора у межах екзону 4, пов'язані з метилюванням промоторів генів *p16* та *RASFF1A* за раку легень. У іншій роботі

було ідентифіковано низку аберантних транскриптів DNMT3B у різних за походженням лініях перероджених клітин та показано стабільне підвищення експресії транскрипту *DNMT3B7*, яке призводить до зміни активності генів, що розміщені у 1, 9 та X хромосомах. Для пояснення описаного явища було запропоновано декілька гіпотез: 1) вкорочений білок може інтерферувати з нормальними білками DNMT3B шляхом зв'язування з ними; 2) вкорочений білок сам може зв'язуватись з ДНК, перешкоджаючи адекватному функціонуванню DNMT; 3) за рахунок змінених патернів метилювання ДНК порушується правильне модифікування гістонів.

Варіювання патерну метилювання ДНК є звичайним явищем і у здорових людей. Патерн метилювання може різнитися в залежності від статі, віку, середовища проживання та генетичних відмінностей, а також є тканиноспецифічним. Гени метилтрансфераз є високо поліморфними. Так, у роботах по визначенню поліморфізмів у кодуючій частині генів ДНК-метилтрансфераз та рівня метилювання ДНК у здорових представників різних популяцій було виявлено 111 SNP у даних генах. Серед усіх досліджених генів лише один рідкий варіант, заміна R277Q у DNMT3L, пов'язаний з гіпометилюванням ДНК. Ця заміна, яка зустрічається тільки у гетерозиготі, призводить до синтезу білка зі зниженою здатністю стимулювати метилювання ДНК, що відбувається за рахунок затримки формування комплексу з *DNMT3A*. Цікаво, що описане гіпометилювання пов'язане не з тотальним зниженням метилювання як такого, а з втратою модифікації у певних послідовностях CpG, які повторюються у теломерах та міжгенному просторі, а також (рідше) у інтронах. Слід зазначити, що причиною відсутності визначних SNP у здорових індивідуумів може бути те, що всі поліморфізми з фенотиповим проявом призводять до порушень розвитку та серйозних захворювань, таких як синдром ICF у випадку гену *DNMT3B.*

Епігенетичні зміни, спричинені генетичними порушеннями MBD-білків. Інформація, закодована шляхом метилювання ДНК, прочитується та

перекладається на мову функціонального стану хроматину за участю трьох різних родин білків: **MBD** (methyl-CpG binding domain), **SRA** (SET and RING associated) та **Kaiso** і Kaiso-подібні білки. Білки родини MBD є дуже консервативними та характеризуються наявністю домену MBD, який забезпечує їх зв'язування з метильованою ДНК. До складу родини входять п'ять білків: methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), MBD1, MBD2, MBD3 та MBD4. Білки MBD здебільшого відіграють активну роль у формуванні гетерохроматину та регуляції транскрипції. Крім того, нещодавно було показано, що білок MeCP2 є багатофункціональним білком, який бере участь у патогенезі генетичних захворювань таких як синдром Ретта (Rett syndrome) та аутоімунних захворювань, а саме системного червоного вовчака (systemic lupus erythematosus).

Синдром Ретта. Спочатку вважали, що функція гену *MeCP2* пов'язана з репресованим станом хроматину, оскільки його продукт зв'язується з метильованою ДНК та рекрутує білок SinA3 (транскрипційний репресор) і гістондеацетилази (HDACs), що і призводить до формування репресованого стану хроматину. Наявність послідовностей $(A/T)_n$ поряд з метильованими цитозинами, щільність метилювання та довжина метильованої послідовності впливають на ступінь спорідненості білка до ДНК та, як наслідок, обумовлюють часткову специфічність зв'язування білка. Проте згодом стало зрозуміло, що MeCP2 може зв'язуватись і з неметильованою ДНК, оскільки були описані і інші його функції: він може функціонувати як транскрипційний енхансер завдяки взаємодії з транскрипційним фактором CREB у промоторах активних генів; може бути посередником сплайсингу РНК завдяки взаємодії з РНК-зв'язуючим білком YB1; може індукувати компактизацію хроматину неметильованих ділянок ДНК; стабілізувати великі петлі ДНК (петельні домени хроматину). Наприклад, модулювання структури хроматину відбувається за рахунок динамічної взаємодії білка MeCP2 з гістоном H1. У випадку коли рівень експресії MeCP2 нижчий за такий гістону H1, відбувається специфічне зв'язування цього білка з певними сайтами, але у випадку однакового або

подібного рівня експресії обох білків MeCP2 може зв'язуватись як специфічно, регулюючи активність лише певних генів, так і неспецифічно, загалом регулюючи структуру хроматину. Цікаво, що у мишей зростає активність мобільного елементу Line 1 за відсутності білка MeCP2, що може бути одним з механізмів впливу відсутності MeCP2 на експресію генів та подальшого формування обумовлених цим захворювань.

Для білка MeCP2 встановлено багато генів-мішеней, які залучені у процеси розвитку головного мозку, зокрема гени *BDNF* (*brain-derived neurotrophic factor*), *DLX5* (*distal-less homeobox 5*), кластерин (*clusterin*), *cytochrome c oxidase subunit 1* та гени протокадгуринів (protocadherins) *PCDHB1, PCDH7*. Для нормального розвитку нервової системи вкрай важлива точна регуляція перерахованих генів.

У 1999 році було показано, що мутації у гені *MeCP2* обумовлюють синдом Ретта (OMIM #312750). З того часу було виявлено безліч дефектів гену *MeCP2*, які однозначно пов'язані з даним синдромом, який зустрічається переважно у жінок. Синдром Ретта – це Х-зчеплене захворювання розвитку нервової системи, симптоми якого проявляються у віці 6-18 місяців після народження, коли хворий починає демонструвати прогресуючі нервові дисфункції імовірно через порушення розвитку нейронів та редукцію розміру головного мозку. Процес регресії спричиняє клінічні прояви, такі як помірна неспроможність навчання, поведінка аутиста, стереотипні рухи руками та енцефалопатія. Також у хворих на даний синдром зазвичай спостерігається розумова відсталість та моторні порушення.

Мутації гену *MeCP2* виявлені як у сімейних випадках захворювання на синдром Ретту, так і у спорадичних. Найбільш патогенними мутаціями є порушення доменів MBD та TRD (transcriptional repression domain). Проте до розвитку синдрома Ретта призводять мутації не тільки у вказаних доменах, а і у будь-якій іншій частині гена. Вони можуть мати різну природу: точкові, міссенс, мутації зсуву рамки зчитування на С-кінці та інші. У чоловіків найбільш поширеним порушенням є дуплікація гену *MeCP2*, яка також

призводить до нейрологічних дефектів, які відомі як інший синдром – синдром дуплікації *MeCP2*. Часто чоловіки, у яких наявні мутації у гені *MeCP2*, демонструють затримку нервового розвитку, яка не обов'язково спостерігається в рамках синдрому Ретта. Тим не менше, різні мутації в гені *MeCP2* мають різний вплив на функціональність білка, в залежності від того, в якій саме частині гену відбулась така мутація. Значна фенотипова варіабельність, описана у хворих на синдром Ретта, може бути результатом специфічності різних мутацій разом з порушеннями нормального проходження інактивації Х хромосоми, яка зазвичай випадкова.

Ген *MeCP2*, який розміщений у Xq28, експресується у всіх клітинах, але особливо високий рівень даного білка ідентифікується у головному мозку. Рівень білка у головному мозку змінюється з часом та залежить від дозрівання нейронів та сінаптогенезу. Специфічна втрата MeCP2 у клітинах центральної нервової системи призводить до розвитку синдрому Ретта та інших порушень поведінки, подібних до аутизму, тоді як в результаті його надекспресії спостерігаються порушення моторики, прогресуючі неврологічні розлади та передчасна смерть, що свідчить про необхідність жорсткої регуляції гену *MeCP2* для нормального функціонування головного мозку. Дефішенсі (втрати кінцевих ділянок хромосом) *MeCP2* у мишей призводять до фенотипа подібного до синдрому Ретта.

Системний червоний вовчак. Системний червоний вовчак *(Systemic lupus erythematosus; SLE)* – це аутоімунне запальне захворювання, яке характеризується продукуванням аутоантитіл до багатьох ядерних антигенів, що порушує роботу низки органів та призводить до високого рівня смертності. Захворювання притаманне здебільшого жінкам.

Наявні дані свідчать, що етіологія SLE є складною та включає не тільки окремо генетичні фактори та чинники зовнішнього середовища, а і взаємодію між ними. Дослідження на монозиготних близнюках, хворих на SLE, виявили наявність дискордантності, що може вказувати на участь епігенетичних чинників у розвитку захворювання. Зокрема, важливу роль у перебігу хвороби

мають аберантні патерни метилювання ДНК у Т-клітинах. Такі зміни метилювання ДНК призводять до активації чутливих до метилювання генів, таких як *ITGAL* (CD11a), *TNFSF7* (CD70), *PRF1* (perforin) та *TNFSF5* (*CD40LG*). Застосування деметилюючих агентів, наприклад, 5-азацитидину призводить до подібних ефектів, які також підвищують ектопічну активацію у клітинах CD4+. Цікаво, що у випадку пересадки таких клітин CD4+ у організм миші вони індукують розвиток подібного до SLE захворювання.

У клітинах людей, хворих на SLE, знижується активність метилтрансферази DNMT1, що сприяє гіпометилюванню вищезгаданих генів. Незважаючи на це, не виявлено достовірного зв'язку між якими-небудь SNP у гені DNMT1 та схильності до SLE. У відповідності до цього можна передбачити, що для підтримання адекватного рівня метилювання ДНК DNMT1 повинна кооперуватися наприклад з білком MeCP2. Як вже вказувалось, даний білок відіграє вирішальну роль у епігенетичній регуляції транскрипції генів за рахунок здатності зв'язуватись з метильованою ДНК та рекрутувати деацетилази гістонів, що призводить до утворення закритого для машинерії транскрипції стану хроматину. Було продемонстровано наявність сильного зв'язку між деякими SNP у гені *MeCP2* та розвитком SLE. Зв'язок даного гену з розвитком червоного вовчаку підтверджується і попередніми даними, згідно з якими саме зчеплений з Х-хромосомою ген бере участь у патогенезі. Наприклад, чоловіки з синдромом Клайнфельтера (47 XXY) мають однаковий з жінками ризик захворіти на SLE.

Епігенетичні зміни, обумовлені порушеннями генів ферментів одновуглецевого метаболізму. Як відомо, порушення у гені DNMT1 та пов'язаних з ним білків, таких як MDB, є джерелом формування аберантних патернів метилювання, які призводять до захворювань людини. В той же час до них можуть призводити і аномалії у ферментах одновуглецевого метаболізму (one-carbon metabolism enzymes), які регулюють запас SAM у клітині.

SAM є основним донором метильних груп на клітинному рівні. SAM-зв'язуючі білки виконують різноманітні функції, серед яких метилювання ДНК, РНК, гістонів та інших молекул. Крім того, SAM відіграє важливу роль у регуляції росту, диференціації та загибелі гепатоцитів. Реакції з SAM, які є частиною одновуглецевого метаболізму, входять до шляху синтезу поліаміну та фолатного циклу. SAM також є попередником важливих метаболітів, таких як глутатіон (реакції транссульфурування) (Рис. 4.1). Зниження рівня SAM у гепатоцитах призводить до хронічної печінкової недостатності, тоді як його надлишок стимулює руйнування клітин печінки та підвищує схильність до стеатозу і гепатоцелюлярної карциноми (hepatocellular carcinoma; HCC). Отже, підтримка певного рівеня SAM у клітинах печінки є вкрай важливою для їх нормального функціонування. Головними відповідальними за синтез та катаболізм SAM ферментами є метіонін аденозил-трансферази (methionine adenosyl-transferases; MATs) та гліцин-N-метилтрансфераза (glycine-*N*-methyltransferase; GNMT) відповідно, зміни в генах будь-яких з цих ферментів призводять до патогенезу печінки.

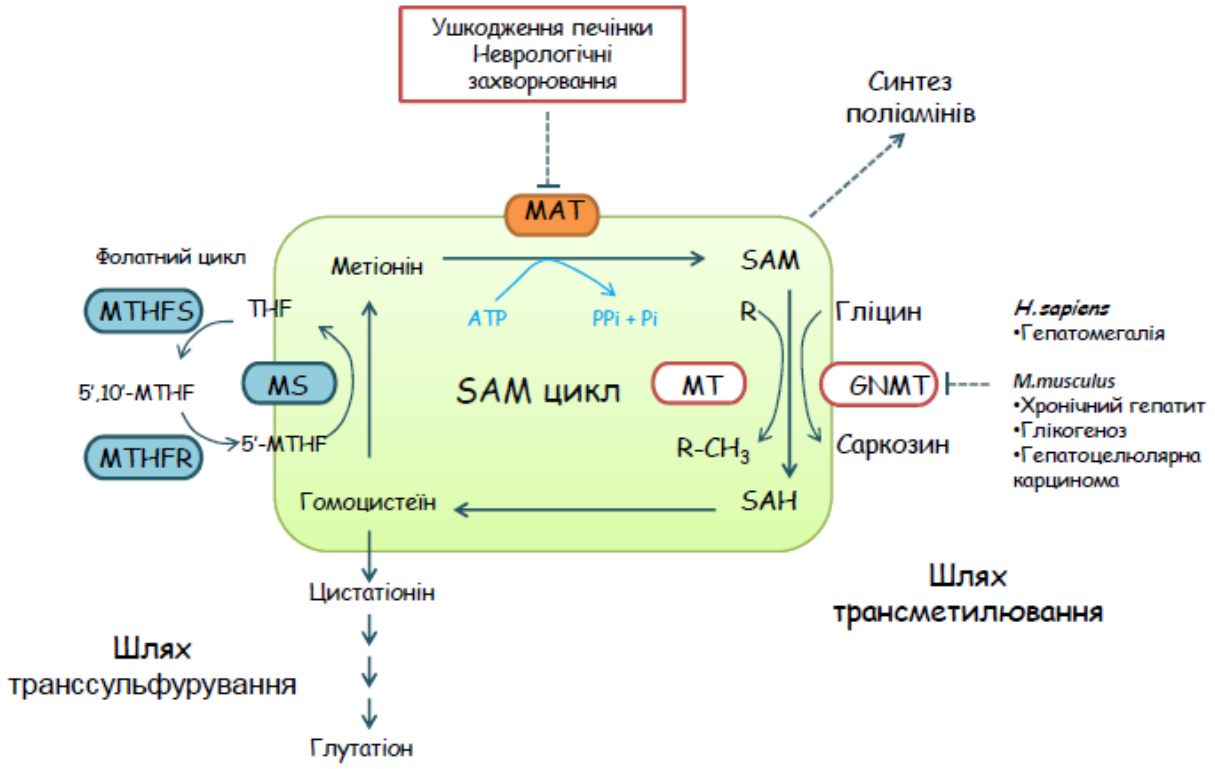


Рис. 4.1. Схематичне зображення одновуглецевого метаболізму (відтворено зі змінами з Huidobro et al, 2013).

Поліморфізм генів MATs та концентрація SAM. Синтез SAM відбувається у всіх клітинах тіла ссавців, проте найактивніше у клітинах печінки. Синтез SAM відбувається при взаємодії метіоніну та АТФ в ході реакції, яка каталізується ферментами MATs. У ссавців дані ферменти кодуються двома різними генами, *MAT1A* та *MAT2A*, продуктами яких є білки MATI і MATIII та MATII відповідно (можуть бути гомо-олігомерними або тетрамерними). Ген *MAT1A* переважно експресується у печінці та кодує субодиницю α1, яка входить до складу як MATI, так і MATIII. *MAT2A* демонструє більш широку експресію та кодує субодиницю α1 (дещо відмінну від субодиниці α1 гена *MAT1A)*, яка ідентифікована у MATII. Печінка ембріонів містить багато MAT2A білка, який протягом розвитку поступово заміщається на MAT1A. Експресія *MAT1A* знижується у хворій печінці та майже відсутня у клітинах гепатоцелюлярної карциноми, тоді як ген *MAT2A* транскрипційно активний у даних клітинах, що може свідчити про його можливу роль у канцерогенезі. Рівень експресії *MAT2A* залежить від концентрації SAM: низька індукує експресію *MAT2A*, а висока знижує. Відносно гена *MAT1A* такий ефект не спостерігається.

Найбільш поширеною причиною спадкової гіперметіонінемії є нестача білків MAT. В залежності від природи мутації спостерігається аутосомно-рецесивний або домінантний тип спадкування. Було описано близько 30 мутацій у гені *MAT1A*, які призводять до відсутності нативних MAT. З найбільшою частотою зустрічається заміна R264H, яка успадковується за домінантним типом. У більшості випадків відсутність білків MAT є незагрозливою, проте інколи може супроводжуватися симптомами неврологічної природи.

Порушення *MAT1A* у мишей призводять до високого рівня метіоніна в плазмі та низького SAM у печінці, що підвищує імовірність окисної загибелі

клітин печінки, з можливою подальшою недостатністю та спонтанною гепатоцелюлярною карциномою, з одночасним зниженням регенераційних властивостей печінки через нездатність збільшувати рівень цикліна D.

Поліморфізм генів GNMT та захворювання печінки. В результаті активності метилтрнсфераз метильна група з SAM переноситься на низку акцепторів і продуктом такої реакції є *S*-adenosylhomocysteine (SAH). Більшість реакцій метилювання, у яких приймає участь SAM, інгібуються у випадку зростання рівня SAH та зниження рівня SAM. Єдиними метилтрансферазами, дефішенсі яких призводять до накопичення SAM у клітині, є білки GNMT. Дані білки є найбільш поширеними метилтрансферазами у печінці (також присутні у передміхуровій та підшлунковій залозах), які підтримують постійне співвідношення SAM/SAH, що є індикатором здатності клітини до метилювання. Молекули GNMT є одними з головних фолат-зв'язуючих білків і регуляторами метаболізму 1-карбону. Модифікуючи стан фолату у тканині, GNMT можуть сприяти розривам хромосом та порушувати нормальне метилювання ДНК. Крім того, дані білки беруть участь у детоксикації та можуть мати захисний ефект стосовно дії канцерогенів, знижуючи рівень формування ДНК-аддуктів.

У людини відомі мутації генів *GNMT*, які призводять до втрати білками їх функції. Вони спричинюють такі порушення, як м'яка гепатомегалія, підвищення рівня сироваткових трансаміназ, підвищення рівня метіоніну та SAM у плазмі. Хоча втрата активності GNMT у людини супроводжується порушеннями з легким перебігом, дефішенсі *GNMT* у мишей призводять до інших ефектів. Відомо дві нокаутні мишині моделі з різним фенотиповим проявом. Для однієї з них характерний спонтанний розвиток гепатиту та HCC, а також захворювання, яке супроводжується накопиченням глікогена (glycogen storage disease). У даному випадку відсутність GNMT призводить до порушення регуляції білків, які важливі для антиоксидатнт-детоксикуючої відповіді, метаболізма гліколітичної енергії та шляху метаболізма 1-вуглецю. Спочатку вважалося, що друга модель демонструє нормальний фенотип, але пізніше було

виявлено, що відсутність білків GNMT також призводить до стеатозу печінки, фіброзу та HCC, а також до послаблення регенерації печінки. Можливо, що у цьому випадку GNMT модулює метилювання ДНК та гістонів, а також перехід до карценогенезу, який відбувається, наприклад, у межах JAK/STAT шляху, що і призводить до епігенетичних змін у HCC.

Епігенетичні зміни, викликані експансією нуклеотидів та ефектом положення.

Експансія тринуклеотидних повторів CGG та метилювання ДНК: синдром ламкої Х-хромосоми. **Синдром ламкої Х-хромосоми** (fragile X syndrome; FXS; OMIM #300624) - це найбільш поширена у світі спадкова форма розумової відсталості. FXS є Х-зчепленим домінантним порушенням розвитку нервової системи, яке характеризується когнітивними та поведінковими ускладненнями та лицьовим диморфізмом (подовжене обличчя, особлива форма вух). Можливі легкі та важкі форми захворювання. Жінки, гетерозиготні за такою мутацією, характеризуються низкою симптомів, проте суттєво менш вираженими, ніж у чоловіків, внаслідок наявності нормального алелю у генотипі.

Пацієнти з FXS характеризуються експансією тринуклеотидних повторів CGG у промоторному регіоні гену fragile X mental retardation (FMR1), який розміщений у Xq27.3. Здорові люди мають від 5 до 44 повторів CGG, тоді як хворі з повною мутацією характеризуються наявністю близько 200 повторів. Передмутаційному стану притаманна наявність від 55 до 200 повторів та сіра зона характеризується експансію від 45 до 54. Чим більша кількість повторів, тим більш нестабільним є алель. Довжина експансії також визначає ризик успадковування повного мутантного алеля. Повний мутантний та передмутантний алель можуть входити до складу генотипу однієї особини, що призводить до мозаїцизму FXS, який дуже ускладнює встановлення точного діагнозу.

Експансія повторів CGG призводить до метилювання даного фрагменту ДНК, що у випадку алеля з повною мутацією веде до епігенетичного сайленсингу гена *FMR1* та, як наслідок, відсутності його продукту, білка fragile X mental retardation protein (FMRP). FMRP ідентифікується у всіх клітинах, але особливо високий його рівень спостерігається у нейронах, де він відповідає за синаптичну пластичність та розвиток нейронів. Білок FMRP має РНК-зв'язуючі властивості та регулює численні процеси, пов'язані з метаболізмом РНК, зокрема з транспортом та локалізацією іРНК у дендритах та синапсах. Відсутність цього білка викликає дефекти морфології нейронів та їх фізіології, що призводить до затримки нервового розвитку, яким характеризуються хворі на цей синдром.

Ефект положення та метилювання ДНК: фаціо-плечелопаткова м'язова дистрофія. Фаціо-плечелопаткова м'язова дистрофія (*facioscapulohumeral muscular dystrophy;* FSHD, OMIN #158900) – це аутосомно-домінантна міопатія, яка характеризується поступовою, зазвичай асиметричною слабкістю та деградацією м'язів обличчя, плечей та рук. Клінічна картина пацієнтів з FSHD може також включати додаткові риси, такі як втрата слуху, ретинопатії, уповільнена розумова діяльність та приступи епілепсії. Причиною FSHD вважаються не моногенні порушення, а дерегуляція епігенетичних механізмів, що в свою чергу призводить до аберантної транскрипції багатьох генів.

У геномах більшості пацієнтів з даною патологією спостерігаються молекулярні перебудови у прителомерній ділянці довгого плеча 4 хромосоми (4q35), яка являє собою макросателітні тандемні повтори довжиною 3.3кб, D4Z4. Здорові люди містять у своєму геномі від 11 до 100 таких повторів, тоді як хворі на FSHD характеризуються їх зниженою кількістю, а саме від 1 до 10. Відмічається значна варіабельність фенотипів у хворих, яка корелює з числом повторів D4Z4 та, відповідно, гіпометилюванням ДНК. Чим менша кількість повторів спостерігається у геномі, тим раніше починається та більш швидко

прогресує це захворювання. Цікаво, що повна делеція повторів D4Z4 та сусідніх з ними ділянок ДНК довжиною 200 кб призводить до FSHD.

Повтори D4Z4 метильовані у здорових людей, а у хворих на FSHD спостерігається їх гіпометилювання. У деяких випадках таке гіпометилювання пов'язане зі вкороченням вказаної ділянки. Цей факт свідчить про подвійну природу генетичних дефектів, які призводять до FSHD, - залежні від делеції D4Z4 (FSHD I типу) та незалежні від неї (FSHD II типу). Вище було розглянуто FSHD I типу.

На хромосомі 10q26 є ще один масив повторів D4Z4, які демонструють 98%-ну ідентичность з такими на хромосомі 4q35. Тим не менше, вважається, що короткий масив повторів D4Z4 сам по собі не є відповідальним за розвиток FSHD, адже майже ідентичні масиви у хромосомі 10q26 не мають патогенного ефекту у випадку їх рівної короткої довжини. Крім того, безсимптомні носії такої перебудови також асоційовані зі зниженням метилювання ДНК D4Z4 у обмеженому локусі. Це вказує на те, що гіпометилювання D4Z4 само по собі не достатнє для виникнення FSHD, але воно може підвищувати експресію генів, розміщених поряд з даними ділянками повторів. Як вже вказувалось, хворі на FSHD характеризуються підвищенням експресії певних генів, а саме *FRG1 (FSHD region gene 1), FRG2 (FSHD region gene 2), ANT1*та *DUX4*, які розміщені проксимальніше D4Z4. Отже, роль повторів D4Z4 полягає у обмеженні експресії розміщених поблизу них генів. У цьому процесі важливу роль відіграє гіпометилювання даного регіону, яке може відбуватися за рахунок зменшення кількості повторів D4Z4 або незалежно від неї, що призводить до підвищення експресії генів-кандидатів. Також не можна виключити, що і інші епігенетичні механізми залучені у розвиток FSHD.

Крім гіпометилювання ДНК, у пацієнтів FSHD спостерігаються модифікації гістонів у 4q35 ділянці хромосоми, де розташовуються D4Z4 повтори, які більш характерні для факультативного, ніж конститутивного гетерохроматину. У цій же ділянці хромосоми в нормі спостерігаються і H3K9me3, і H3K27me3 модифікації гістонів (мітки репресії транскрипції), які

відсутні у пацієнтів з FSHD. Втрата H3K9me3 запобігає зв'язуванню гетерохроматин-зв'язуючого білка HP1γ та когезину з повторами D4Z4, що і призводить до зняття генної репресії. Більше того, в нормі з повторами D4Z4 та промотором гену *FRG1* зв'язується транскрипційний фактор YY1, який у свою чергу рекрутує білок EZH2. Даний білок представляє собою метилтрансферазу H3K27me3 та відноситься до білків групи Polycomb, які у вищих еукаріот приймають участь у транскрипційному сайленсингу. У випадку захворювання менша кількість повторів D4Z4 знижує спорідненість білків YY1 та EZH2 до цієї ділянки, що в свою чергу призводить до зняття мітки репресії хроматину H3K27me3 та сприяє дерепресії генів. Таким чином, роль білків групи Polycomb у сайленсигу даного регіону не викликає сумнівів.

У кожному повторі D4Z4 існує послідовність довжиною 27 пн, з якою специфічно зв'язується репресорний комплекс, з'єднаний з YY1, HMGB2 та нуклеоліном (негістоновим основним білком, що входить до складу ядерцевого організатора). Окрім інших механізмів сайленсингу (наприклад, роботи DNMTs і HDACs та зв'язування білка HP1), даний комплекс зазвичай взаємодіє з D4Z4 у регіоні 4q35, обумовлюючи репресію транскрипції розміщених там генів. У випадку зменшення числа повторів D4Z4, комплекс не може сформуватися в даному регіоні, що призводить до утворення відкритого стану хроматину та сприяє надекспресії цільових генів. Більше того, поряд з повторами D4Z4 існує сайт прикріплення до ядерного матриксу, який бере участь у формуванні петельних доменів хроматину. Таке прикріплення до матриксу у даному сайті є набагато слабкішим у хворих на FSHD, ніж у здорових людей, що також впливає на структуру хроматину. Повтори та сусідні до них гени знаходяться у межах двох петель хроматину у міобластах здорових людей, тоді як у клітинах цього ж типу у хворих на FSHD вони розміщені у межах лише однієї петлі, підсилюючи *cis*-регуляцію зазначених генів.

Враховуючи все вищесказане, FSHD виникає внаслідок порушення (gain-of-function) певних генів, яке відбувається у результаті зміни структури хроматину. Спочатку дослідження були сфокусовані на гені *FRG1*, який

розташовується поряд з масивом повторів D4Z4 у хромосомі 4q35. Даний ген надекспресується у хворих на FSHD. Крім того, лише індукована експресія гену *FRG1* призводить у мишей до подібного до FSHD фенотипу, який не спостерігається при індукції експресії інших генів-кандидатів, таких як *FRG2* та *ANT1*. Точна функція гену *FRG1* залишається до кінця не визначеною, але продемонстровано, що його експресія залежить від етапу розвитку організму, а її відхилення від норми пов'язані з порушенням мускулатури та судин, що характерно для FSHD. Вважається, що він залучений у різноманітні аспекти біогенезу РНК. Зниження експресії *FRG1* призводить до корекції м'язових порушень у хворих мишей, що може стати ефективним засобом усунення симптомів при домінантних міопатіях FSHD. Отже, перебіг захворювання може бути опосередкований, принаймні частково, експресією гену *FRG1*.

Іншим напрямком досліджень причин FSHD є визначення ролі у захворюванні МГЕ, а саме ретроелементу, який кодує ген *DUX4* (передбачуваний ген з двома гомеодоменами), що присутній у всіх одиницях повтору D4Z4. Ген *DUX4* вважався функціонально неактивним, оскільки не містить інтронів та сигналу поліаденілування, а його активну транскрипцію не детектували *in vivo*. Цікаво, що відкрита рамка зчитування та її організація є дуже консервативними всередині повторів D4Z4. У більш пізніх дослідженнях було виявлено наявність і мРНК, і білка DUX4 у первинних міобластах, отриманих у хворих на FSHD, проте вони були відсутні у клітинах того ж типу здорових людей, що свідчить про можливість впливу самих повторів D4Z4 на перебіг захворювання шляхом активації гена *DUX4*. Як вже зазначалося, повтори D4Z4 не містять сигналу поліаденілування, тому вважається, що мРНК з *DUX4* синтезується виключно з дистальної ділянки масиву повторів, а саме з послідовності pLAM, яка містить сигнал поліаденілування. Сигнал поліаденілування pLAM може стабілізувати транскрипти *DUX4*. Певні SNP на цій ділянці призводять до експресії даного гену у пацієнтів, хворих на FSHD. Ген *DUX4* кодує два сплайс-варіанти. У м'язах здорових людей зазвичай спостерігаються лише низькі рівні концентрації короткого транскрипту, який

несе інформацію про вкорочений білок, тоді як повнорозмірна ізоформа виявлена у клітинах хворих на FSHD. Експресія мРНК останньої відбувається тільки на певних стадіях розвитку організму та відсутня у більшості соматичних тканин. Хоча дуже мало відомо про функції *DUX4,* експерименти по трансфекції свідчать, що він може характеризуватися проапоптозним ефектом та впливати на міогенез.

Генетичний контроль механізму модифікації гістонів

Генетичні дефекти CBP та EP300: синдром Рубінштейна-Тайбі

Синдром Рубінштейна-Тайбі (Rubinstein-Taybi syndrome; RSTS, OMIM #180849) – аутосомно-домінантне захворювання, яке спостерігається лише у гетерозигот. Хворі характеризуються затримкою психомоторного розвитку, аномаліями лиця, такими як опущені вниз щілини ока, широка спинка носа, дзьобоподібна форма носа та мікрогнатія, скелетними порушеннями кінцівок, такими як радіально відведені фаланги та широкі і подвоєні дистальні фаланги пальців. Крім того, у хворих на RSTS можуть проявитися і інші симптоми, наприклад, довгі нігті, вроджені вади серця та проблеми зі шкірою. Загальною особливістю клінічної картини захворювання є підвищена схильність до виникнення пухлин.

Цитогенетичний аналіз виявив, що причиною більше половини випадків захворювання на RSTS є мутації *de novo* у двох генах: cAMP response element-binding protein (*CREBBP*-або *CBP*), який розміщений у регіоні 16p13.3, та E1A-associated protein p300 (*EP300*), який розміщений у регіоні 22q13. У гені *CBP* такі мутації відбуваються часто та спостерігається їх широкий спектр, який включає зсув рамки зчитування, нонсенс, місенс та порушення сплайс-сайтів, тоді як значно рідше зустрічаються великі делеції, інсерції та транслокації у даному гені. Мутації у гені *EP300* вважаються рідкісними. Мутації як у першому, так і у другому гені зустрічаються в гетерозиготі.

Продукти обох генів підвищують рівень транскрипції цільових генів низки процесів шляхом рекрутування РНК-полімеразного комплексу II у

промоторні регіони та збільшення гістон-ацетилтрансферазної активності. Хоча функції продуктів обох генів частково перекриваються, на сьогоднішній день цілком зрозуміло, що білки мають різні властивості. З усіх можливих мутацій у гені *CBP*, до RSTS призводять тільки ті, які стосуються HAT-домена. Така ситуація свідчить про те, що ремоделювання хроматину є ключовим фактором у розвитку даного захворювання, а функції білків генів *CBP* та *EP300* разом з продуктами інших генів-кандидатів беруть спільну участь у молекулярних шляхах цього процесу. У мишей гомозиготні дефішенсі *Cbp* та *Ep300* призводять до ембріональної смертності, як і у дигетерозиготних нокаутів ембріонів, вказуючи на те, що обидва гени необхідні для нормального розвитку організму.

Через різноманітну генетичну природу RSTS, тільки у близько 50% пацієнтів вдається коректно визначити генетичне порушення, яке призводить до розвитку захворювання. Отже, метою подальших досліджень повинна стати ідентифікація інших можливих генів, порушення яких призводять до виникнення симптомів RSTS.

Генетичні дефекти гена *RSK2*: синдром Коффіна-Лоурі. Синдром Коффіна-Лоурі (Coffin-Lowry syndrome; CLS, OMIM #303600) – це рідкісна форма розумової відсталості, яка спадкується зчеплено з Х-хромосомою. Уражені чоловіки демонструють затримку психомоторного розвитку, особливості лиця (широко розставлені та скошені униз очі, виразну щелепу та товсті губи), мікроцефалію, низький зріст, деформацію скелету (звужені пальці на руках та ногах). У жінок-носіїв захворювання є ризик розвитку зниженої здатності до навчання та фізичних аномалій.

CLS викликають мутації, які призводять до втрати функціональності, у гені ribosomal protein S6 kinase 2 (RSK2), який кодує серин/треонін кіназу та локалізується у регіоні Xp22.2. Білок RSK2 бере участь у MAP-кіназному сигнальному шляху (mitogen-activated protein kinase pathway) разом з трьома іншими представниками родини білків RSK: RSK1, RSK3 та RSK4. Дані білки активуються за участі кіназ ERK1 and ERK2 (extracellular signal-regulated kinase)

у відповідь на широкий діапазон сигналів, таких як стимуляція інсуліном, фактори росту, нейротрансміттери, УФ-випромінення та злоякісні перетворення, та беруть участь у таких важливих клітинних процесах, як проліферація, диференціація, апоптоз та відповідь на стрес шляхом фосфорилювання низки субстратів. Мутації у гені *RSK2* є дуже гетерогенними (місенс, нонсенс, зсув рамки зчитування, зміна сплайс-сайтів, короткі делеції та інверсії, великі делеції). Неврологічні симптоми CLS можуть бути наслідком зниження або навіть повної відсутності активності білка RSK2, що в свою чергу ускладнює нормальну секрецію гормонів у нейрокринних–клітинах, викликає порушення регуляції росту нейритів, впливає на диференціацію попередників нервових клітин у зрілі нейрони та індукує порушення функціональності AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) у складі AMPA глутамат рецептору, що обумовлює швидко збудливу синаптичну передачу у межах центральної нервової системи. На противагу цьому у клітинах пухлин ген *RSK2* часто надекспресується, що свідчить про необхідність точної регуляції його експресії для перебігу нормальних процесів.

Епігенетична природа даного синдрому пояснюється тим фактом, що RSK2 змінює структуру хроматину за участі двох основних механізмів: безпосереднього фосфорилювання гістону H3 та взаємодії з білком CBP, який впливає на експресію генів. Крім того, RSK2 здатний фосфорилювати і інші білки, а отже, число генів, які регулює RSK2, може бути значно більшим, що обумовлює необхідність подальших досліджень для їх ідентифікації.

Генетичні дефекти, які обумовлюють синдром Сотоса. Синдром Сотоса (Sotos syndrome; OMIM #117550) це стан надто швидкого росту у дітей, який вперше був описаний у 1964 році Сотосом та ін. як церебральний гігантизм. Проте головна причина даного синдрому не була визначена аж до 2002 року, коли Куротакі (Kurotaki) зі співавт. виявили мутації та делеції у гені *NSD1* (nuclear receptor SET domain containing gene 1), який відноситься до родини гістон-лізин-метилтрансфераз ссавців, що залучені до процесів розвитку організму.

Діти, уражені синдромом Сотоса, характеризуються великим розміром тіла та раннім прискореним ростом, особливостями лиця (макроцефалія, щелепа, яка видається, скошені вниз щілини ока, висока лінія волосся та рідке волосся) та затримкою розвитку, яка зазвичай супроводжується ускладненнями слуху. Також з даним синдромом асоційовані і інші особливості, такі як неонатальна жовтуха, гіпотонія, напади, сколіоз, серцеві дефекти та аномалії сечостатевої системи. Збільшення росту та ваги має тенденцію до нормалізації у пубертатний період, і тоді зріст і вага дорослих стають близькими до середніх показників у нормі. Синдром Сотоса, як і інші синдроми, які характеризуються надмірним ростом, зазвичай пов'язаний з більшою частотою виникнення пухлин, ніж у здорових індивідів, зокрема, до розвитку крижово-куприкової тератоми та гематологічних злоякісних пухлин.

Ген *NSD1*, який розміщений на хромосомі 5q35, кодує гістон-метилтрансферазу з багатьма функціональними доменами, а саме доменами, які мають стосунок до ремоделювання хроматину, SET, SAC (SET-associated Cys-rich), п'ять доменів PHD, два PWWP, та два домени взаємодії з ядерними рецепторами NID-L та NID+L (nuclear receptor interaction), які пов'язані з корегуляторами бімодальної транскрипції. Ген *NSD1* експресується у низці тканин, серед яких тканини головного мозку ембріонів та дорослих, нирок, скелетних м'язів, селезінки та тимусу. Нещодавно було показано, що NSD1 регулює експресію генів шляхом модулювання різних рівнів метилювання H3K36. Гени, які підлягають такій регуляції, наприклад, *bone morphogenetic protein 4* (*BMP4*), беруть участь у багатьох процесах, що відображається у ролі *NSD1* у розвитку певних захворювань, таких як рак та синдром Сотоса. Крім того, NSD1-залежна метилююча активність сприяє рекрутуванню RNAPII на промотор, як і BMP4, ініціацію та елонгацію транскрипції. NSD1 здатний метилювати також негістонові білки, наприклад, K218 та K221 субодиниці p65 білка NFKβ.

Більшість випадків захворювання на синдром Сотоса є спорадичними та спричиняються мутаціями *de novo* (точкові мутації, мікроделеції 5q35, часткові

делеції) у будь-якій частині гену. Однак різноманітні фенотипові прояви можуть вказувати на гетерогенну природу виникнення синдрому. Різновиди мутації можуть бути етнічно специфічними

Порушення модифікації гістонів у ракових клітинах. Хоча модифікації гістонів мають різну хімічну природу, зв'язок з раком продемонстрований для ацетилювання та метилювання хвостів гістонів H3 та H4. Наявність або відсутність певних міток гістонів була описана у ракових клітинах, наприклад, у них спостерігається втрата H4K16Ac та/або H4K20me3 у послідовностях, які повторюються. Крім того, ідентифікуються аберантні модифікації гістонів, такі як деацетилювання H3 та H4, втрата H3K4me3 та наявність H3K9me та H3K27me3, що разом з метилюванням ДНК у промоторних регіонах призводить до порушення регуляції експресії генів. Не тільки самі гістонові мітки неправильно формуються у ракових клітинах, а і патерн експресії гістон-модифікуючих ферментів відрізняється від нормального, а суть таких відмінностей залежить від типу клітин. Це свідчить про суттєву роль модифікацій гістонів у розвитку онкологічних захворювань.

Наприклад, аберантна активність HAT, причиною якої є мутації у цьому гені та порушення регуляції його експресії вірусними онко-білками, встановлена у клітинах гематологічних та солідних пухлин. Хромосомні транслокації, які зачіпають гени гістон-модифікуючих ферментів, можуть впливати на активність ферментів останніх, зокрема при лейкемії. Наприклад, транслокація *HAT* або пов’язаних з ним генів, таких як *TIF2, MOZ, MORF* та *HDACs,* призводять до утворення злитих білків, що в свою чергу, імовірно, і обумовлює неправильну регуляцію експресії генів-мішеней шляхом порушення характерного для норми ремоделювання хроматину. Дуже часто при онкологічних захворюваннях спостерігаються мутації у генах родини білків гістонових метилтрансфераз mixed-lineage leukemia (MLL). Хромосомні перебудови, які зачіпають гени *MLL*, пов’язані з порушенням регуляції *Hox* генів при лейкемії. Мутації, які призводять до дефектного MLL, були виявлені у генах *MLL2* та *MLL3* у клітинах первинної медулобластоми та не-

ходжкінської лімфоми. Крім того, саме для цієї форми раку було раніше показано наявність делецій та ампліфікацій у генах, продукти яких модулюють метилювання H3K9. Ці мутації впливають не тільки на гістонові метилтрансферази, наприклад, EHMT1 та SMYD4, а і деметилази гістонів, до складу яких входить домен jmjC, а саме білки JMJD2B та JMJD2C.

Епігенетичні зміни, викликані експансією нуклеотидних повторів

Експансія тринуклеотидів CAG та посттрансляційні модифікації гістонів: хорея Гентінгтона. Хорея Гентінгтона (Huntington disease, HD, OMIM #143100) – це не сумісне з життям неврологічне захворювання, викликане домінантною мутацією у аутосомі (4p). Захворювання триває близько 20 років, та носії мутації зазвичай характеризуються відсутністю симптомів до середнього віку. Мозок поступово дегенерує, а пацієнти демонструють моторні порушення (хорея та дистонія), психічні та поведінкові порушення разом з когнітивними вадами, що врешті-решт в кінці-кінців призводить до втрати когнітивних функцій.

Хорею Гентінгтона викликають порушення у гені *IT15*, який кодує білок гентінгтин, що експресується у всіх тканинах, хоча у цьому захворюванні уражується саме головний мозок, зокрема, смугасте тіло. Мутація, яка призводить до розвитку даного захворювання, являє собою експансію тринуклеотидних повторів CAG у межах екзону 1, які транслюються у поліглутамінову (polyQ) послідовність амінокислот. Після цього відкриття HD було віднесено до групи неврологічних захворювань, які називаються захворюваннями polyQ, особливістю яких є наявність експансії тринуклеотидів CAG. У геномі неуражених людей кількість повторів складає 5-36, тоді як експансія 40 і більше повторів обумовлює захворювання з повною пенетрантістю. Довжина повторів обернено корелює з віком початку захворювання та поступово підвищується від молодого віку до 70 років. Наявність 36-39 повторів вказує на неповну пенетрантність, що обумовлює високий ризик розвитку HD у їх носіїв. Дефектний амінокислотний ланцюг з

polyQ перешкоджає формуванню нативної структури гентінгтину, що в свою чергу призводить до втрати цим білком його функціональності. Крім того, такий змінений гентінгтин не підлягає протеолітичному розщепленню, та разом з білками, з якими він взаємодіє, накопичується, формуючи у клітинах головного мозку токсичні агрегати, що обумовлює порушення його функцій.

Незважаючи на те, що генетична природа HD добре відома, описані генетичні варіанти не можуть пояснити всіх фенотипових варіацій цього захворювання. Наприклад, такі неменделівські особливості, як ефект батьківського походження (parent-of-origin effects) та генетична антиципація (genetic anticipation) не можуть бути пояснені з точки зору класичної генетики. У 1992 році була висунута гіпотеза, згідно якої причинами вказаних особливостей спадкування є ефект положення та епігенетичне спадкування. Роль епігенетики у HD була також підтверджена тим фактом, що у монозиготних близнюків, які несуть однакову кількість повторів CAG, спостерігається помітна різниця у фенотипових проявах цього захворювання.

Відомо, що ацетилювання гістонів виступає суттєвим модулятором стабільності геному при даному захворюванні. У дослідженнях на дріжджах та культурі астроцитів людини було показано, що специфічні HDACs сприяють експансії повторів CAG, тоді як гістон-ацетилтрнасферазна активність білків CBP та p300/CBP-associated factor, які безпосередньо зв’язуються з мутантним гентінгтином, інгібують елонгацію транскрипції. На мишиних трансгенних моделях показано, що різноманітні інгібітори HDAC знімають симптоми, а саме покращують рухову активність або зменшують нервову атрофію. Наведені факти надають ґрунтовні докази важливої ролі модифікацій гістонів у етіології HD, проте відомі зміни і у інших модифікаціях гістонів, описані у випадку даного захворювання. Наприклад, спостерігається підвищення рівня метилювання H3K9 у людини та трансгенних мишей, причиною якого є підвищений рівень експресії гістон-метилтрансферази ESET (ERG-associated protein with SET domain). Крім того, було показано, що мутантний гентінгтин обумовлює порушення регуляції транскрипції, що може пояснюватися

варіаціями посттрансляційних модифікацій, до яких даний білок може мати стосунок у нормі.

Генетичний контроль ремоделювання хроматина

Різні комплекси ядерних білків відповідають за контроль взаємодії різних компонентів хроматину, забезпечуючи зв'язування транскрипційних факторів з цільовими послідовностями ДНК та здійснюючи адекватну транскрипцію генів. Білки ремоделювання хроматину разом з метилюванням ДНК та модифікаціями хвостів гістонів регулюють цей процес. Деякі з білків ремоделювання хроматину містять у своєму складі ДНК-залежний АТФазний домен, який відноситься до родини SNF2 (sucrose non-fermenting 2). В залежності від гомології послідовностей таких консервативних АТФазних доменів, білки відносять до різних родин, наприклад, SWI2/SNF2 (switching/sucrose non-fermenting chromatin remodeling complex), CHD та інших.

Порушення білків ремоделювання хроматину впливає на структуру останнього, що призводить до порушення регуляції експресії генів. У результаті виникають численні захворювання, які супроводжуються порушеннями епігенетичних механізмів, такі як Х-зчеплена розумова відсталість з альфа-таласемією (α thalassemia X-linked mental retardation (ATR-X) syndrome), CHARGE синдром, синдром Кокейна (Cockayne B syndrome) та підвищенням ризику онкологічних захворювань.

Х-зчеплена розумова відсталість з альфа-таласемією. *Х-зчеплена розумова відсталість з альфа-таласемією (α thalassemia X-linked mental retardation, ATR-X syndrome;* OMIM #301040) – це рідкісне Х-зчеплене рецесивне захворювання, яке зазвичай характеризується загальною затримкою розвитку, лицьовим дисморфізмом, м'якою α таласемією, порушеннями скелету та сечостатевої системи. Вражає здебільшого чоловіків,

Зазвичай у хворих на ATR-X спостерігається загальна затримка розвитку, що у 95% випадків призводить до розумової відсталості. Іноді також присутня аутистична поведінка. У будь-якому випадку у хворих обмежена виразна мова,

наявна гіпотонія та характерні лицьові аномалії. Крім того, хворі на ATR-X страждають від порушень скелету, імовірно як наслідок гіпотонії, гастроезофагіального рефлюкса (ретроградного просування вмісту шлунка через нижній стравохідний сфінктер в стравохід) та генітальних аномалій, які можуть проявлятися в залежності від природи мутацій, що викликають захворювання, у діапазоні від неопущення яєчок або відсутності крайньої плоті до невизначених геніталій. М'яка форма α-таласемії, яка проявляється наявністю тілець включень гемоглобіну Н у еритроцитах та викликана дефектами генів α глобіну, спостерігається не завжди. Гетерозиготні жінки зазвичай характеризуються нормальними фізичними та інтелектуальними здібностями. Таке явище є наслідком невипадковості інактивації Х-хромосоми, яка поширена у жінок-носіїв Х-зчеплених мутацій: інактивується переважно хромосома з дефектним алелем. Це відбувається не в ході раннього ембріогенезу, а на більш пізніх етапах розвитку шляхом тканино специфічного відбору.

У більшості описаних випадків причиною виникнення ATR-X є мутації у гені *ATRX*, який розміщений у хромосомі Xq13 та кодує білок ремоделювання хроматина. Ген *ATRX* був вперше описаний у 1995 році. Він відноситься до родини SNF2, представники якої залучені у процеси регуляції транскрипції, клітинного циклу, репарації ДНК, розходження хромосом у процесі поділу клітини. У складі гену *ATRX* ідентифіковано два домени. Домен ADD (ATRX-DNMT3- DNMT3L), оскільки він гомологічний представникам родини *de novo* метилтрансфераз DNMT3, на N-кінці білка взаємодіє з N-кінцевим GATA-like Zn пальцем, ~~а~~ PHD-подібним пальцем та довгою С-кінцевою спіраллю, утворюючи глобулярний домен, який може мати ДНК-зв'язуючі властивості. Іншим головним доменом є SWI/SNF-like ATPase/helicase, який демонструє слабку хроматин-ремоделюючу та сильну ДНК-транслоказну активності *in vitro*.

Мутації у кластері генів *ATRX* відбуваються здебільшого у межах ADD (50%) та геліказному (30%) доменів. Більшість мутацій – це місенс мутації, які

потенційно за умови зміни занурених у глобулу білка амінокислотних залишків можуть призводити до зміни його структури. У випадку зміни амінокислотних залишків на поверхні білка можуть руйнуватися потенційні сайти зв'язування транскрипційних факторів та інших білків. Проте у хворих на ATR-X були виявлені лише великі внутрішньогенні дуплікації, які призводять до втрати функціональності білка.

Білок ATRX присутній переважно у прицентромерному гетерохроматині. Зазвичай ATRX рекрутується за участі гістон-H3-зв'язуючого модуля білка HP1α. Таке звязування посилюється H3K9me3 та інгібується H3K4me3 і H3K4me2. Мутації і у *ATRX*, і у генах, які порушують H3K9me3, призводять до дефектного зв'язування та локалізації прицентромерного гетерохроматину. У експериментах на дріжджах було показано, що ATRX може взаємодіяти з білком групи Polycomb EZH2, який є гістон-лізин N-метилтрансферазою. У ядерних тільцях хворих на промієлоцитарну лейкемію ATRX утворює комплекси з білком Daxx (death-domain-associated protein) та бере участь у ремоделюванні хроматину генів, які контролюються за участі взаємодіючих з Daxx сайт-специфічних транскрипційних факторів. Позбавлені ДНК-метилзв'язуючого білка MeCP2 нейрони демонструють дифузний розподіл ATRX у ядрі, що свідчить про участь білка MeCP2 у рекрутуванні ATRX. Нульові мутації *Atrx* призводять до ембріональної смертності та індукують зміни патерну метилювання ДНК у мишей. Фенотипова варіабельність у хворих на синдром ATR-X є результатом локалізації мутації у гені *ATRX*, але жодного випадку дійсної нульової мутації не відомо.

У людини мутації *ATRX* призводять перш за все до зниження експресії гена α глобіну, що і є першопричиною виникнення α таласемії. Проте деякі хворі на синдром ATR-X не демонструють порушень на гемалогічному рівні. Цікаво, що зміни метилювання ДНК спостерігаються переважно у генах рРНК, у сателітних повторах в У-хромосомі (DYZ2) та у прителомерних повторах.

Алельні мутації *ATRX* зазвичай пов'язані з розумовою відсталістю. Синдром ATR-X – не єдине захворювання, яке викликають мутації даного гена.

Іншими синдромами, пов’язаними з порушенням функціональності ATRX, які об’єднують розумову відсталість та дисморфізм, є синдроми Юберга-Марсіді (Juberg-Marsidi), Карпентера-Вацирі (Carpenter-Waziri), Холмса-Ганга (Holmes-Gang), Сміта-Фінемана-Майерс (Smith-Fineman-Myers) та Чудлей-Лоурі (Chudley-Lowry).

На сьогодні виявлені деякі кофактори ATRX, а саме білки HP1, EZHZ, Daxx, MeCP2 та когезін (комплекс білків, який регулює процес розділення сестринських хроматид в ході поділу клітини). Крім того, нещодавно було ідентифіковано 12 сайтів зв’язування транскрипційних факторів у 5’ регуляторній ділянці *ATRX* ссавців, які можуть бути кандидатами регуляторів експресії даного гена. ATRX є необхідним для нормального розвитку не тільки головного мозку і багатьох частин центральної нервової системи, він також регулює функціонування соматичних клітин та клітин зародкового шляху і гаметогенез. Вважається, що *ATRX* є переважно геноспецифічним регулятором, проте це потребує подальших уточнюючих досліджень.

Синдром CHARGE. Синдром *CHARGE* (OMIN #214800) – це комплексне аутосомно-домінантне захворювання, яке характеризується поєднанням багатьох вроджених вад. До них відносяться колобома (вроджений дефект) очей, серцеві порушення, атрезія хоан (порушення прохідність порожнини носа у зв'язку з її частковим зарощенням), важка відсталість росту та розвитку, порушення слуху, а також генітальні аномалії та гіпогонадизм.

У кожних двох з трьох випадків цього синдрому ідентифікуються мутації у гені *CHD7* (chromodomain helicase DNA-binding protein seven), який розміщений на хромосомі 8q12.2. CHD7 належить до родини білків CHD, яка включає АТФ-залежні хроматин-ремодулюючі білки. До складу білка CHD7 входять два N-кінцевих хромодемена, які забезпечують зв’язування з метильованими гістонами, центральний домен SWI2/SNF2-like ATPase/helicase, який має хроматин-ремодулюючу активність, домен SANT (Swi3, Ada2, N-Cor та TFIIIB), який бере участь у зв’язуванні з ДНК та/або модифікованими гістонами, та два домени BRK, функції яких невідомі. Ферменти

ремоделювання хроматина зазвичай реалізують свій вплив шляхом взаємодії з іншими білками. Це стосується і білка CHD7. Він асоційований з PBAF (Polybromo and BRG-associated factor-containing complex), хроматин ремоделюючим компонентом комплексу родини SWI/SNF, який є важливим для активації програм транскрипції, пов'язаних з формуванням мультипотентного мігруючого нервового гребеня зародка. Останній являє собою тимчасову клітинну популяцію з плюрипотентним потенціалом диференціації. Ген *CHD7* експресується у всіх типах клітин на ранніх стадіях розвитку. Пізніше його експресія підвищується у клітинах органів, пов'язаних з розвитком синдрому CHARGE і у мишей, і у людини. Все вищезазначене свідчить, що експресія *CHD7* регулюється як просторово, так і у часі.

CHD7 рекрутується до специфічних сайтів в залежності від клітинного контексту. Патерн таких комплексів сильно корелює з розміщенням міток H3K4me. Така ситуація разом з тим фактом, що сайти зв'язування CHD7 здебільшого розміщені дистально від консервативних сайтів початку транскрипції, гіперчутливих до ДНКаз, свідчить про залучення білка CHD7 до процесів ремоделювання хроматину шляхом впізнання модифікацій гістонів та наступної зміни структури хроматину. Крім того, було показано, що CHD7 має спорідненість до гіпометильованої рДНК та, таким чином, може діяти як позитивний регулятор синтезу рРНК.

Деякі з вищезгаданих мутацій належать до місенс мутацій, проте більшість – це нонсенс та мутації зсуву рамки зчитування, які формуються *de novo* та повинні призводити до гаплонедостатності *CHD7*, а отже, продукуванню порушеного білка. Миші, гомозиготні за нуль-алелем *Chd7,* гинуть на ранніх ембріональних стадіях, проте гетерозиготні ембріони виживають та народжуються з вадами розвитку, які дуже схожі на прояви синдрому CHARGE у людини. Крім того, у хворих на синдром CHARGE виявлені хромосомні аномалії, зокрема інтерстиціальні делеції ділянки 8q12.2-q13 та збалансовані транслокації, які зачіпають 8q12. Вважається, що мутації у гені *CHD7*, які спричиняють спорадичні випадки захворювання синдромом

CHARGE, здебільшого мають батьківське походження. Мутації у гені *CHD7* можуть також бути причиною інших рідкісних генетичних синдромів, зокрема синдромів Калмана (Kallmann) та Ді Джорджи (DiGeorge).

Клінічні прояви синдрому CHARGE надзвичайно варіабельні, а мутації у гені *CHD7* можуть тільки допомогти у постановці діагнозу, але не у передбаченні симптомів захворювання у конкретної людини. Крім того, у третини пацієнтів мутації у гені *CHD7* взагалі не ідентифікуються, що свідчить про можливе залучення інших хромосомних регіонів та генів-кандидатів у етіологію даного захворювання.

Синдром Кокейна В. Синдром Кокейна (Cockayne syndrome; CS) це рідкісне аутосомно-рецесивне захворювання, яке характеризується затримкою росту в перші роки життя, прогресуючою неврологічною дисфункцією та різними симптомами, схожими на передчасне старіння, зокрема втратою слуху, ретинальною дегенерацією та проблемами шкіри.

Синдром Кокейна поділяють на дві генетичні групи, A (CSA, OMIM #216400) та B (CSB, OMIM #133540). Більшість хворих несуть мутації у гені *CSB*. Крім того, фенотип CS можуть спричиняти мутації у генах xeroderma pigmentosum (*XPB*, *XPD* та *XPG*).

Білки CSA та CSB беруть участь у механізмах ексцизійної репарації нуклеотидів. Зокрема, білок CSB залучений у пов’язані з транскрипцією процеси репарації. Білок CSB (також відомий як group 6 excision repair cross-complementing protein; ERCC6) належить до групи SWI2/SNF2- like-dependent ATPases, які огортають ДНК та діють як ремодулятори хроматину. Мутації, які викликають синдром Кокейна В, здебільшого відбуваються поза екзоном 5, змінюючи АТФазну або С-кінцеву ділянки, що призводить до продукування порушеного білка. Головною особливістю клітин, отриманих від хворих на синдром Кокейна, є гіперчутливість до УФ опромінення та нездатність синтезувати РНК на нормальному рівні після УФ опромінення. Після впливу УФ АТФазний та С-кінцевий домени є основними стабілізаторами зв’язування CSB з хроматином в транскрипційних сайтах пошкодженої ДНК, проте у

нормальному фізіологічному стані така взаємодія інгібується N-кінцевим доменом самого CSB шляхом конформаційних змін. Цікаво, що особливості порушення регуляції генів у клітинах нульових мутантів *CSB* подібні до таких після обробки епігенетичними чинниками, такими як інгібітори HDACs та деметилюючі агенти. Більше того, CSB не формує комплекси з ферментами-модифікаторами гістонів, як інші білки групи SWI2/SNF2 ATPas-like, вони діють безпосередньо на хроматин.

Мобільний елемент piggyBac transposable element 3 (PGBD3), інтегрований у межі 5 екзону, призводить до утворення вкороченого білка (CSB-PGBD3), який експресується у хворих на синдром Кокейна B та може сприяти патогенезу захворювання шляхом ще невідомих механізмів.

Дефекти SNF5 та онкологічні захворювання. SWI/SNF є однією з найбільш досліджених родин хроматин-ремоделюючих комплексів, які є надзвичайно консервативними у різних таксонах від дріжджів до людини. Відсутність SNF5 (INI1), який в нормі присутній у всіх варіантах комплексів SWI/SNF, несумісна з виживання клітини. Порушення функції цього білка у результаті мутації гена, який його кодує, сприяє онкогенезу, і тому він вважається одним із генів-супресорів пухлин. На жаль, молекулярні механізми, за рахунок яких втрата SNF5 призводить до раку до сих пір залишаються нез’ясованими.

Мутації, які інактивують SNF5, були вперше описані у випадку злоякісних рабдоїдних пухлин, одного з найбільш агресивних видів раку у дітей. Крім того, мутантні спадкові алелі SNF5 можуть бути причиною сімейних випадків захворювання, яке отримало назву “rhabdoid predisposition syndrome”. Специфічні мутації у гені *SNF5* зазвичай не супроводжуються порушеннями в каріотипі. Така геномна стабільність у клітинах пухлин, у яких порушений ген *SNF5*, можливо, вказує на те, що основною причиною канцерогенезу у цьому випадку є зміна транскрипції генів епігенетичної природи.

У *Drosophila* втрата даного гену у контексті комплексу Brahma (SWI/SNF) призводить до порушень елонгації РНК-полімерази, регуляції сплайсингу та доступності хроматину, де розташовуються гени, які регулюються гормоном екдизоном, що свідчить про вплив SNF5 на низку сигнальних шляхів. У мишей гомозиготні делеції *Snf5* призводять до ембріональної смертності, хоча гетерозиготи характеризуються нормальним фенотипом, але у ранньому постнатальному періоді у них ідентифікують розвиток пухлин. У ембріональних фібробластах мишей інактивація *Snf5* веде до зупинки клітинного циклу та апоптозу. Умовний сайленсинг *Snf5* та *p53* прискорює формування пухлин, що свідчить про роль p53 як посередника онко-супресорної активності Snf5. У світлі даного відкриття, антиракова активність SNF5 може бути опосередкована його роллю у регуляції клітинного циклу. На підтвердження такої гіпотези можна навести дані щодо опосередкованості функції SNF5 іншими білками-регуляторами клітинного циклу (такими як p21 та Aurora Kinase A). Оскільки клітини лінії злоякісної рабдоїдної пухлини є високо інвазивними, інгібування їх міграції є вирішальним у захисній ролі SNF5 проти раку. Відсутність SNF5 пов’язана з ще одним сигнальним шляхом Hedgehog, який також активується під час онкогенезу.

Дефекти гену *SNF5* ідентифікуються і в інших типах злоякісних пухлин. Накопичені насьогодні дані свідчать, що це відбувається шляхом порушення регуляції клітинного циклу.

РОЗДІЛ 5. РЕПРОГРАМУВАННЯ ГЕНОМУ У ЕМБРІОГЕНЕЗІ

Репрограмування епігенетичних міток відбувається в зародкових тканинах тварин та рослин та включає в себе суттєве ремоделювання транскрипції, модифікації гістонів та використання різних варіантів гістонів, а також метилювання ДНК. Це репрограмування має глобальні наслідки для розвитку організмів, виникнення захворювань, трансгенераційної епігенетичної спадковості та старіння. У ссавців ідентифіковано **дві основні хвилі** репрограмування епігеному: перша хвиля відбувається після запліднення на стадії раннього ембріогенезу, а друга наступає в первинних статевих клітинах, які є ембріональними попередниками сперматозоїдів або яйцеклітин. В обох випадках, епігенетичне репрограмування включає глобальне зняття міток метилювання ДНК з подальшим масштабним реметилюванням.

За останні кілька років було проведено експерименти, які дозволили низці лабораторій створити перший повногеномний профіль метилювання ранніх ембіональних клітин та гоноцитів з високою роздільною здатністю, який спостерігається у вирішальні моменти процесу репрограмування. Крім того, роль факторів, які відіграють ключову роль у деметилюванні ДНК на ранніх ембріональних стадіях та у гоноцитах, була вивчена у низці досліджень, що дозволило краще зрозуміти ці процеси.

Динаміка репрограмування геному

Динаміка репрограмування метилювання ДНК ембріонів на стадії раннього ембріогенезу. Загальні рівні метилювання ДНК суттєво різняться у чоловічих та жіночих гаметах. Вони складають 40% в яйцеклітинах та 90% в спермі на момент запліднення. Об'єднуючись при заплідненні, батьківські епігеноми роблять різний внесок у епігеном ембріона. Специфічне для сперматозоїдів метилювання в основному обмежується міжгенними послідовностями та повторами з відносно слабко метильованими CpG острівцями. На противагу цьому, ДНК ооциту метильована переважно у межах

цих острівців, що призводить до відмінностей у метилювангні більше ніж 1300 CGIs між ооцитом та сперматозоїдом.

Більше десяти років тому було продемонстровано, що після утворення зиготи метильні мітки, які походять з сперматозоїдів, протягом наступних поділів дроблення видаляються **активно** (за участі ферментів), а з яйцеклітин - **пасивно**. Така хвиля зиготичного деметилювання не стосується усіх регіонів батьківського генома в рівній мірі. Масивна втрата метилювання відбувається у межах елементів, які повторюються, однак було показано, що цей процес нерівномірний, як у межах різних типів елементів, так і для послідовностей, що належать до однієї родини мобільних генетичних елементів. Такі відмінності можуть свідчити про диференційну активацію транскрипції у ранніх ембріонів за збереження репресії потенційно небезпечної активності ретротранспозонів. Інші ділянки мають очевидну необхідність у підтримці метилювання в умовах глобального деметилювання – такі, як **регіони контролю імпринтінга** (imprinting control regions, ICRs), які критичні для підтримання батьківського імпринтингу, який мусить бути збережений як в умовах активного, так і пасивного деметилювання.

Дослідження метилювання гіпометильованих регіонів продемонструвало, що ICRs – не єдині ділянки, які не підлягають деметилюванню ДНК в ранньому ембріоні. Більшість CGIs, які походять від ооциту, та частина CGIs, які входили до складу ДНК сперматозоїду, зберігаються більш метильованими, ніж можна було очікувати в умовах глобального деметилювання. Крім того, МГЕ, такі як потенційно активні ретротранспозони геному мишей (IAPs), які є високо метильованими в сперматозоїдах та яйцеклітинах, майже не деметилюються на стадії ранніх ембріонів. Оскільки процес деметилювання не є тотальним, це свідчить, що метилювання ДНК гамет є вкрай важливим для встановлення цієї епігенетичної мітки на ембріональних стадіях. Наступне реметилювання відбувається у момент переходу від бластоциста до епібласта, а частка метилоьваних CpG досягає близько 70% на стадії E6.5. Метилювання *de novo* в епібластах відбувається в промоторах специфічних генів, таких як ті,

що беруть участь в гаметогенезі та в гематопоезі. Для ділянок, які повинні зберегти батьківсько-специфічне метилювання, наприклад ICRs, захист неметильованих алелів від хвилі *de novo* метилювання має важливу роль.

Динаміка репрограмування метилювання ДНК у попередниках статевих клітин. На стадії епібласту закладаються **попередники статевих клітин** (primordial germ cells, PGCs), які, як вважають, успадковують паттерн метилювання ДНК, сформований в його клітинах. Низка недавніх досліджень свідчить, що деметилювання ДНК в PGCs відбувається в **два етапи**: перший збігається з фазою міграції на стадії E8.5, а другий з етапом формування гонад на стадії E10.5 протягом розвитку PGCs. Деметилювання ДНК під час фази міграції носить глобальний характер. В той же час є ділянки, які проходять через цей процес повільніше. Як і на стадії ранніх ембріонів, це стосується саме ICRs і CGIs промоторів генів зародкових клітин та мейозу, а також CGIs, асоційованих з неактивною Х-хромосомою; метилювання в цих ділянках повністю втрачається на стадії E11.5, тоді як деметилювання ДНК в PGCs загалом завершується на стадії E13.5.

Деякі ділянки ДНК взагалі не підлягають деметилюванню в PGCs, переважно це стосується IAPs. Інші повторювані елементи, а саме МГЕ, такі як LINE1 та представники групи SINE підлягають реметилюванню; ця ситуація свідчить про складну динаміку цього процесу стосовно ретротранспозонів у зиготі. Встановлено ділянки ДНК, які уникають деметилювання в PGCs і вважається, що існує позитивна кореляція між цим явищем та дистанцією від таких послідовностей до IAP. В той же час визначено-невелику кількість (кілька сотень) CGIs, не пов'язаних з IAPs, які не підлягають перепрограмуванню та можуть, таким чином, робити свій внесок у трансгенераційну епігенетичну спадковість.

Відновлення метилювання у чоловічих PGCs відбувається на стадії E16.5, досягаючи близько 50% глобального рівня метилювання, в той час, як у жіночих PGCs гіпометильований стан ДНК підтримується від E13.5 до E16.5

стадії ембріогенезу. 40% метилювання *de novo* в жіночих статевих клітинах відбувається на стадії дозріваючих ооцитів. Оскільки ДНК сперматозоїдів характеризується високим рівнем цієї епігенетичної мітки, то в чоловічих PGCs повинно мати місце подальше *de novo* метилюванння.

Механізми репрограмування геному

*Глобальне деметилювання***.** Як вже вказувалося раніше, деметилювання ДНК може відбуватися активним чи пасивним шляхом, або в результаті їх комбінації. Поступова втрата метилювання на ДНК ранніх ембріонів є результатом пасивного механізму зниження концентрації молекул Dnmt1 і Np95 (також відомий як UHRF1; Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1) в ядрах клітин. В цей процес залучений також і активний механізм деметилювання за участі комплексу елонгації транскрипції (Elongator complex) та білків ексцизійної репарації основ (base excision repair, BER), але їх точна роль ще невідома. Останні роботи продемонстрували, що білок Tet3 також відіграє вирішальну роль в активному деметилюванні, окислюючи 5mC до 5hmC, 5FC та 5caC в зиготі. Водночас ці окислені похідні можуть бути втрачені пасивно протягом наступних клітинних поділів одночасно з 5mC материнського геному, або бути субстратом для подальшої ферментативної активності (наприклад, ферментів ексцизійної репарації) з утворенням немодифікованого цитозину. Постає запитання, для чого потрібно активне деметилювання на ранніх етапах ембріогенезу, якщо у подальшому воно все одно пасивно відбувається протягом дроблення. Можливо, деякі послідовності потребують раннього деметилювання в зиготі для активації транскрипції певних генів; а можливо, що 5hmC, 5FC і 5caC є епігенетичнми сигналами з невідомою досі функцією на етапі раннього ембріонального розвитку. У будь-якому випадку насьогодні точно встановлено, що у процесах деметилювання діють як активні, так і пасивні механізми.

Пасивне деметилювання забезпечує глобальне деметилювання і в PGCs: зменшення рівнів метилювання позитивно корелює зі збільшенням числа

клітин, при цьому ген *Np95* транскрипційно пригнічується, а білок Dnmt1 усувається з вилки реплікації. Крім того, PGCs з E9.5 характеризуються наявністю великої кількості метильованих CG сайтів тільки на одному ланцюгу ДНК, які виникають, коли порушується підтримуюче метилювання.

Активні сигнальні шляхи деметилювання ДНК, включаючи *Aid* (Activation induced deaminase; деамінує 5mC з утворенням тиміну) та *Tdg* (thymine-DNA-glycosylase; вирізає тимін, деамінований з 5mC), які є компонентами шляху ексцизійної репарації, сприяють деметилюванню в PGCs, як і у зиготичному деметилюванні. Крім того, показано, що окислювальне видалення 5mC відбувається за участі білків Tet1 та Tet2. Можливо, що глобальне ферментативне видалення 5mC відбувається і на більш ранніх стадіях (E7.5-E8.5). Було висловлено припущення, що окисне видалення 5mC може бути не глобальним, а локус-специфічним явищем. При такому сценарії глобальне стирання метилювання для основної маси генома відбуватиметься на початку PGCs (E8.5-E10.5) в основному за рахунок пасивного механізму. Решта метильних груп в послідовностях, які були пізно деметильовані в процесі розвитку PGC, таких як ICRs, у подальшому видаляється на стадії E10.5 завдяки окисній активності білків Tet. Описані вище процеси продемонстровані в експериментах як *in vivo,* так і *in vitro.* Крім того, мічення антитілами демонструє, що відсутність Tet1 та Tet2 не впливає на глобальне деметилювання в PGCs, однак у деяких нащадків нокаутних мишей спостерігаються дефекти імпринтингу, вказуючи на те, що окислювальний шлях необхідний для остаточного деметилювання у PGC. Проте з’ясування конкретних механізмів цього процесу потребує подальших досліджень.

Захист від деметилювання та підтримання локус-специфічного метилювання. Репрограмування метилювання ДНК – це феномен, притаманний геному загалом, однак, деякі його послідовності вказаному процесу не підлягають. IAPs складають клас послідовностей, які, можливо, є найбільш захищеними від деметилювання в зиготі, на стадії раннього ембріону та в PGCs.

Той факт, що IAPs зберігають патерни метилювання на всіх вказаних стадіях, передбачає наявність універсального механізму захисту. В IAPs не спострігаються 5hmC, а підтримання метилювання в їх межах потребує активності Dnmt1 та Np95, хоча можуть використовуватися і неканонічні механізми.

В зиготі материнский фактор *Stella* (відомий також як Dpp3a або Pgc7) має важливе значення для захисту 5mC материнського геному загалом та частини батьківського геному в ділянках ICRs. *Stella* інгібує зв'язування Tet3 з етильованою ДНК, тим самим запобігаючи окисленню 5mC. Метилювання імпринтованих ділянок також підтримується протягом наступного пасивного деметилювання на стадії ранніх ембріонів. У цьому випадку було показано, що Zfp57 (Zinc Finger Protein 57) та KAP1 (KRAB (Krüppel-associated box)-associated protein 1 також відомий як Trim28) залучають білки родини DNMT до ICRs, тим самим підтримуючи метилювання в цих місцях протягом процесу пасивного деметилювання.

ICRs та CGI промоторів генів гаметогенеза (так само, як CGIs на X-хромосомі) зберігають високий рівень метилювання за пасивного деметилювання ДНК в PGCs приблизно до стадії E11.5, після чого ці ділянки піддаються повному деметилюванню. Спостерігається уповільнене деметилювання саме тих ділянок, яким притаманна затримка деметилювання на стадії ранніх ембріонів, що дозволяє припустити, що Zfp57 також є учасником цього процесу у PGCs. Крім того, фактор *Stella* також ідентифікований у PGCs, але його функція поки не встановлена.

Деметилювання в межах імпринтованих послідовностей. Наявні дані свідчать, що репрограмування метилювання ДНК на стадії раннього ембріогенезу та в PGCs в основному відбувається за рахунок пасивного деметилювання. В той же час деякі послідовності в геномі, які характеризуються наявністю довгострокових функціональних маркерів метилювання, такі як ICRs та промотори певних генів ліній зародкового шляху,

підлягають неканонічному механізму підтримки метилювання (за участю Zfp57 та KAP1 та, можливо, інших компонентів), який задіюється у випадку недостатньої ефективності канонічного шляху за участі NP95. Це означає, що в межах цих послідовностей може працювати інший механізм деметилювання, відмінний від пасивного.

ICRs деметилюються в PGCs на стадії E10.5 саме в той час , коли ICRs досягають стану 5hmC. І промотори генів зародкових ліній мають аналогічну кінетику деметилювання шляхом гідроксилювання 5mC, що призводить до порушення регуляції цих генів в *Tet1* KO PGCs, вказуючи на роль гідроксилювання цих маркерів в їх роботі. Можливо, 5hmC не впізнаються машинерією неканонічного шляху підтримки метилювання , в результаті чого ICRs і промотори генів зародкових ліній стають чутливими до пасивного деметилювання на стадії E10.5. Фактично, Zfp57 обумовлює зв'язування з послідовністю-мішенню, якщо вона метильована, забезпечуючи потенційний механізм перемикання.

Парадоксально, що певні маркери метилювання зберігаються за міграції PGCs, не дивлячись на те, що вони будуть стерті в PGCs гонад. Цілком можливо, що цей парадокс просто є наслідком неканонічного механізму підтримання метилювання, якому ці ділянки підлягають. Можливо, вони мають місце скрізь в PGCs, ESCs та клітинах ранніх ембріонів для забезпечення надійного метилювання. В PGCs, де дані маркери повинні бути зняті, цей механізм послаблюється від стадії E10.5, призводячи до остаточного деметилювання цих послідовностей в PGCs гонад.

Загалом, картина репрограмування геному, яка формується у світлі останніх даних, є складною. Існують різні механізми як підтримки метилювання, так і деметилювання в певних послідовностях. Деметилювання може відбуватися за рахунок як активних, так і пасивних процесів, через функціональну надмірність, яка одночасно забезпечує надійне деметилювання. Різні механізми деметилювання пов'язані між собою та навзаєм інтегровані

завдяки регуляції сигнальних шляхів в зародковій лінії та на стадії ранніх ембріонів.

Повногеномне епігенетичне репрограмування в зародковій лінії специфічне для ссавців, оскільки доказів існування такого механізму у інших хребетних, безхребетних або насіннєвих рослин немає. Можливо, відносно пізнє відділення клітин зародкових ліній ссавців (після встановлення епігенетичних міток) вимагає маштабного репрограмування для епігенетичного підтримання стану плюрипотентності і уникнення трансгенераційної епігенетичної спадковості. Істотним результатом репрограмування є стирання імпринтів в PGCs, і в цьому контексті слід відзначити, що насіннєві рослини мають імпринтинг, але це в першу чергу обмежується ендоспермом (рослиний еквівалент плаценти), і досягається за рахунок деметилювання імпринтованих локусів в цій тканині. Отже, немає необхідності видалення імпринтингу і глобального деметилювання в зародкових клітинах рослин.

РОЗДІЛ 6. ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ СТАТЕВОЇ ДЕТЕРМІНАЦІЇ І ГОНАДОГЕНЕЗУ

Існує два основні механізми визначення статі: **генотипічне** (genotypic sex determination; GSD), при якому стать визначається на основі генетичних відмінностей, і **“середовищне”** (environmental sex determination; ESD), де відсутня генетична складова у відмінностях між самцями і самками, а стать визначається вже після запліднення внаслідок впливу певних чинників оточення. З іншого боку, **диференціація статі** є процесом перетворення недиференційованих попередників гонад індивідуумів на яєчники або сім’яники, але цей процес стосується і інших аспектів диференціації, в тому числі, формування статевих протоків і геніталій, а також вторинних статевих ознак. Таким чином, ембріональні гонади є унікальними органами, здатними давати початок різним фенотипам. Соматичні клітини гонад піддаються дії антагоністичних сигналів. Фенотип, який формується у конкретної особини, визначається шляхом формування або сім’яників, або яєчників, і одночасним пригніченням альтернативного вибору зі зміною згідно обраної детермінації експресії багатьох генів. Саме у такому контексті розвитку, де багато генів повинні бути активовані або пригнічені у жорстких просторових і часових рамках, епігенетичні механізми регуляції експресії генів набувають вирішального значення.

У даному розділі наведено дані стосовно епігенетичних механізмів, пов'язаних з визначенням статі та статевою диференціацією переважно у хребетних, з залученням деякої інформації щодо безхребетних та рослин.

Метилювання ДНК. У рослин епігенетичні механізми визначення статі вперше описано у кукурудзи *Zea mays ssp. mays*. Проте, наскільки поширені такі механізми у визначенні статі у рослин, залишається невідомим. У дині *Cucumis melo* контроль розвитку чоловічих, жіночих і гермафродитних квіток здійснюється за рахунок взаємодії гена фермента біосинтезу етилену *CmACS-7* (*Cucumis melo* 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase) та

транскрипційного фактора CmWIP1. Експресія гена *CmACS-7* репресує розвиток тичинок на жіночіх квітках, тоді як експресія CmWIP1 призводить до відсутності у квітках плодолистиків. В лініях, які несуть тільки жіночі квітки, перехід від чоловічих до жіночих квіток є результатом епігенетичних змін у промоторі *CmWIP1*, викликаних вставкою транспозону Gyno-hAT. Така вставка транспозону призводить до ініціації та підтримання ДНК-метилювання промотору *CmWIP1* та репресії гена, що в свою чергу обумовлює розвиток жіночих квіток.

Горелік (Gorelick) зі співавторами припустили, що **дводомність рослин** та **статеві хромосоми** виникли вперше у диплоїдних гермафродитів, які містили пари аутосом, в яких одна хромосома була більш метильована за іншу на ділянці контролю статі. У такому випадку метилювання могло супресувати транскрипцію, в тому числі і локусів, які приймали участь у продукції гамет, тобто перетворювали гермафродитів на самців та самок. Подібну гіпотезу також висуває Єва Яблонка (2004). З її точки зору, види з ESD потребують гомоморфності статевих хромосом і навіть незначні варіації оточення можуть змінювати характеристики метилювання у локусах, які відповідають за становлення статі, визначаючи таким чином її у конкретної особини. Добре відомо, що навколишнє середовище може впливати на зміну експресії генів і, таким чином, на фенотип. У випадку ESD зміни одного з параметрів оточення під час певних критичних фаз у ранньому розвитку визначають стать всього потомства. Так, **температурно-залежне визначення статі** (temperature-dependent sex determination; TSD) є однією з форм ESD, при якому співвідношення статей зсувається у відповідь на зміну температури оточення, що характерно для деяких риб і рептилій. У хребетних (за виключенням ссавців) ароматаза (cyp19a1) є ключовим стероїдогенним ферментом, який відповідає за перетворення андрогенів в естрогени, що необхідно при диференціації яєчників. У риб і рептилій температурно індукована маскулінізація тісно пов'язана з репресією гену *cyp19a1*.

У європейського морського окуня генетичні фактори та фактори навколишнього середовища, в даному випадку - температура, в рівній мірі беруть участь в визначенні статі особини. У цього виду **температурочутливий період** спостерігається на личинковій стадії задовго до формування гонад. Було показано, що молоді самці характеризуються збільшеним у два рази рівнем метилювання ДНК в промоторі *cyp19a1* порівняно з самками. Вплив високої температури, який припадає на температурочутливий період, підвищує рівень метилювання цього промотора у генетичних самок, індукуючи маскулінізацію, що свідчить також про зворотній зв'язок між рівнями метилювання і ступенем експресії *cyp19a1*. Різні CpGs в межах промотора *cyp19a1* характеризуються різним ступенем чутливості до температури. Підвищений рівень метилювання промотора *cyp19a1* був ідентифікований в гонадах, але не в мозку, що свідчить про тканиноспецифічний ефект зміни температури. Такі температурні ефекти також описані і для статево недиференційованих риб. Таким чином, метилювання промотору *cyp19a1* призводить до зниження рівня ескпресії гену *cyp19a1* у маскулінізованих внаслідок впливу певної температури під час **температурочутливого періоду** риб. Дослідження *in vitro* показали, що індуковане температурним впливом метилювання промотору *cyp19a1* знижує ефективність зв’язування SF-1 (Splicing factor 1; кодує білок, який залучений у формування сплайсосоми) і Foxl2 (Forkhead box protein L2) і, відповідно, їх здатність стимулювати транскрипцію. У тому ж дослідженні було показано, що CpG-острівці диференційно метилюються у відповідь на температурний вплив на ділянках, прилеглих до сайту зв'язування еволюційно консервативного транскрипційного фактору SOX (Sex determining region Y-box). Можна припустити, що метилювання промотора гена ароматази є складовою частиною молекулярного механізму, який пов’язує температурний чинник і співвідношення статей у хребетних з температурно-залежним типом визначення статі. Рептилії також характеризуються TSD типом визначення статі, однак у них температурочутливий період збігається з періодом становлення статі, а отже, механізм, характерний для морського окуня, скоріше

за все не має місця. Це свідчить про те, що тип TSD незалежно виникав декілька раз протягом еволюції.

У видів, у яких спостерігається **послідовний гермафродитизм**, в процесах визначення статі присутні як внутрішні, так і зовнішні сигнали. Чорний морський окунь (*Acanthopagrus schlegeli*) з родини *Sparidae*, який є дихогамною рибою-гермафродитом (спочатку ці риби є самцями, а потім - самками), є широко застосованим модельним об'єктом для вивчення генів і ендокринних механізмів статевих переходів. Особини даного виду характеризуються незвичайним життєвим циклом, протягом якого стать самців визначається протягом ювенільного періоду розвитку, а у віці 3-х років відбувається зміна статі на протилежну. У даних організмів впродовж перших двох репродуктивних циклів тканина яєчників в гонадах залишається неактивною і ооцити не проходять первинну стадію розвитку. Такий неактивний стан тканин яєчників не може бути змінений навіть додаванням до раціону естрадіолу-17b (E2), але після хірургічного видалення тканин сім'яників відбувається їх активація, що свідчить про роль сім'яників у інгібуванні розвитку тканин яєчників. На різних стадіях розвитку яєчників не спостерігається різниці в загальному рівні метилювання ДНК. Однак рівень метилювання промотору гена *cyp19a1* є вищим в неактивних ооцитах, ніж в активних, що дозволяє припустити, що експресія *cyp19a1* контролюється епігенетичними механізмами, зокрема, транскрипційними активаторами *cyp19a1* білками SF-1 і Foxl2. На відміну від цього, промотор гена *dmrt1*, який приймає участь в диференціації сім'яників та визначенні статі, у тому числі в природній зміні статі особин, не демонструє відмінностей в рівнях метилювання ДНК на будь-яких стадіях розвитку сім'яників. Таким чином, зміни рівня метилювання промотору *cyp19a1* є важливими не тільки для визначаення статі у термочутливих видів, а і в процесі зміни статі у гермафродитних видів.

Зміни в експресії DNMT можуть бути безпосередньо залучені у процеси визначення статі та гонадогенез. В статевих клітинах яєчників та сім'яників

мишей Ла Сал (La Salle) з співавт. порівнювали ступінь експресії трьох типів DNMT3 до, під час і після статевої диференціації, в тому числі і в момент репрограмування патернів метилювання ДНК, які мають місце у попередниках зародкових клітин ембріональних гонад. В постнатальній жіночій лінії в момент набуття патернів метилювання ДНК DNMT3a і DNMT3l коекспресуються, однак останній присутній у більш високій концентрації. У новонароджених самців рівні експресії DNMT1 і DNMT3b досягають максимуму одночасно, відповідаючи за підтримку патернів метилювання ДНК проліферуючих сперматогоніїв.

Важливість епігенетичних процесів в статевих клітинах не викликає сумніву, однак їх роль в попередниках соматичних клітин, можливо, є ще більш важливою тому, що саме соматичні клітини відіграють вирішальну роль у становленні статі конкретної особини. Гени, які відповідають за регуляцію процесів визначення та становлення статі експресуються в основному в попередниках соматичних клітин. Ген визначення статі сучасних ссавців *Sry* (*Sex-determining Region Y*) ініціює розвиток попередників соматичних клітин в клітини Сертолі, а не гранульози та експресується тільки в певній групі соматичних клітин гонад на 10,5-12,5 добу після запліднення у мишей. Таким чином, просторова та часова регуляція гену *Sry* має вирішальне значення для формування гонад. У ембріонів через 8,5 діб після запліднення ген *Sry* ще не експресується, а його промоторний регіон гіперметильований, на 11,5 добу ця ділянка гена стає гіпометильованою, але тільки в тканинах гонад. Це дозволяє припустити, що *Sry* контролюється епігенетично, можливо, за участі метилювання ДНК. Як відомо, гіпометилювання промоторів генів супроводжується їх транскрипційною активністю, тому ситуація з геном *Sry* є цілком очікуваною.

Модифікації гістонів. Як зазначалось вище, нулеосоми являють собою функціональні одиниці хроматину і складаються з гістонових октамерів та приймають участь у регуляції транскрипції за рахунок посттрансляційних

ковалентних модифікацій їх амінокислотних залишків. Найбільш вивченими модифікаціями гістонів є ацетилування, метилювання та фосфорилювання. H3K4me3 асоційовано з транскрипційною активністю, а H3K9me справляє протилежний ефект. Є докази, що H3K9me3 може також рекрутувати і активувати DNMTs. Ацетилювання гістонів корелює з активною транскрипцією генів. Більшість ензимів, які беруть участь в ремоделюванні хроматину, чутливі до змін факторів внутрішнього середовища і метаболічних сигналів, тому працюють як сенсори, які забезпечують зміни експресії генів.

Роль цих механізмів у детермінації статі виявлена, зокрема, у червеців (Coccidae; псевдощитівки). У багатьох видів цих комах батьківські хромосоми піддаються факультативній гетерохроматізації у ембріонів самців і пізніше елімінуються з їх зародкової лінії під час сперматогенезу. Таким чином, самці за допомогою сперміїв передають виключно материнські хромосоми. Ця незвичайна цитологічна видозміна називається леканоідною системою. У таких видів стать нащадків визначається залежно від того, чи інактивуються батьківські хромосоми в цитоплазмі яйця після запліднення. Наприклад, у борошнистого червеця *Planococcus citri* з такою системою гамети, які утворюються під час мейозу, хоча і мають однаковий геном, відрізняються рівнями H3K9me і HP1, одні з них значно сильніше маркуються обома антитілами до вказаних білків, ніж інші, демонструючи взаємозв'язок між імпринтингом і детермінацією статі.

Наведений приклад ілюструє, як специфічна епігенетична "мітка" може бути пов’язана з певною статтю. У представників багатьох таксонів від комах до ссавців специфічний білок, PHD Finger Protein 7 (PHF7), експресується лише в зародковій лінії самців. Ген *Phf7* важливий для підтримки зародкових стовбурових клітин у самців плодових мух. Експресія *Phf7* індукує сперматогенез в зародкових клітинах з хромосомами XX. Більше того, людський PHF7 відновлює мутантний *Phf7* фенотип у дрозофіли. Цікаво, що ці білки як у дрозофіли, так і у людини зв'язують мітку H3K4me2. Виходячи з вищевикладеного, можна припустити, що PHF7 діє як консервативний

епігенетичний "дешифрувальник", який активує статеву програму зародкової лінії самців.

Модифікація H3K9me, яка може бути зворотною, є міткою гетерохроматину і пригнічення транскрипції. Продемонстровано, що метилювання і деметилювання H3K9 (за яке відповідає метилтрансфераза G9a) може регулювати експресію генів детермінації статі зародкових клітин та гонадогенезу. Було показано, що G9a-дефіцитні зародкові клітини демонструють порушення синхронності кон'югації хромосом в профазі мейозу. Моно- і ди-метилювання H3K9 (H3K9me1 і 2) в G9a-дефіцитних зародкових клітинах істотно знижено, а гени, які регулюються за допомогою G9a, надекспресуються протягом мейозу. Крім того, продемонстровано, що моно- і ди-метилювання H3K9 динамічне і різниться у представників різних статей під час профази мейозу.

У 2005 був ідентифікований критичний ядерний фактор в ембріогенезі миші, який кодується геном *Jumonji* (*Jmj*), що відіграє важливу роль у формуванні серцево-судинної системи, нервової трубки, печінки і гематопоезі. Згодом, було продемонстровано, що H3K9me2 / 1-специфічна деметилаза JHDM2A (JmjC-domain-containing histone demethylase 2A, також відома як JMJD1A) безпосередньо зв'язується та контролює експресію генів *transition nuclear protein 1* (*Tnp1)* і *protamine 1 (Prm1*), продукти яких забезпечують упаковку і конденсацію хроматину сперміїв. Більше того, миші з дефішенсі за JHDM2A демонстрували дефекти пост-мейотичної конденсації хроматину. Отже, JHDM2A важливий для нормального проходження сперматогенезу. Крім того, JHDM2A також регулює гени метаболізму, які пов'язують з гомеостазом енергії, оскільки дефектні за ним організми демонструють ожиріння та інші метаболічні порушення.

Існують і інші докази зв'язку між модифікаціями гістонів та детермінацією статі. Так, було показано, що XY миші, дефіцитні за деметилазою JHDM2A, часто демонструють реверсію статі і іноді повну її зміну з формуванням плідних самок. Аналіз експресії РНК та білка цього гену

свідчить, що втрата деметилювання H3K9 веде до сильного пригнічення експресії *Sry* під час ембріогенезу. Зокрема, фермент накопичується в локусі *Sry* дикого типу XY біпотенціальних соматичних клітин і веде до істотного збільшення деметилювання H3K9 і до зниження триметилювання H3K4 в ньому. Ці факти є першими доказами критичної ролі метилювання і деметилювання гістонів у детермінації статі ссавців.

Роль білків групи Polycomb (PcG; репресорів) і Trithorax (TrxG; активаторів) відома у підтримці відповідних профілів експресії генів під час розвитку; менше відомо про їх участь в детермінації статі і гаметогенезі. Білок Chromobox homolog 2 (CBX2, також відомий як M33) є гомологом Polycomb у мишей. Було показано, що половина мишей, мутантних за геном *CBX2,* гине до початку вигодовування, а ті, які вижили, демонструють гіпопластичність гонад і, відповідно, перетворення самців в самок. У гомозиготних мутантів за цим геном формування генітального гребеня затримано як у XX, так і XY особин. Дефекти росту гонад з'являються приблизно на етапі експресії *Sry*, підтверджуючи, що дефіцит CBX2 викликає зміну статі за рахунок впливів на компоненти сигнального шляху *Sry*. Однак, конкретні молекулярні механізми регуляції гонадогенезу білком CBX2 залишаються невідомими. В той же час транскриптомний і імуногістохімічний аналізи засвідчили, що експресія генів, які кодують транскрипційні фактори, важливі для розвитку гонад, включаючи *Sry, Sox9, Lhx9, Ad4BP/SF-1, Dax-1, Gata4, Arxm і Dmrt1*, порушена в нокаутних за CBX2 гонадах. Схрещування нокаутних за CBX2 мишей з мишами з надекспресією *Sry* або *Sox9* усуває перетворення самців в самок, хоча сім'яники залишаються гіпопластичними. Це вказує на те, що CBX2 бере участь в диференціюванні сім'яників через регуляцію експресії гена *Sry*, але стать і розмір гонад залежить від інших сигнальних каскадів.

Некодуючі РНК. Як вже зазначалося, некодуючі РНК (non-coding RNAs; ncRNAs) є функціональними молекулами, які не транслюються в білки і залучені в деякі складні епігенетичні механізми. Вище вказувалось, що ncRNAS

класифікуються відповідно до їх нуклеотидної довжини, структури і функції. Найкраще охарактеризованими ncRNAs з епігенетичної точки зору є довгі некодуючі РНК (long ncRNAs; lncRNAs), які мають у своєму складі більше 200 основ, і мікроРНК (microRNAs; miRNAs; 19-25 основ). lncRNAs, такі як roX і XIST (X-inactive specific transcript), беруть участь в механізмах компенсації дози у *D. melanogaster* і *M. musculus.* Основною функцією miRNAs є тонка регуляція трансляції за рахунок репресії чи деградації певних мРНК. Крім того, ncRNAs регулюють транскрипцію генів за рахунок безпосереднього рекрутування комплексів сайленсингу у певні локуси.

Участь ncRNAs у детермінації статі продемонстровано на рослинах. У кукурудзи (*Zea mays*) чоловічі та жіночі квітки групуються у волоть і початок відповідно. Детермінація статі відбувається за допомогою абортації жіночих плодолистків у волоті і чоловічих тичинок у початках. Ген *indeterminate spikelet1* (*ids1*) є членом родини квіткових гомеозисних транскрипційних факторів APETALA2, які необхідні для детермінації меристеми колоска. Було встановлено, що miRNA 172 (miR-172), яка кодується *tasselseed4* (*ts4*), впливає на фактори APETALA2, а мутації *ts4* призводять до розвитку плодолистика у волоті під час розгалуження меристеми. Ці результати вказують, що детермінація статі та визначення долі меристеми відбувається завдяки активності однакових сигнальних шляхів.

У комах вплив miRNAs на гонадогенез досліджували на двокрилих, таких як *Drosophila*, і комарах *Aedes aegypti*, основних переносниках тропічної лихоманки (Dengue fever), яким притаманний **мереїстичний тип розвитку яєчників**, за якого ооцити та трофоцити мають спільне походження. Ці механізми також досліджували на видах, таких як *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae), яким притаманний найбільш примітивний **паноїстичний тип розвитку яєчників**, за якого оогонії трансформуються в ооцити. В останніх відсутність активності ключового ферменту Dicer-1 (Dcr1), необхідного для синтезу miRNA, призводить до стерильності самок, які демонструють глибокі порушення розвитку ооцитів. У *Aedes* ідентифікована

miR-275 і продемонстровано, що вона необхідна для продукції яєць. Беручи до уваги роль miRNAs в багатьох аспектах репродукції комах, ці факти підтверджують, що повинні існувати інші miRNAs, пов'язані з власне детермінацією статі.

У атлантичного палтуса *Hippoglossus hippoglossus* нещодавно було досліджено патерн miRNA в органах репродуктивної осі (головний мозок і гонади) та встановлено, що деякі з них виявляють обмежену статтю експресію. Крім того, показано, що рівні деяких miRNAs змінюються після маскулінізації під дією андрогенів або інгібітору ароматази, вказуючи тим самим, що деякі з цих молекул контролюються гормональними сигналами.

Детермінація статі у птахів в основному вивчалася на курках, яким притаманна ZZ (самці): ZW (самки) хромосомна система визначення статі. Самці мають подвійну дозу Z-зчеплених генів порівняно з самками, і, на противагу ссавцям, не мають механізму компенсації дози. Хоча невелика кількість Z-зчеплених генів компенсується за рахунок посиленої активації у ZW самок. Нещодавні дослідження показали, що посилення активності може бути обумовлено довгою ncRNA, названою male-hypermethylated (MHM), яка синтезується незабаром після запліднення на єдиній Z хромосомі самок. У самців MHM транскрипційно сайленсується метилюванням. Відмінності такого метилювання настільки виражені у різних статей, що визначення статі саме ним і обмежується. Більше того, у локусі MHM спостерігається збагачення ацетильованим гістоном H4 по лізину 16, модифікації, характерної для еухроматину самок. Цікаво, що ця специфічна гістонова модифікація наявна також уздовж всієї X хромосоми самців *Drosophila melanogaster*, через яку і реалізується дозова компенсація у цього виду. Аналіз експресії MHM продемонстрував її роль в ембріональному розвитку курчат. Гібридизація *in situ* підтвердила, що MHM локус експресується тільки у самок, причому переважно в гонадах. Ектопічна експресія MHM веде до гіпертрофії тканин, особливо гонад, які при цьому втрачають характерну для птахів асиметрію ліво-правостороннього розвитку. Цікаво, що РНК MHM накопичується на Z

хромосомі самок дуже близько до локусу *DMRT1* (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1), який необхідний для детермінації статі самців. У самців неправильна експресія МНМ порушує експресію *DMRT1* в гонадах, вказуючи на те, що, крім участі в дозовій компенсації, МНМ може відігравати роль у диференціації гонад у курчат. Якщо наведені дані будуть підтверджені, то це стане прекрасним прикладом багаторівневої епігенетичної регуляції, за якої метилювання ДНК, модифікація гістонів і ncRNAs діють разом.

Різниця в експресії ncRNAs у різних статей не обмежується довгими ncRNAs і може стосуватися miRNAs, таких як miR-363, хоча її роль в детермінації статі все ще не встановлена. Було показано, що рівень експресії miRNA202* (miR-202*) вищий у самців. Фемінізація яєць призводить до зменшення концентрації miR-202* до рівнів, характерних для самок, і корелює зі зниженням експресії генів сім'янників *DMRT1* і *SOX9*, а також з посиленням активності асоційованих з яєчниками генів *FOXL2* і *CYP19A*. З іншого боку, маскулінізовані гонади самок демонструють підвищену експресію miR-202*, яка супроводжується зниженням активності *FOXL2* і *CYP19A* і посиленням транскрипції *DMRT1* і *SOX9*.

Однак, реальна ситуація з роллю мікроРНК у визначинні статті може бути більш комплексною, ніж описано вище. Так, в гонадах самців і самок дорослих мишей ідентифіковано 10852 і 11744 клонів малих некодуючих РНК відповідно, які включали 6630 (159 генів) і 10192 (154 генів) відомих miRNAs. З них 55 miRNAs експресувалися на високому рівні виключно або переважно в сім'яниках і яєчниках дорослих мишей, також було описано дві miRNAs, транскрипція яких відбувалася на Х хромосомі самців. Однак функціональна роль цих miRNAs поки невідома. Аналіз 21 дорослої тканини миші показав, що miR-202 є тестіс- і оваріо-специфічною. Показана різна експресія і інших РНК, включаючи lncRNAs і miRNAS, у гонадах різних статей миші під час ранньої диференціації, однак роль таких ncRNAs під час детермінації статі поки невідома.

РОЗДІЛ 7. ІНАКТИВАЦІЯ Х-ХРОМОСОМИ

У людей **статевий диморфізм** пов'язаний із присутністю двох Х-хромосом у жінок та ХУ-хромосом у чоловіків. **Х-хромосома** виду *Homo sapiens* містить 155 000 пн та 1250 відомих генів. **Y-хромосома** в три рази менша і має найнижчу щільність генів у порівнянні з іншими хромосомами людини. У ссавців Y-хромосома швидко еволюціонує у порівнянні з Х-хромосомою. Незначний вміст генів та велика кількість елементів, що повторюються, свідчить про швидку втрату активних генів і накопичення повторів у Y-хромосомі. Вважається, що ці процеси призвели до формування нового гена (*SRY*), який детермінує розвиток чоловічої статі, та генів сперматогенезу, що супроводжувалося пригніченням рекомбінації, яке забезпечило щеплення цих генів. Відсутність рекомбінації з Х-хромосомою сприяла накопиченню мутацій завдяки дрейфу генів та неефективності відбору. Це призвело до незвичайної ситуації, за якої ділянки гомології Х і Y хромосом обмежуються двома надзвичайно малими областями, так званими **псевдо-аутосомними регіонами** 1 і 2 (pseudo-autosomal region; *PAR1* і *PAR2*), розташованими на кінцях Х і Y хромосом. Квазі-гемізиготність генів Х-хромосоми у чоловіків робить останніх більш сприйнятливими до мутацій цієї хромосоми. Ця ситуація призводить, можливо, до збільшеної чоловічої смертності у порівнянні з жінками.

Статевий диморфізм характеризується відмінностями у кількості копій генів Х-хромосоми у особин різних статей. У самців кількість копій Х-зчеплених генів зменшена в два рази порівняно з аутосомними. У самок ссавців одна з Х-хромосом інактивується. У мишей це компенсується за рахунок підвищення експресії Х-зчеплених генів (у 1.4-1.6 раз) протягом раннього ембріогенезу як у самців, так і у самок. Це підвищення є ще більшим на більш пізніх стадіях розвитку, що дозволяє вирівнювати рівні експресії генів єдиної Х-хромосоми та аутосом в клітинах самців. Механізм такої регуляції на молекулярному рівні ще не описаний. Порівняння триплоїдних клітин, які

несуть одну або дві активні Х-хромосоми (Ха), показав, що тільки частина Х-зчеплених генів регулюється вказаним шляхом.

Ще один аспект статевого диморфізму полягає в кількості статевих хромосом самців та самок. Різні види організмів використовують різні стратегії для подолання таких відмінностей. У плодових мух рівень експресії генів однієї Х-хромосоми у самців дорівнює такому двох Х-хромосом у самок. У гермафродитних ХХ нематод спостерігається половинний рівень експресії Х-зчеплених генів. У ссавців одна з двох Х-хромосом випадково інактивується на ранніх етапах ембріогенезу. Ця випадкова інактивація Х-хромосоми (ІХХ) призводить до гемізиготності генів статевої хромосоми та збалансованого мозаїцизму на рівні організму. Майже в половині клітин інактивується материнська Х-хромосома, а в інших - батьківська. Черепахові самки котів (гетерозиготні за геном, який відповідає за колір шерсті) є прикладом фенотипового прояву такого явища: клітини, в яких інактивована Х хромосома, яка несе алель рудого кольору шерсті (X^0), експресують альтернативний алель, чорного кольору шерсті (X^B), тоді як клітини, в яких інактивований алель X^B, характеризуються наявністю рудого забарвлення, що в результаті призводить до чорно-рудого «черепахового» забарвлення шерсті. Крім того, для деяких плацентарних ссавців (наприклад, корови, миші) також характерна інактивація батьківської Х-хромосоми в позаембріональних тканинах.

Для інактивації однієї з Х-хромосом потребується якась диференціація в межах двох гомологів в одному і тому самому ядрі. Процес ІХХ складється з трьох етапів: ініціації, елонгації та підтримки інактивованого стану. Для ініціації потребуються транс-фактори, які відповідають за оцінку кількості Х-хромосом в клітині, забезпечення активності тільки Х-хромосоми та рішення, якої саме. Процес переходу з активного в неактивний стан досягається за рахунок послідовних епігенетичних модифікацій, а саме накопичення великих некодуючих РНК *Xist*, заміна міток активного хроматину на репресивні, включаючи репресорні комплекси Polycomb (PRCs), формування специфічних варіантів гістонів та метилювання CpG-острівців в промоторних ділянках генів.

Всі ці процеси забезпечують стабільну підтримку неактивного стану протягом наступних мітотичних поділів.

Інактивація Х-хромосоми та менделівське успадкування

Гіпотеза прискореної еволюції Х-хромосоми. Х-хромосома людини містить багато генів, мутації в яких призводять до розумової відсталості та порушенням репродуктивної функції. Ці факти свідчать на користь так званої гіпотези прискореної еволюції Х-хромосоми (faster-X hypothesis), яка полягає в тому, що статеві хромосоми еволюціонують швидше, ніж аутосоми, з причини гемізиготного статусу зчеплених зі статтю генів у самців, що призводить до високого тиску добору на певну групу генів.

Цікаво, що до таких генів відносяться і ті, що беруть участь у функціонуванні мозку, а цей ефект набагато більш виражений у людини, ніж у гризунів. Це дало привід припустити, що протягом останніх декількох мільйонів років еволюції гомінід самки вибирають розумних самців для спарювання, можливо, тому, що такі самці кращі годувальниками, чим і пояснюється інстенсивний розвиток мозку у людини. Гіпотеза швидкої еволюції Х-хромосом також пояснює велику кількість генів Х-хромосоми, які експресуються в яєчках; а саме в сперматогоніях, але не на пізніх стадіях сперматогенезу, що, можливо, пояснюється необхідністю їх сайленсингу під час мейозу. Накопичення рецесивних мутацій таких генів саме в Х-хромосомі може пояснюватися тим, що швидка еволюція останніх забезпечує самцям більш успішне відтворення. Навіть якщо такі мутації шкідливі для самок, то їх ефект проявляється лише в гомозиготному стані. На цьому етапі вони підпадають під сильний вплив добору, що призводить до обмеження їх експресії лише яєчками.

Мозаїчність самок за експресією зчеплених зі статтю генів. Аутосомні моносомії у людей несумісні з життям, але квазімоносомний статус Х-хромосоми у чоловіків не має фенотипових наслідків. Анеуплоїдії за Х-

хромосомою, саме такі як синдром Тернера (Х0 жінки) та синдром Клайнфельтера (ХХУ чоловіки), життєздатні та характеризуються відносно незначними клінічними проявами. Причиною цього є процес інактивації Х-хромосоми. У Х0 жінок ІХХ не відбувається, а ХХУ чоловіків вона відбувається. Відсутність другої копії PAR-регіонів може бути причиною симптомів синдрому Тернера.

Жінки є збалансованими мозаїками, у яких в 50 % клітин експресуються гени Х хромосоми, отриманої від матері, а в 50 % - від батька, що свідчить про випадкових характер інактивації ІХХ в клітинах епібласту раннього ембріона жінок. Відслідкувати процес формування мозаїцизму дозволяють мутації в зчепленому зі статтю гені *NEMO*, летального у чоловіків. Гетерозиготним за цим геном жінкам притаманна гіперпігментація шкіри, яка проявляється характерними плямами. Ступінь і форма цих плям суттєво варіює. Їх кількість і форма є результатом шляху міграції клітин-попередників, в яких інактивується Х хромосома, що несе алель дикого типу.

Наслідки клітинного мозаїцизму. Клітинний мозаїцизм Х-зчеплених генів надає біологічну перевагу жінкам. На відміну від гетерозигот за аутосомно-рецесивними мутаціями, у яких алелі дикого типу та мутантні експресуються в одній і тій самій клітині (за винятком генів, які експресуються моноалельно), клітини мозаїків за зчепленими зі статтю мутаціями можуть компенсувати мутантний фенотип. Самки, гетерозиготні за зчепленими зі статтю мутаціями, як правило, є безсимптомними носіями. Описано два типи компенсації: найбільш загальним є елімінація клітин, але зустрічається і метаболічна кооперація. Прикладом першого є синдром Леша-Ніхана (Lesch-Nyhan), за якого клітини крові, які експресують мутантний алель, гинуть. Таким чином, особина, гетерозиготна за мутантним алелем, фактично відтворює нормальний фенотип. У рідкісних випадках, таких як лейкодистрофія наднирників, можуть спостерігатися і зворотні ефекти. Зокрема, мутантні клітини у жінок за такого захворювання характеризуються проліферативною перевагою, що з часом

призводить до збільшення популяції саме мутантних клітин у порівнянні з нормальними, ускладнюючи хворобу з віком.

Клітинні популяції також можуть бути залучені в метаболічну кооперацію, можливо, шляхом обміну молекулами між клітинами. У вибадку хвороби Фабрі (Fabry) клітини, які несуть алелі дикого типу, секретують важливі лізосомні ферменти, що можуть використовуватися сусідніми клітинима з порушеним метаболізмом шляхом ендоцитозу, тим самим послаблюючи клінічну картину мутації. Зрідка міжклітинні взаємодії можуть призводити і до негативних наслідків, що характерно для черепно-фронтоназальної дисплазії (craniofrontonasal syndrome). Чоловіки з мутацією в гені *ephrin-B*, який відповідає за розвиток захворювання, страждають його помірною формою, в той час як у жінок може спостерігатися як лицевий диморфізм, так і передчасне злиття деяких кісток. Цей фенотип обумовлюється безпосередніми контактами специфічних ефрін-B1+ та ефрін-B1− клітин, що призводить до формування додаткові межі, яка запобігає переміщенню білків від однієї клітини до іншої і, відповідно, порушує нормальне функціонування сигнальних шляхів.

Асиметрична інактивація Х-хромосоми. Селекція клітин, яка спостерігається за лейкодистрофії наднирників та синдрому Леша-Ніхена, призводить до порушення співвідношеня клітин, в яких інактивується або батьківська, або материнська Х-хромосома у відповідних тканинах. Цей феномен, який називається **асиметрична інактивація Х-хромосоми** (X-inactivation skewing), є досить загальним явищем, оскільки біля 10% відсотків жінок характеризуються патерном інактивації одного з батьківських алелів, який не може пояснюватися випадковими процесами. У крайніх випадках до 90% клітин характеризуються експресією одного і того ж алеля. Подібний характерХ-хромосомної інактивації може відбуватися за рахунок невипадкової інактивації під час раннього ембріогенезу або пізніше за рахунок селекції клітин на стадії бластоцисти. На початку процесу XXI, коли ембріон

складається тільки з декількох клітин, в силу випадкових причин більшість клітин можуть інактивувати одну із батьківських хромосом. Прикладами такого явища є аутоімунні захворювання, такі як склеродерма, аутоімунні розлади щитовидної залози та системний склероз, за яких у жінок імовірність розвитку відповідних симптомів в 2-8 разів більше, ніж у чоловіків. За цих захворювань асиметрична ХХІ майже завжди спостерігається в дендритних клітинах тимусу, які беруть участь у пошуку та елімінації Т-клітин. Якби такого явища не спостерігалось, то різні Х-хромосоми інактивувались би випадково, що призводило би до формування двох рівновеликих груп клітин. У тимусі хворих, однак, формуються більша і менша популяції відповідних клітин. Таке порушення може залежати від того, що закладка дендритних клітин тимуса відбувається в невеликій групі клітин бластоцисти. Можна припустити, що гіпотетичні гени, які відповідають за ці процеси, зчеплені з Х-хромосомою, а отже, клітини тимусу будуть елімінувати в першу чергу ті Т-клітини, які продукуються меншою популяцією клітин, в якій інактивована Х-хромосома з певним алелем.

Дослідження фенотипової мінливості ранньої ХХІ серед монозиготних близнюків жіночої статі показало, що асиметрична ХХІ призводить до формування зчепленого зі статтю захворювання тільки у однієї з сестер: у хворої спостерігалася асиметрична інактивація хромосоми, яка несе алель дикого типу, у здорової - Х хромосоми з мутантним алелем. Прикладами таких захворювань є синдром ламкої Х хромосоми, дальтонізм, м’язова дистрофія Дюшена (Duchenne muscular dystrophy), синдром Хантера (Hunter’s syndrome), гемофілія В, синдром Айкарді (Aicardi’s syndrome), захворювання Фабрі (Fabry’s diseases).

Гіпотетичну генетичну обумовленість контролю асиметричної ХХІ не доведено в силу високої мінливості цього явища в різних тканинах і в різному віці. У більшості випадків спадкування асиметричної ХХІ не встановлено. Однак, описано один випадок асиметричної ХХІ в родині з гемофілією А, де у жінок завжди інактивувалась Х хромосома з алелем гемофілії дикого типу.

Порушення у цьому випадку, ймовірно, повинно обумовлюватись додатковими генетичними детермінантами, які надавали б проліферативну перевагу клітинам з активними мутантними алелями. Аутосомні транскрипційні фактори, такі як CTCF або YY1, які здатні до алель-специфічного зв'язування з деякими ключовими регуляторами ХХІ, можуть впливати на випадковість цього процесу. Вважається, що три аутосомні локуси, Xiaf1, 2 та 3 (X-inactivation autosomal factors) впливають на ХХІ у мишей, але тільки один (X-controlling-element, Xce) знаходиться в Х-хромосомі.

Інактивація Х-хромосоми - модель глобальної регуляції експресії генів

Інактивація Х-хромосоми в ембріогенезі та гаметогенезі. Інактивацію Х-хромосоми з найбільшою вірогідністю можна пояснити епігенетичним репрограмуванням. Процеси ХХІ тісно пов'язані з повногеномним репрограмуванням та відбуваються протягом раннього ембріогенезу і гаметогенезу. У мишей перша хвиля ХХІ проходить на стадії 4-8 клітинного ембріону і впливає тільки на **батьківську Х-хромосому** (paternal X chromosome, Xp), тому цей процес називають **інактивацією за рахунок імпринтингу** на відміну від випадкової ХХІ. Цікаво, що під час процесу інактивації не всі зчеплені зі статтю гени сайленсуюються одночасно, частина генів перестають експресуватися на стадії чотирьох клітин, а інші на стадії морули. Порядок виключення не залежить від положення генів на Х-хромосомі, але, можливо, залежить від просторової організації хромосомної території інактивованої Х-хромосоми. Просторова організація ядра може забезпечувати наближення двох генів, розташованих будь-де в геномі, забезпечуючи тим самим їх одночасну інактивацію. На момент диференціації позаембріональної трофектодерми (extra-embryonic trophectoderm; TE) та клітин внутрішньої маси (inner cell mass; ICM) імпринтована Х-хромосома батька активується, тим самим забезпечуючи випадкову ХХІ, яка має місце на стадії епібласта пізньої бластоцисти, що необхідно для коректного розвитку ембріона. У TE підтримується інактивований стан батьківської Х-хромосоми.

Позаембріональна первинна ентодерма (extra-embryonic primitive endoderm; PrE), яка формується з ICM, також характеризується неактивною батьківською Х-хромосомою, яка має певні особливості хроматинової структури. Залишається незрозумілим, чи інактивація Х-хромосоми у PrE відбувається *de novo*, чи клітини з такою хромосомою мігрують з ICM, за рахунок якої формується PrE.

У людини досі не з'ясовані точні терміни XXI під час раннього ембріогенезу. Тим не менш, дослідження патернів XXI у позаембріональних тканинах показали, що в них інактивація проходить випадково. Не виключена і більш рання інактивація Хр на стадії морули або раніше, але вона вважається малоймовірною, оскільки біалельна експресія гену *XIST*, який є ключовим у XXI, у людини гіпотетично відбувається під час активації зиготичних генів (zygotic gene activation; ZGA) приблизно на стадії 4-8 клітин, в той час як у миші - на стадії 1-2 клітин.

Зміна патерну XXI протягом оогенезу є необхідною для ініціації нового циклу XXI в наступному поколінні. Подібно до реактивації імпринтованої Хр у ICM, реактивація Хі (inactive X) під час оогенезу супроводжується подіями репрограмування генома, які, можливо, і забезпечують цей процес. На відміну від цього чоловічий гаметогенез характеризується специфічним типом XXI, який називається **«мейотична інактивація статевих хромосом»** (meiotic sex chromosome inactivation MSCI) та полягає в зануренні статевих X і Y хромосом в статеві везикули (за виключенням PARs), де обидві хромосоми сайленсуються. Таким чином, MSCI є прикладом більш загального механізму, який відомий під назвою **мейотичний сайленсинг асинаптичного хроматину** (meiotic silencing of unsynapsed chromatin; MSUC). Механізм MSUC забезпечує відсутність рекомбінації між негомологічними ділянками статевих хромосом протягом мейозу за рахунок гетерохроматизації цих райноів. Оскільки гетерохроматиновий стан запобігає рекомбінації, цей механізм є захистом проти анеуплоїдії в низці поколінь.

Молекулярний контроль ініціації випадкової XXI. Ініціація XXI контролюється ділянкою X хромосоми, яка називається **центр інактивації X–хромосоми** (X-inactivation center; *XIC*). Ця ділянка містить ген *XIST*. Під час диференціації клітин ген *XIST* X-хромосоми, яка буде інактивуватися, забезпечує синтез великих некодуючих РНК, які накопичуються на цій же хромосомі, формуючи репресивні компартменти ядра. Молекулярні механізми цього процесу описані на мишиних моделях з використанням ЕСК самок. ЕСК самок виникають в популяції клітин ICM на стадії ранньої бластоцисти і проходять всі етапи випадкової XXI в умовах ініціації *in vitro*. Ця модель передбачає, що головним регулятором *Xist* є ген *Tsix*. *Tsix* транскрибується з антизмістовного ланцюга *Xist* і є одним з цис-регуляторів експресії *Xist* в недиференційованих ЕСК. На початку диференціації *Tsix* не функціонує на X-хромосомі, яка буде інактивована, дозволяючи синтез РНК на *Xist*. *Tsix*-залежна регуляція транскрипції *Xist* забезпечується модифікаціями хроматину у локусі останнього. Відсутність транскрипції *Tsix* на одній з X-хромосом забезпечує формування міток еухроматину, таких як H3K4me2, H3K4me3 та H3K9, в області промотора *Xist*, рекрутуючи тим самим машинерію транскрипції. YY1 і CTCF є найкращими кандидатами на роль транскрипційних факторів регуляції *Xist/Tsix*, які регулюють моноалельну експресію генів інших локусів, оскільки здатні зв'язуватись з промоторами *Xist* і *Tsix* в ES клітинах. Окрім *Tsix* існують і інші геномні елементи в межах мишиного *Xic* , які залучені у регуляцію експресії *Xist*. У людини ген *TSIX* або відсутній або його версія вкорочена, оскільки вона не перекривається з *XIST*. Це обумовлює можливість роботи інших молекулярних механізмів, які ініціюють XCI у людини.

Особливо важливим є питання взаємозв'язків між IXX та диференціацією клітин. Нещодавно було продемонстровано, що фактори плюрипотентності Nanog, Oct3/4, and Sox2 зв'язуються з першим інтроном *Xist*, запобігаючи його експресії в недиференційованих мишиних ЕСК, тоді як інші фактори, Rex1, Klf4, та c-Myc, активують експресію промотора *Tsix*. Відсутність цих факторів на початку диференціації супроводжується активацією *Xist*. Цей факт свідчить

про зв'язок репресії XCI і вихідного стану плюрипотентності, тобто, існує прямий зв'язок між молекулярними механізмами, відповідальними за перепрограмування геному в ICM та реактивацією Xi під час оогенезу на цих же етапах. Дані щодо експресії факторів в соматичних клітинах, яка призводить до виникнення **індукованих плюрипотентних стовбурових клітин** (induced pluripotent stem; iPS) і щодо злиття гемопоетичних та ЕСК, які підтверджують цю гіпотезу, були отримані в експериментах по перенесенню соматичних ядер в енуклейовані ооцити. Дані, отримані у всіх цих експериментах, свідчать про те, що при переході до плюрипотентного статусу відбувається повногеномне репрограмування.

Ще однією загадкою є здатність ES клітин оцінювати кількість Х-хромосом і визначати, яка саме з них повинна інактивуватись. Відомо, що дві Х-хромосоми дуже близько знаходяться в ядрі на початку процесу диференціювання. В ці події залучені дві специфічні ділянки в межах Xic, а саме *Xpr*, розташований у межах гену *Xpct*, та регіон *Tsix–Xite*. Динаміка контактів різних ділянок цих хромосом в ядрі контролюється обома Х хромосомами. В результаті такого контроля алелі одного й того ж гену можуть бути по-різному експресовані, що і визначає хромосому, яка буде інактивована. Ще один фактор, який потенційно може приймати участь в оцінці кількості Х-хромосом - це U3-убіквітин-лігаза, яка є продуктом зчепленого зі статтю гена *Rnf12* (Ring Finger Protein 12). Цей фермент ініціаціює XCI дозо-залежним шляхом. У випадку надекспресії гену *Rnf12* у самців інактивується одна Х хромосома, а у самок - обидві. Таким чином, у самців звичайної кількості продукту гена *Rnf12*, який синтезується на одній Х-хромосомі, недостатньо для запуску XXI, тоді як подвійна кількість цього білка в клітинах самок достатня для інактивації однієї з Х-хромосом.

Більшість з вищеописаних подій стосуються мишей, а їх особливості у людини потребують подальших досліджень.

Поширення сигналу інактивації вздовж Х-хромосоми. Унікальна властивість РНК *Xist* полягає в її здатності покривати Хі, створюючи тим самим репресивний ядерний компартмент, який дозволяє в організмі людини сайленсувати 75-85% генів Х-хромосоми в залежності від тканини; у мишей інактивується 97% генів. Одночасно це означає, що мусять існувати чинники, які обмежують можливий зв'язок РНК *Xist* з Ха або аутосомами.

В експериментах, присвячених аналізу транслокацій Х:А, було виявлено, що особливості поширення інактивації Х хромосоми залежать від контексту послідовності, в межах якої вона відбувається, та збагаченості останньої на МГЕ з довгими кінцевими повторами, а саме на L1. Початкове накопичення РНК *Xist* на Хі починається в ділянці, розташованій вище гена *Xist* та збагаченій гістонами з модифікаціями H3K27me3 і H3K9me2, тим самим формуючи точку, з якої починається ХХІ. Репресовані L1 елементи беруть участь у формуванні специфічного гетерохроматинового компартменту під час першої фази ХХІ, а активні L1 сприяють поширенню сигналу репресії на ділянки, стійкі до ХХІ. Зв'язок між «гарячими точками» метилювання гістонів та послідовностями L1 залишається ще не вивченим. Для посадки на Хі РНК *Xist* повинна мати специфічну третинну структуру, яка визначається її нуклеотидною послідовністю. У таку взаємодію залучені також білки ядерного матрикса hnRNPU, SP120 та SAF-A, що врешті-решт і забезпечує прикріплення Хі до нього.

Сайленсинг генів Х хромосоми. Зв'язування РНК *Xist* з хромосомою призводить до накопичення репресорного комплексу Polycomb 2 (PRC2) на Хі з подальшим формуванням міток неактивного хроматину H3K27me3. За сайленсинг відповідає одна специфічна ділянка РНК *Xist,* яка являє собою консервативний повтор (повтор А) та розташовується на 5' кінці *Xist*. Повтор А формує специфічну двовимірну структуру, яка здатна зв'язуватися з білком Suz12 та іншими компонентами PRC2. Таким чином, ініціація сайленсингу починається до рекрутування PRC2 Хі. Відомо, що різні гени Х-хромосоми

мають різну кінетику сайленсингу, що вказує на існування додаткової гено-специфічної регуляції цього процесу.

Повтор А також приймає участь у просторовій організації Xi в ядрі. Точний механізм цих процесів ще невідомий. Однак вважається, що ділянки компактного хроматину з модифікаціями гістонів H3K27me3 та/або комплекс білка Satb1 з AT-богатими послідовностями можуть бути залучені у формування ядерного компартменту Xi. Ядерний розподіл білка Satb1 дозволяє припустити його роль у визначенні місць звязування РНК *Xist* з Xi. Подальша стабілізація і підтримання неактивного стану потребує залучення варіанта гістона macroH2A та/або метилювання CpG-острівців.

Інактивація Х-хромосоми та діагностика і лікування захворювань

Асиметричність інактивації Х-хромосоми в якості діагностичного інструменту. Жінки, гетерозиготні за мутаціями генів Х-хромосоми, у переважній більшості випадків характеризуються нормальним фенотипом. Це явище обумовлюється переважним виживанням клітин, в яких інактивується Х-хромосома з мутантним алелем. Таким чином, асиметрична інактивація Х-хромосомі може бути застосована для оцінки наявності поліморфізму в Х-хромосомі. Хоча аналіз РНК та/або білків дозволяє безпосередньо оцінити активність Х-хромосоми, аналіз специфічного метилювання ДНК, пов’язаного з Xi, використовується досить часто, оскільки ДНК легше виділяти, зберігати і аналізувати. Популярним методом оцінки асиметрії XXI є аналіз метилювання ДНК у високополіморфних тринуклеотидах CAG на 5’ кінці гена, який кодує андрогенний рецептор (androgen receptor; AR). Оскільки ця асиметрія не завжди проявляється у всіх тканинах однаково, важливо залучати до аналізу максимально можливу кількість типів клітин. Зазвичай це лейкоцити периферійної крові, а а також клітини букального епітелію та м’язів. І все ж необхідно відмітити, що цей тест, який базується на кількісній оцінці метилювання єдиного гену, може бути не завжди точним.

Приблизно 17% сімейних пар, які бажають мати дітей, не можуть реалізувати батьківство через періодичні викидні. Суттєва частина цих подій генетично обумовлена. Мутації в генах Х-хромосоми, які відповідають за формування плаценти, можуть бути однією з причин викиднів. Про це свідчить те, що ймовірність передачі летальних ознак, зчеплених зі статтю, від матері до синів складає 25% замість 50%. Такі матері характеризуються підвищеним ризиком спонтанного аборту (до 40% при кожній вагітності) за звичайного ризику серед населення 15-20%. Така цифра ризику спонтанного аборту розраховується за формулою [0.25x1]+[0.75x0.20]=0.4. У жінок, які є носіями генів, що відповідають за розвиток летальних зчеплених зі статтю ознак, спостерігається переважна інактивація тієї Х-хромосоми, яка несе мутантні алелі. Такі ефекти можна ідентифікувати за допомогою описаного вище тесту.

В цілому визначення наявності асиметричної XXI може бути використано для ідентифікації носійства мутацій Х-хромосоми у жінки на основі її родоводу. Такий метод дозволяє виявляти мутації в 5% геному в рамках одного тесту. Однак необхідно зазначити, що асиметрична XXI досліджується тільки в одній біологічній тканині, а в інших ситуація може дещо різнитися. На сьогодні цей тест використовується для ідентифікації зчеплених з Х хромосомою форм імунодефіцитів і ферментативних дефектів, за яких рання діагностика вкрай важлива для уникнення відповідних симптомів, наприклад, порушення функціонування лізосом , що спостерігається за хвороби Фабрі (Fabry’s disease) та синдрому Хантера (Hunter’s syndrome). Оскільки розподіл інактивованих Х-хромосом має клональну природу, такий тест можна використовувати для ідентифікації походження метастаз при дослідженні тканин пухлин. Так, ідентичність профілів XXI у пухлинах різних органів свідчить про високу імовірність виникнення таких пухлин внаслідок однієї трансформації. І навпаки, якщо профілі XXI відрізняються, то пухлини мають різне походження. Такі результати важливо враховувати при виборі стратегій лікування.

Клітинна трансплантація як метод корекції мутацій, локалізованих на Х-хромосомі. Одним із перспективних терапевтичних підходів є заміщення певних клітин у пацієнта. Застосування подібної клітинної терапії дозволяє мінімізувати ризик аутоімунного відторгнення. Досі заміщення клітин використовували при лікуванні системних імунних дефектів, оскільки можливо зібрати та виростити гемопоетичні стовбурові клітини дорослої людини. XXI в недозрілих гемопоетичних клітинах-попередниках така сама, як і у інших тканинах пацієнта, що є передумовою для успішної пересадки цих клітин. Є свідчення нормалізації фенотипа за використання терапії клітинного заміщення.

Нещодавно було продемонстровано можливість репрограмування соматичних клітин в плюрипотентні. Такий перехід потребує дії тільки чотирьох ключових факторів у соматичних клітинах людини. Індуковані плюрипотентні клітини (induced pluripotent stems; iPS) характеризуються більшістю ознак ЕСК і здатні формувати будь-яку диференційовану тканину. Сьогодні в контрольованих умовах завдяки застосуванню такої технології вдалося отримати клітини серця, крові та нервової системи. Було продемонстровано, що у мишей де-диференціація соматичних клітин супроводжується реактивацією інактивованої Х-хромосоми в iPS. У людини iPS, які отримують з мозаїчних фібробластів (з Хі батька або матері), є клонами, що робить можливим відбір iPS людини з інактивацією Х-хромосоми, яка несе мутацію. Наступним кроком є диференціація таких клітин з імплантацією пацієнтам. Такі технології видаються вкрай перспективними і, можливо, дозволять в майбутньому здійснювати терапію багатьох генетичних захворювань.

Перспективи застосування методу інактивації Х-хромосоми. Теоретично, можливе використання механізму XXI для сайленсингу багатьох генів одночасно. Було показано, що інсерція XIC людини в аутосому миші виступає як цис-репресор генів на великих відстанях. Можливо, що такий механізм можна використовувати для виключення активності будь-яких

ділянок геному з використанням інсуляторів для обмеження поширення цього сигналу. Такий підхід був би вкрай корисним при випадках мозаїчної трисомії та/або деяких типах аномальних геномних ампліфікацій/дуплікацій. Крім того, за допомогою цього методу можна аналізувати здатність синтетичних молекул упереджувати або, навпаки, індукувати XXI.

РОЗДІЛ 8. ГЕНОМНИЙ ІМПРИНТИНГ

Зазвичай гени обох батьків у рівній мірі беруть участь у розвитку ембріона. Але з цього правила є виключення, а саме, **геномний імпринтинг**, епігенетичний механізм описаний у ссавців, за якого певна група генів проявляє диференційну активність алелів, в залежності від того, материнському чи батьківському геному вони належали. Нееквівалентність батьківських геномів у мишей була продемонстрована майже 30 років тому завдяки створенню ембріонів, які містили тільки материнський або тільки батьківський диплоїдний геном. Окремі експерименти, в яких транслокації були використані для створення мишей з однобатьківським успадкуванням певних хромосом (або сегментів хромосом), ідентифікували певні ділянки, для яких двобатьківське спадкування має важливе значення для нормального розвитку та життєздатності. Було встановлено, що пригнічення експресії одного алеля з пари відбувається за рахунок **імпринтингу** (англ. *imprinting*, від *imprint* — залишати слід, фіксувати, запам'ятовувати). У подальшому виявили понад 100 генів у мишей і людини та інших ссавців, для яких характерний імпритнтинг. Можна передбачити, що ця кількість не остаточна. Багато імпринтованих генів відіграють важливу роль у рості та розвитку організму, тоді як інші мають фенотипові ефекти тільки в постнатальному періоді, особливо ті, які пов’язані з поведінкою.

Більшість імпринтованих генів розташовуються в **хромосомних кластерах**, які подібно організовані у мишей і у людини. Проте імпринтовані гени можуть розташовуватись і поза кластерами. Важливу роль у процесі геномного імпринтингу відіграє метилювання ДНК. Кожен з 16 відомих кластерів генів, які підлягають імпринтингу, регулюється особливою ділянкою (**imprinting control region** - ICR), однією з найважливіших регуляторних послідовністей, яка метильована лише в одному з батьківських алелів. Залежно від конкретного ICR, це метилювання ДНК встановлюється під час оогенезу або під час сперматогенезу. Оскільки алельне метилювання відбувається в зародковій лінії, ці **диференційно метильовані ділянки** (differentially

methylated regions - DMRs) часто називають **DMRs зародкової лінії** (germline - gDMRs). Розуміння геномного імпринтингу важливе для вивчення механізмів, які відповідають за продукування гамет і підтримку метилювання в gDMRs після запліднення. Коли ці процеси порушуються, наприклад, при застосуванні репродуктивних технологій, це може призвести до складних захворювань у людини.

Епігенетичні особливості імпринтованих генів почали з'ясовувати відразу ж після їх відкриття. Для ділянки імпринтованого гена *Igf2*r (*Insulin-like growth factor 2 receptor*) характерне метилювання ДНК лише в материнському алелі протягом усього розвитку. Згодом було показано, що цей елемент відповідає за моноалельну експресію *Igf2r* та контролює метилювання його промотора, одночасно імпринтуючи гени в цис положенні, які відповідають за експресію некодуючої ділянки. Подібні факти вказують на те, що імпринтинг контролюється шляхом встановлення метилювання ДНК зародкової лінії. Ця особливість характерна як для генних кластерів, так і для окремих імпринтованих генів. Білок DNMT3A в комплексі з DNMT3L відіграє важливу роль у встановленні моноалельного метилювання в gDMRs ооцитів мишей. Аналіз послідовностей gDMRs засвідчив, що для них характерні **тандемні повтори**, а решта особливостей є індивідуальними. Описано низку цис-регуляторних послідовностей та транс-діючих факторів в материнських зародкових лініях мишей та людини, тоді як стосовно батьківських така інформація обмежена.

Встановлення материнських і батьківських маркерів метилювання ДНК. Попередники зародкових клітин, з яких в подальшому формуються статеві клітини, відокремлюються в епібласті, ранньому пост-імплантаційному ембріоні, до визначення статі. Гаметогенез у самок та самців йде різними шляхами, формуючи клітини, які характеризуються в тому числі різними епігеномами. Так показано, що у мишей метилюються 16 материнських gDMRs, тоді як батьківських лише три.

З моменту їх відокремлення, як невеликої клітинної популяції (e7.25 ембріональний день у миші), первинні статеві клітини (PGCs) проліферують і мігрують у генітальний бугорок, який є попередником статевих органів. Як тільки ці клітини досягли генітального бугорка (на стадії e11.5), вони підлягають інтенсивному деметилюванню ДНК. Внаслідок цих процесів на початку гаметогенезу геном зародкових клітин повністю деметилюється, включаючи МГЕ. Деметилювання відбувається і в межах батьківських алель-специфічних метильованих DMRs.

Клітини зародкового шляху ембріонів самок вступають в перші етапи мейозу на стадії e13.5, а далі залишаються в диплотені профази I. В такому стані первинні ооцити перебувають до моменту народження самки. Одразу після народження вони інкорпоруються в примордіальні фолікули, і після активації фолікулу входять в фазу зростання. На стадії вторинного фолікула відбувається метилювання ДНК в межах gDMRs. Метилювання - це динамічний процес, імовірно залежний від розміру ооциту. Початок і кінетика метилювання в межах різних gDMRs специфічна, і встановлення в них імпринтингу проходить з різною швидкістю протягом росту ооцита. Важливо відзначити, що метилювання gDMR (як і CpG-острівців, генів та послідовностей, які повторюються) відбувається в клітинах, які не діляться. Це робить ооцит особливо цікавою системою для дослідження метилювання *de novo*, оскільки воно відбувається без відповідних впливів, які присутні за поділу клітин. Це також пояснює високі рівні метилювання поза CpG-динуклеотидами, оскільки воно не підтримується в процесі реплікації ДНК (підтримуюча метилтрансфераза DNMT1 забезпечує тільки «симетричне» метилювання ДНК в контексті CpG динуклеотидів після реплікації). Крім того, метилювання на стадії формування гамет мінімізує мутаційний процес, спричинений дезамінуванням 5mC.

Метилювання *de novo* в чоловічих статевих клітинах має свої особливості. В послідовностях gDMRs метилювання ініціюється в гоноцитах, які знаходяться в фазі мітозу G1 та закінчується до початку мейозу. Воно

починається на стадії формування фетальних яєчок і завершується до народження. Від моменту початку метилювання *de novo* до формування дозрілої сперми відбувається багато раундів клітинних поділів, чим і пояснюється певна зміна вихідних патернів метилювання та накопичення мутацій внаслідок дезамінування. Питання додаткового метилювання ДНК у межах gDMRs залишається відкритим, оскільки мутації у генах *Dnmt3a, Dnmt3b* та *Dnmt3L* призводять до серйозних дефектів сперматогенезу.

Можливо, відмінності в метилюванні ДНК в зародкових клітинах самців та самок пояснюються особливостями гаметогенезу, що і формує материнські і батьківські характеристики послідовностей gDMRs. Материнські gDMRs містять послідовності, подібні таким у CpG-острівцях; вони також пов'язані з точками старту транскрипції. Але на відміну від CpG-острівців ці послідовності переважно розташовуються у внутрішньогенних ділянках. Послідовності багатьох материнських gDMRs містять тандемні повтори. Припускається, що контекст цих послідовностей важливий для метилювання *de novo*, проте переконливих доказів цього не існує. Наявні дані з приводу стеричних особливостей тетрамерного комплексу білків DNMT3A та DNMT3L, які забезпечують його переважне зв’язування з послідовностями, де динуклеотиди CpG зустрічаються кожні 8-10 пн. Хоча така періодичність у материнських gDMRs була показана лише в одному дослідженні, вважається, що це їх загальна риса. Не дивлячись на те, що материнські gDMRs можуть містити достатньо CG-збагачених доменів у вигляді тандемних повторів, вони складають лише невелику частину цієї послідовності, в якій всі CpGs зазнають метилювання незалежно від місця їх розташування. На відміну від материнських gDMRs, всі три досліджених батьківських gDMRs (H19 DMD, Dlk1-Gtl2 IG-DMR та Rasgrf1 DMR) являють собою міжгенні CG-збагачені елементи.

Загалом вважається, що імпринтинг послідовностей gDMRs відбувається шляхом їх метилювання. Однак метилювання материнських gDMR в ооцитах варто розглядати як стохастичний процес, тоді як захист від метилювання тих

самих елементів в сперматогенезі мусить мати «активну» складову. Це пояснюється тим, що материнські gDMRs метильовані в ооцитах тотально, тоді як в сперматозоїдах вони вихідно неметильовані подібно до більшості CpG-острівців загалом. Крім того, повногеномне секвенування з ідентифікацією метильованих міток показало, що більшість CpG-острівців в ооцитах та сперматозоїдах на відмінність від відомих gDMRs інших клітин є повністю метильовані. Більшість цих CpG-островів, однак, втрачають значну частину метилювання перед імплантацією ембріону. Таким чином, вищеописані механізми імпринтингу gDMRs варто розглядати в контексті загальних процесів метилювання в ооцитах та сперміях, які відбуваються протягом передімплантаційного періоду.

Встановлення імпринтингу та організація хроматину. На специфічність встановлення метилювання у межах gDMR в клітинах зародкового шляху можуть впливати модифікації гістонів. Експерименти *in vitro* показали, що метилювання лізину 4 гістону H3 (H3K4) може упереджувати метилювання цитозину, оскільки воно блокує зв'язування DNMT3L з N-кінцем гістона H3, і, таким чином, унеможливлює формування комплексу DNMT3A-DNMT3L з ДНК. В той же час зв'язування DNMT3A з коровим гістоном H3 упереджує метилювання H3K4. В ембріональних стовбурових клітинах та інших типах ембріональних клітин в хроматині в місцях розташування CpG-острівців лізин 4 гістону H3 ди- і триметильований. Така конфігурація хроматину є характерною для активних промоторів, вона запобігає неправильному метилюванню ДНК. Подібні механізми можуть діяти в gDMRs зародкових клітин, де ДНК мусить бути захищена від метилювання.

Всі материнські gDMRs являють собою CpG-острівці, які перекриваються з промотором та повністю захищені від метилювання ДНК в чоловічих статевих клітинах. Було показано, що деякі материнські gDMRs збагачені на H3K4me3 у обох алелях, а їх промотори активні у чоловічих статевих клітинах плоду під час встановлення імпринтинга. Таке локальне збагачення на H3K4me3

зберігається до постнатальних стадій сперматогенезу, принаймні в деяких материнських gDMRs, що, можливо, і забезпечує захист від встановлення метилювання ДНК. У мишей 1 % геному сперматозоїдів зв'язаний з гістонами, у людей відповідний показник складає 10 %. Імпринтовані локуси є ділянками геному, які зберігають нуклеосомну організацію в зрілій спермі. Припускається, що саме материнські gDMRs характеризуються наявністю метилювання H3K4 в сперматозоїдах, і такий стан хроматину підтримується після запліднення, допомагаючи запобігти *de novo* метилюванню ДНК на ранніх стадіях ембріогенезу.

Метилювання H3K4 відіграє важливу роль в специфічному метилюванні ДНК в жіночих статевих клітинах. H3K4-специфічна деметилаза LSD2 (також відома як Lysine (K)-specific demethylase 1B; KDM1B) експресується на високому рівні в ооцитах, які ростуть, саме тоді, коли відбувається метилювання ДНК. Якщо забезпечити накопичення міток H3K4me2/3 в ооцитах, то імпринтинг деяких материнських gDMRs не відбувається.

Інші модифікації гістонів можуть сприяти встановленню метилювання ДНК в gDMRs в статевих клітинах. У *N. crassa* H3K9me3 спрямовує *de novo* метилювання ДНК, щоправда, у ссавців таких даних ще не отримано. У той час як в соматичних клітинах метильовані алелі gDMRs збагачені на мітки H3K9me3, в чоловічих статевих клітинах такі репресивні модифікації внаслідок імпринтингу у батьківських gDMRs не спостерігаються. Крім того, гістонова мітка H3K20me3 не є сигналом для встановлення метилювання ДНК в чоловічих статевих клітинах, принаймні для gDMRs. Симетричне диметилювання H4R3me важливе для роботи метилтрансферази DNMT3A в глобінових генах у попередниках еритроцитів. Роль мітки H4R3me2s в метилюванні ДНК зародкових клітин залишається не з'ясованою. Зокрема, було показано, що модифікації H4R3me2s характерні для всіх проаналізованих gDMRs (як імпринтованих, так і неімпринтованих) в чоловічих статевих клітинах плоду. Хоча H2A/H4R3me2s може сприяти залученню DNMT3A в чоловічих статевих клітинах, проте ці мітки не дозволяють розрізнити, які

gDMRs повинні бути метильовані, а які ні. Можливо, що найбільш важливим для метилювання ДНК є триметилювання H3K36.

Важко припустити, що імпринтинг скеровується лише модифікаціями гістонів. Повинна існувати подія, яка є сигналом для формування таких модифікацій. У соматичних клітинах модифікації гістонів дуже поширені і не є локус-специфічними. Хоча модифікації гістонів, безсумнівно, приймають участь в процесі імпринтингу, метилювання ДНК повинно мати додаткові локус-специфічні сигнали або особливості організації хроматину для проходження цього процесу.

Роль транскрипції в імпринтингу. Оскільки механізм специфічного метилювання gDMR навряд чи пов'язаний з послідовностю їх ДНК, особливо у материнських gDMRs, можливо, що цей процес може залежати від подій, які відбуваються на рівні транскрипції та визначають межі метилювання ДНК. Існують незаперечні докази ролі **транскрипції** в цих процесах, принаймні при метилюванні материнських gDMRs. По-перше, як відзначалося вище, більшість материнських gDMRs є CpG-острівцями, локалізованими в межах генів. Інколи вони розташовуються поза канонічною структурою гена. Відомо, що багато генів транскрибуються з альтернативних TSS, а gDMRs розміщуються всередині транскрипційних сайтів, активних протягом метилювання ДНК. Описана властивість характерна для більшості CpG-острівців, які метилюються в ооцитах. Внутрішньогенні CpG-острівці часто метилюються і в соматичних клітинах, що дозволяє припустити, що механізм метилювання gDMR в ооцитах є загальним принципом метилювання послідовності гену. По-друге, існують імпринтовані гені, які містять CG-збагачені gDMRs, які є копіями інших ділянок геному (ретротранспозовані послідовності), які здатні репресувати один з алелів. Ген ратинобластоми людини *RB1(Retinoblastoma 1)* містить інтронний CpG-острівець, який запускає вказаний вище механізм. Цей CpG-острівець характеризується материнським метилюванням ДНК та виник у результаті ретротранспозиції з ділянки 9 хромосоми. Однак

ретротранспозиційні переміщення з того ж локусу в інші генні послідовності не призводять до формування нових DMRs. По-третє, існують дані, що наявні послідовності є відмінними від gDMRs, які відіграють роль в метилюванні ДНК. Зокрема, при синдромі Ангельмана ідентифіковано велику кількість мікроделецій в позиції 30kb вище DMR гену *SNRPN (Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N)*, що свідчить про участь цієї ділянки в імпринтингу району 15q11-13. Хоча молекулярна функція цього генетичного елемента залишається невизначеною, відомо, що відповідна послідовність гена *SNRPN* у мишей також має альтернативні промотори, активні у ооцитах. Існують і інші приклади участі позагенних послідовностей, які відіграють роль в імпринтингу тих чи інших генів (наприклад локуси *GNAS, NESP55, STX16* та ін.).

Все вищесказане дозволяє вважати, що дефекти метилювання при певних синдромах можуть бути спричинені порушенням промоторних або енхансерних ділянок, важливих для процесу транскрипції. Згідно з сучасними уявленнями щодо природи цього процесу, материнські gDMRs являють собою CpG-острівці, асоційовані з сайленсованими промоторами, локалізованими в межах активних транскрипційних одиниць. Ця модель не виключає того, що існують інші регуляторні елементи цього процесу, оскільки транскрипція не завжди призводить до метилювання внутрішньогенних gDMRs.

Транскрипційно-залежний механізм метилювання gDMRs та CpG-острівців підтверджується недавніми повногеномними дослідженнями метилювання в ооцитах мишей. Продемонстровано, що на початку росту ооцитів дуже мало CpG-острівців метильовані, а у зрілих ооцитах їх кількість сягає 7%. Метилювання CpG-острівців, як і gDMRs, забезпечується білками DNMT3A і DNMT3L. Аналіз послідовностей не виявив особливих ділянок, які б визначали, який CpG-острівець буде метильований, а який ні. В той же час, велика частина метильованих CpG-острівців розташовується в межах генів, особливо тих, які транскрибуються з альтернативних промоторів у ооцитах, які ростуть. Також продемонстровано, що високі рівні метилювання характерні для

генних послідовностей, які активно транскрибуються. Таким чином, метилювання gDMRs та внутрішньогенних CpG-острівців є частиною загального процесу метилювання генів, яке відбувається протягом росту ооцита. Таким чином, материнські gDMRs не є самі по собі предметом метилювання, натомість мусить існувати механізм, який упереджує в їх межах встановлення метилювання. Більшість CpG-острівців не метильовані в ДНК сперматозоїдів. Як вказувалось вище, промотори генів, асоційованих з деякими материнськими gDMRs, активні у чоловічих статевих клітинах плоду та під час метилювання *de novo* характеризуються гістоновою міткою H3K4me3, що захищає їх від метилювання ДНК у межах цієї послідовності. На противагу цьому, батьківські gDMRs, які розташовуються в міжгенному просторі та не транскрибуються в ооцитах, взагалі не виступають в якості субтрату метилування.

Оскільки транскрипція відіграє важливу роль в метилюванні *de novo* gDMRs в ооцитах, які розвиваються, виникає питання про існування подібного механізму в зародкових тканинах самців. Хоча патерн метилювання описаний в зрілих сперматозоїдах мишей і людини, повногеномні сиквенси клітин-попередників сперматоцитів (prospermatogonia) відсутні, що не дозволяє судити про зв'язок метилювання ДНК з активними транскрипційними одиницями. Аналіз батьківських gDMRs в **диференційно метильованому домені** (differentially methylated domain; DMD) у гені *H19* і у диференційно метильованому регіоні *Dlk1-Gtl2* (дані гени розміщені на хромосомі 12 мишей та характеризуються реципрокним імпринтингом) у чоловічих статевих клітинах ембріонів останніх етапів розвитку продемонстрував наявність послідовностей DMRs в транскриптах. Це свідчить про існування залежного від транскрипції механізму метилювання ДНК, аналогічного описаному в ооцитах, що ростуть. У даний процес можуть бути залучені некодуючі РНК, транскрибовані з DMR, але фактів, які б це передбачення підтверджували, досі не виявлено.

Зв'язок транскрипції та модифікацій гістонів при метилюванні gDMR. На метилювання gDMR можуть впливати модифікації гістонів, які характерні для транскрипційно-активних ділянок ДНК, тому що такі модифікації здатні рекрутувати метилтрансферазний комплекс DNMT3A/DNMT3L, чутливий до модифікацій N-кінця гістону H3. Зв'язування даного комплексу інгібується метилюванням H3K4, а домен PWWP (від Pro-Trp-Trp-Pro) метилтрансферази DNMT3A має спорідненість до H3K36me3. Модифікація гістону H3 характерна для активних транскрипційних одиниць, а гістонова метилтрансфераза SETD2, яка відповідає за цю модифікацію, повязана з Ser2-фосфорильованою формою РНК-полімерази II, відповідальної за елонгацію транскрипції. Деметилаза H3K4me2/3 KDM5B (також відома як PLU-1/JARID1B) залучається на генну послідовність H3K36me3 у ембріональних стовбурових клітинах, можливо через взаємодію з білком хроматину MRG15 (MORF4-related gene on chromosome 15).

У людини деметилаза H3K4me1/2 асоційована з послідовностями генів, які експресуються в клітинах HeLa, та входить до комплексу, який включає Ser2-фосфорильовану РНК-полімеразу та H3K36 метилтрансферазу NSD3 (Nuclear SET domain-containing protein 3). Таким чином, процеси, пов'язані з транскрипцією, можуть формувати гістонові модифікації, які є передумовою до взаємодії певної послідовності з комплексом DNMT3A/DNMT3L. Питання про те, чи послідовності активних генів та gDMR самі по собі мають вищезгадані гістонові модифікації в ооцитах, які ростуть, чи ці специфічні фактори є наслідком метилювання ДНК, потребує подальших досліджень. Тим не менше, все, що відомо про особливості взаємодії модифікованих гістонів з комплексом DNMT3A/DNMT3L, може бути покладено в основу певної моделі цього процесу. Як відмічалося раніше, деякі CpG-острівці усередині транскрипційно активних одиниць не метилюються в ооцитах. Білки, які містять домен CXXC, здатні зв'язуватись з неметильованими CpG-острівцями. Більшість соматичних клітин містить такі білки, а зв'язування міжгенних CpG-острівців в ооцитах з такими факторами захищає їх від метилювання. Питання про те, чи є

первинним у цьому процесі гіпометилювання CpG-острівців, чи зв'язування таких факторів, залишається відкритим.

Малі регуляторні РНК та метилювання DMR. Встановлено, що у процес метилювання одного з батьківських gDMR, а саме ICR гену *Rasgrf1 (RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1)*, залучено клас малих РНК, які взаємодіють з білками Piwi (piRNA). Незвичайність gDMR гена *Rasgrf1* полягає ще й у тому, що метилювання в його межах забезпечується не тільки DNMT3A, але і метилтрансферазою *de novo* DNMT3B, яка обслуговує метилювання перемежованих (interspersed) повторів у зародковій лінії самців. gDMR гена *Rasgrf1* розташвується вище промотора цього гена поряд з елементом, який являє собою тандемний повтор з 40 копій по 41 пн кожний та є важливим для метилювання gDMR у зародкових клітинах самців. Цей gDMR також містить копію LTR-ретротранспозона RMER4B, який наявний в геномі мишей в сотнях копій. Сиквенс РНК довжиною 23-31 пн з гонад ембріонів самців продемонстрував наявність великої кількості малих РНК в області послідовності мобільного елемента RMER4B в gDMR; такі малі РНК відсутні у мутантів за геном *MitoPLD*, продукт якого є компонентом механізму продукції piRNA. Сперматогонії цих мутантів характеризуються також різким зниженням метилювання корової ділянки gDMR, до складу якого входить RMER4B. Однак ці ж самі мутанти характеризуються нормальним метилюванням двох інших gDMR. Отримані дані стосовно того, що тандемні повтори в гені *Rasgrf1* виконують роль промотора для антизмістовної РНК з елемента RMER4B, яка взаємодіє з piRNA, синтезованої в кластері piRNA хромосоми 7, в якому також міститься RMER4B. А така взаємодія запускає «пінг-понг» цикл ампліфікації piRNA. piRNAs вважаються індукторами метилювання *de novo* мобільних елементів в зародкових клітинах самців, хоча точний механізм цього процесу невідомий. Можливість існування інших gDMR, які метилюються вищеописаним шляхом, потребує повногеномного секвенування з визначенням сайтів метилювання сперматогоніїв мутантів. Виходячи з усього

вищесказаного, можна передбачити, що мусять існувати відмінності в метилювання ДНК, які залежать від шляху piRNA у сперматозоїдах та ооцитах. Можливо, що добір може діяти на будь-який gDMR незалежно від механізму його формування, і в залежності від цього процесу буде підтримуватися метилювання конкретного алелю, в якому розміщений певний gDMR.

Метилювання ДНК та імпринтинг у самців. В зародкових клітинах ссавців існують і інші механізми імпринтингу, окрім метилювання CpG-острівців. Хоча точна природа таких механізмів незрозуміла, деякі дані свідчать, що вони відбуваються паралельно з метилюванням ДНК. Яскравим прикладом таких механізмів є інактивація Х-хромосоми. У мишей інактивація Х-хромосоми відбувається у період преімплантанційного розвитку за рахунок імпринтингу у позаембріональних клітинних лініях. На етапі раннього ембріогенезу спостерігається експресія некодуючої РНК Xist тільки з батьківської Х-хромосоми. Необхідно підкреслити, що такий механізм, характерний для материнських зародкових ліній в ході овогенезу, не потребує метилювання ДНК та має місце в умовах, коли *de novo* ДНК-метилтрансферази не працюють. Крім того, імпринтингу підлягають деякі гени мишей у плаценті. Так нещодавно ідентифіковано два нових гени (*Ano1* та *Gab1)*, які імпринтовані в плаценті, та не існує даних з приводу їх алель-специфічного метилювання. Ген *Sfmbt2*, який експресується в ранньому ембріогенезі та у позаембріональних тканинах лишень на хромосомі, яка походить від батька, не містить gDMR. Вищевикладені дані свідчать про існування механізму, відмінного від метилювання ДНК, який контролює імпринтинг аутосомних локусів на стадії зародкових ліній.

Ще одне свідчення існування імпринтингу поза контролем метилювання ДНК було отримано в результаті досліджень мутантів за геном *Dnmt3L*. Самки з дефішенсі за цим геном фенотипово нормальні, хоча в їх ооцитах не спостерігається встановлення імпринтингу за рахунок метилювання ДНК. Відсутність імпринтингу, який контролюється материнським метилюванням

ДНК, призводить до порушення експресії імпринтованих генів в ембріонах самок *Dnmt3L*$^{-/-}$. Однак, у деяких ембріонів таких самок спостерігали нормальне алель-специфічне метилювання gDMRs генів *Snrpn* та *Peg3*. В цих метильованих ділянках спостерігали модифікації гістонів, характерні для DMR соматичних клітин. Залишається відкритим питання природи такого метилювання в ооцитах за умови відсутності активності гена *Dnmt3L*. Крім того, виявлено, що порушення метилювання gDMR гена *Snrpn* в ооцитах самок мишей відбувається за відсутності білка ZFP57 (Kruppel associated box (KRAB)-containing zinc finger). Однак половина нащадків самок Zfp57$^{-/-}$ характеризуються відновленим метилюванням DMR гену *Snrpn* за материнським типом. Таким чином, інформація про материнський характер метилювання алеля мусить зберігатися протягом стадії ооциту та реалізуватися після імплантації. Механізми цих процесів до кінця не з'ясовані ще і тому, що зв'язування білка ZFP57 з DMR повинно бути залежним від метилювання.

Якщо вставити в геном самців *H19* ICR, який являє собою внутрішньогенний батьківський gDMR, то він не метилюється в зародкових клітинах. Однак у деяких нащадків таких трансгенних самців метилювання CpG ідентифікується в батьківських алелях на етапі імплантації. Таким чином, вставлений DMR набуває певних особливостей в спермі, які забезпечують його метилювання протягом ембріонального розвитку.

Залишається мало зрозумілим, які саме батьківські мітки, відмінні від метилювання ДНК, можуть бути залучені у даний процес та підтримуються у соматичних клітинах. У випадку зародкових ліній самиць відомо, що деякі ядерні та цитоплазматичні білки здатні впливати на встановлення імпринтингу ICR. Незрозуміло, чи такі білки напряму залучені в метилювання ДНК, чи вони відповідають за мітки, відмінні від метилювання ДНК. Геном ооцита характеризується структурою хроматину, яка забезпечує можливість метилювання материнських gDMRs. Збереження такої конфігурації хроматину після злиття статевих клітин свідчить про можливість встановлення метилювання ДНК у виключних випадках навіть після запліднення. Як

зазначалось вище, імпринтовані локуси батьківського геному мають нуклеосомну структуру у дозрілих сперматозоїдах. Таким чином, певний статус хроматину сприяє встановленню алель-специфічного метилювання ДНК батьківських хромосом у ранньому ембріогенезі.

Імпринтинг та ранній ембріогенез. Як згадувалося вище, більшість CpG-острівців і інших CpG-збагачених ділянок метилюються протягом гаметогенезу, однак невелика кількість таких послідовностей зазнає метилювання в предімплантаційний період, а також протягом пізніх стадій розвитку. Таким чином, клітинні механізми підтримання метилювання протягом раннього розвитку відіграють ключову роль в геномному імпринтингу. Саме вони визначають, які gDMRs матимуть різний статус метилювання і, таким чином, визначати алель-специфічну експресію генів протягом розвитку. Не дивлячись на важливість таких процесів, їх конкретні механізми мало зрозумілі. Це особливо важливо в контексті захворювань людини, пов’язаних з імпринтингом, більшість з яких виникає саме на стадії раннього ембріону. Дослідження таких захворювань у людини та використання мишиних моделей дозволили встановити декілька білків, залучених в встановлення алель-специфічного метилювання ДНК протягом ембріонального розвитку. Такі білки повинні підтримувати як метильований статус одних алелів, так і неметильований інших.

Перші ембріональні клітинні поділи особливо важливі для підтримання метилювання ДНК. Батьківський геном підлягає активному тотальному деметилюванню одразу ж після запліднення, тоді як материнський геном залишається метильованим на цій стадії і деметилюється пізніше, протягом передімплантаційного періоду розвитку. Крім DNMT1, яка відіграє основну роль у підтриманні загального рівня метилювання ДНК, існує декілька материнських білків, які забезпечують захист певних локусів від деметилювання ДНК безпосередньо після запліднення. Білок DPPA3 (Developmental pluripotency-associated protein 3; також відомий як PGC7 або

STELLA у мишей та є материнським фактором, який функціонує на передімплантаційній стадії розвитку) експресується протягом оогенезу і наявний на стадії передімплантаційного ембріона. Експерименти на мишах продемонстрували, що в період від запліднення до стадії 2-х клітин DPPA3 відіграє критичну роль в захисті материнського геному від деметилювання. Це стосується материнських gDMRs у генах *Peg1, Peg3* та *Peg10,* але не в генах *Snrpn* та *Peg5*. В батьківському геномі DPPA3 захищає від деметилювання послідовності в генах *H19* та *Rasgrf1*. Білок DPPA3 містить ДНК-звязуючий домен, але, оскільки він мусить специфічно розпізнавати gDMRs, то повинен також бути чутливим до певних специфічних модифікацій гістонів. Імовірно це пов'язано з його роллю в конденсації хроматину протягом оогенезу. У материнському геномі саме цей білок упереджує перетворення 5mC на 5hmC, тому він може претендувати на роль селективного фактору в підтриманні метилювання певних gDMRs.

ZFP57 – це ядерний білок, який, можливо, відіграє специфічну роль в захисті gDMRs від деметилювання. Роль цього білка в таких процесах вперше була продемонстрована в дослідженнях діабету новонароджених, захворюванні, яке пов'язують з порушенням імпринтингу гену *PLAGL1.* Аналіз родоводів свідчить, що цей стан пов'язаний з втратою метилювання в межах багатьох DMRs, яка корелює з гомозиготністю за мутаціями гену *ZFP57*. У дослідженнях на мишах було показано, що *ZFP57* важливий для підтримання метилювання багатьох DMRs соматичних клітин та метилювання *de novo* гена *Snrpn.* Білок ZFP57 пов'язують з усіма дослідженими імпринтованими метильованими DMRs в ЕСК. Специфічність такої взаємодії забезпечується гексануклеотидом TGCCGC, який ідентифікований в gDMRs та деяких інших локусах. В процес підтримання соматичного метилювання білком ZFP57 залучений також білок KAP1. Білок ZFP57 зв'язує кофактор KAP1 на хроматині завдяки своєму домену KRAB. Таке зв'язування призводить до залучення репресивних модифікаторів хроматину, таких як комплекс ESET/SETB1, який контролює H3K9me3. Крім того, комплекс ZFP57/KAP1 взаємодіє з DNMTs та з білком

UHRF1, який зв'язується з напівметильованою ДНК після проходження ре плікативної вилки, що також важливо для підтримання метилювання ДНК. Нещодавно було продемонстровано, що ооцитарний KAP1 бере участь у підтриманні метилювання gDMRs протягом перших поділів до моменту синтезу зиготичних білків KAP1. За відсутності материнського KAP1 спостерігається стохастична втрата метилювання в деяких gDMRs (як материнських, так і батьківських). Тільки обмежена кількість великих CpG-острівців, сильно метильованих в ооцитах та спермі, зберігається протягом передімплантаційного розвитку.

Крім того, білки з доменом типу цинкового пальця можуть також впливати на статус метилювання DMR, проте іншим шляхом і, можливо, без специфічної взаємодії між gDMRs та білком ZFP57. Багатофункціональний білок з цинковим пальцем CTCF різними шляхами може регулювати експресію генів. У соматичних клітинах він асоційований з неметильованим станом материнського алелю *H19* DMR. Мутації у всіх чотирьох сайтах зв'язування CTCF у *H19* DMR призводять до метилювання ДНК материнського алелю протягом постімплантаційного розвитку. В обох випадках зв'язування цих білків призводить до захисту від метилювання неметильованого алелю. Повногеномний аналіз метилому ЕСК мишей дозволив встановити, що гіпометилювання регуляторних регіонів з низьким вмістом CpG (так звані низькометильовані регіони) забезпечується зв'язуванням транскрипційних факторів, таких як CTCF. Усі ці факти свідчать на користь того, що зв'язування факторів на великих ділянках ДНК з неметильованими копіями gDMRs може забезпечувати їх захист від метилювання, проте за рахунок взаємодій, що не є специфічними для gDMRs.

Інші білки також приймають участь в підтриманні метилювання ДНК в gDMRs на ембріональній стадії. Білки MBD3 та MTA2 (metastasis tumour antigen 2) входять до складу комплексу ремоделювання хроматину NuRD. Виключення експресії одного з вищезгаданих білків призводить до зниження метилювання в *H19* DMR на передімплантаційній стадії ембріона.

Припускається, що ремодуюючий комплекс NuRD бере участь у підтриманні метилювання ДНК у *H19* DMR з деякою специфічністю, механізм якої на сьогоднішній день ще не зрозумілий. Модифікації гістонів також можуть приймати безпосередню участь у соматичному підтриманні метилювання DMR, які мають різний статус метилювання у зародковій лінії. В метильованих материнських gDMRs наявність H3K4me2 та H3K4me3 корелює з активністю промоторів. Оскільки на стадії раннього ембріона метилювання ДНК *de novo* відбувається активно, модифікації гістонів H3K4me2 та H3K4me3 захищають ДНК від метилювання, запобігаючи зв'язуванню комплексів DNMT3A- та DNMT3B/DNMT3L з хроматином.

Білки родини TET також залучені в контроль метилювання CpG-острівців в клітинах ссавців. Білок TET1 приймає участь в деметилюванні ДНК, окислюючи 5mC до 5hmC. Білки TET експресуються в різних типах клітин з найвищими рівнями в зиготі та ембріональних стовбурових клітинах, що також може свідчити про їх роль в метилюванні ДНК. Білок TET3 відповідає за перетворення в зиготі мишей, особливо в чоловічому пронуклеусі. Білки даної родини також можуть підтримувати відповідний статус алелей неметильованих gDMRs, перетворюючи 5mC на 5hmC.

Підсумовуючи, треба зауважити, що метилювання gDMRs скоріше за все відбувається не внаслідок реалізації специфічних механізмів, а є результатом загальних процесів метилювання в зародкових тканинах самців і самок. Проте, пошук подібних специфічних механізмів триває.

РОЗДІЛ 9. ПАРАМУТАЦІЇ

Закони Менделя пояснюють більшість фактичного матеріалу, що стосується спадковості у організмів, які розмножуються статевим шляхом; однак, описані численні випадки, які не підпадають під їх дію. Одне з таких виключень – **парамутація** – це передача інформації між алелями одного гену чи гомологічними послідовностями, яка призводить до встановлення нових, мейотично-успадковуваних, рівнів експресії генів. Наявність парамутацій порушує гіпотезу чистоти гамет, яка постулює, що за формування гамет алелі в гетерозиготі не впливають один на одного. Перша згадка про феномен, подібний до парамутації, була опублікована у 1915 році; тим не менше, систематичне вивчення парамутацій фактично започатковане лише у 50-х роках минулого століття Брінком (Brink) в дослідженнях локусу *r1* (*red1*) кукурудзи. Локус *r1* відповідальний за пігментацію насіння. Алель *R-r* призводить до темно-пурпурового кольору насіння, в той час як *R-stippled* призводить до утворення плямистого забарвлення. Коли *R-r* схрестили з *R-stippled*, у нащадків другого покоління темне забарвлення не спостерігалось, що вказувало на те, *R-r* в гомозиготі не проявлявся. Невдовзі після публікації Брінка, подібне явище було описано у локусі *b1* (*booster1*) кукурудзи, який відповідає за активацію каскаду реакцій біосинтезу антоціану та формування антоціанового забарвлення деяких тканин рослини.

Термін «парамутація» було запропоновано аби підкреслити різницю між досліджуваним незвичним явищем та класичною генетичною зміною: парамутації виникають з дуже високою частотою і не випадковим чином, вони є потенційно оберненими та не змінюють послідовність ДНК. Таким чином, парамутація – класичний приклад епігенетичного явища, а алелі, залучені у цей процес, називаються «епіалелі». За умов парамутації новий епіалель здатний в наступному поколінні змінювати рівень експресії іншого потенційного епіалелю. Таке спадкування може призвести до дуже швидкого, неменделівського, розповсюдження у популяції епіалелів та відповідних фенотипів.

Усі ранні приклади парамутацій стосувалися генів, які забезпечують фенотип, який легко ідентифікується, наприклад – пігментацію. Пізніше для кукурудзи були описані парамутації у локусах *pl1* (*plant color1*) та *p1* (*pericarp color1*), які також відповідають за пігментацію, та у локусі *lpa1* (*low phytic acid 1*), який приймає участь в біосинтезі фітинової кислоти. Крім того, існує декілька прикладів парамутацій у грибів та тварин. Виявилося, що парамутації виникають значно частіше, ніж вважалося спочатку. У декількох випадках було зафіксовано формування парамутацій під впливом певних чинників оточення. Ці данні дозволили припустити, що парамутації та подібні їм явища можуть відігравати важливу роль у процесах адаптації організмів.

Парамутації у кукурудзи. **Локус *b1*** кукурудзи залишається найбільш вивченою модельною системою у вивченні парамутацій. Він кодує білок, який відповідає за запуск біосинтезу антоціану, що накопичується в тканинах пропорційно до рівня транскрипції у локусі *b1*. З-поміж багаточисельних алелів локусу *b1* природнього походження досі ідентифіковано лише два епіалелі: *B-I* (*Booster-Intense*) та *B'*. *B-I* має високий ступінь транскрипції та забезпечує темно-пурпурове забарвлення тканин. Транскрипція епіалелю *B'* в 20 разів нижча, тому рослини демонструють малопомітну пігментацію. Якщо два епіалелі об'єднані в одному генотипі, *B-I* завжди змінюється (парамутує) в *B'* . Відповідно, епіалель *B'* названо **«парамутагенним»**, а епіалель *B-I* – **«парамутабільним»**. Інші алелі, які не беруть участі в цій парамутації, іменуються **«нейтральними»**.

Стан *B'* надзвичайно стійкий, адже реверсія парамутованого *B'* епіалелю ніколи не спостерігалася у особин дикого типу, не дивлячись на тисячі рослин, досліджених у ході десятків експериментів. На відміну від цього, парамутабільний стан *B-I* є не стійким. У *B-I* рослин виникає реверсія, що відбувається спонтанно з частотою від 1 до 10%, залежно від рослини. В системі *b1* епіалель, який спонтанно перестав експресуватись, має всі характеристики положення *B'* – він спадкується та є парамутагенним.

В **локусі *pl1*** спонтанні зміни парамутабільного епіалелю *Pl-Rh* (*Pl-Rhoades*) призводять до різноманіття фенотипів з різним ступенем сайленсингу. В системі *pl1* ступінь спонтанного зниження транскрипції корелює з парамутагенністю. Алелі з найбільшим зниженням транскрипції демонструють найсильнішу парамутагенність. Спонтанно репресовані епіалелі **локусу *r1*** не спадкуються і не є парамутагенними. Всі вищеописані явища можуть відображати як спадкові особливості локусів, так і відмінності парамутаційних процесів, які відбуваються в них.

ДНК-детермінанти парамутацій. В серії простих генетичних експериментів Стем з співав. (Stam et al.) виявили послідовність тандемних повторів, розташовану на відстані 100 кб вище TSS гену *b1* та необхідну для того, щоб відбулася парамутація. І в *B-I*, і в *B'* ця послідовність представлена сімома тандемними повторами довжиною 856 пн кожен, які є унікальними для геному кукурудзи. На відміну від *B-I* і *B'*, в парамутаційно-нейтральних алелях повтор зустрічається лише один раз. Аналіз групи рекомбінантних алелів, які відрізняються між собою тільки кількістю повторів, виявив, що вираженість парамутації залежить саме від кількості повторів. Алелі з сімома та п'ятьма копіями повторів демонстрували сильну парамутагенність, в той час як алелі, які містили три повтори, були менш парамутагенними, а сайленсінг був неповним. Ці дані показали, що має існувати певний механізм, який забезпечує оцінку кількості повторів в парамутації. Додаткові дані щодо ролі в парамутуванні повторюваних послідовностей ДНК були отримані з досліджень **локусу *p1*** кукурудзи, ще однієї парамутаційної системи, де були встановлені ДНК-детермінанти парамутування. Локус *p1* кодує фактор транскрипції, необхідний для синтезу флобафену. Парамутабельний алель *P1-rr* забезпечує забарвлення початку та стрижню початку кукурудзи. Делеційний аналіз локусу *P1* виявив фрагмент довжиною 1,2 кб, який є достатнім, аби нативний *P1-rr* парамутував. Цей фрагмент довжиною 1,2 кб є частиною більшого повтору, який розташований поряд з кодуючою частиною *p1*. Проте не всі алелі, які

містять повтори, приймають участь в парамутаційних процесах, наприклад, локус *P1-wr* кукурудзи до таких не належить. *P1-wr*, сайленсований епігенетично, містить численні повтори і при цьому парамутагенно нейтральний по відношенню до *P1-rr* чи *P1-rr'*.

Досить цікавим є той факт, що повтори у *b1* і у *p1* демонструють енхансерну активність. Було продемонструвано, що в ядрах і *B-I*, і *B'* повтори розташовані в безпосередній близькості до ділянки промотору. В ядрі *B-I* інші послідовності, розташовані в локусі *b1*, були ідентифіковані, як такі, що здатні взаємодіяти з повторами та промоторною ділянкою. Ці взаємодії були зафіксовані тільки в покривних тканинах, де *b1* експресується. Таким чином, можна передбачити, що парамутація забезпечує певну конформацію хроматину у місці розташування локусу *b1,* що в свою чергу унеможливлює доступ регуляторних білків до сайтів їх зв'язування. Також можливо, що різні групи регуляторних білків здатні взаємодіяти з повторами в ядрах, які характеризуються наявністю алелів *B-I* і *B'*. Білки, які зв'язуються з *B-I,* потенційно можуть опосередковувати взаємодію не тільки з промотором, але і з додатковими регуляторними послідовностями. Ці дані демонструють, що парамутації виникають чітко в ділянці повторів і впливають на їх функції регуляції транскрипції.

Білкові детермінанти парамутацій. Легкість визначення пігментованих фенотипів дозволила ще в ході перших генетичних експериментів визначити гени, продукти яких залучені до парамутаційних процесів. Було проведено два незалежних скринінги у кукурудзи. З використанням системи *b1* вдалося встановити, що до цих процесів причетні низка локусів, які віднесли до групи *mediator of paramutation* (*mop*), тоді як завдяки аналізу в системі *pl1* були ідентифіковані інша група гени - *required to maintain repression* (*rmr*). Продукти усіх виявлених таким способом генів беруть участь у процесах **РНК-залежного транскрипційного генного сайленсинга**. Так, перший з описаних генів, *mop1,* кодує ортолог РНК-залежної РНК-полімерази RDR2 *Arabidopsis*. Мутації *mop1*

упереджують парамутції в багатьох локусах. MOP1 також необхідний для сайленсингу транспозону Mutator. Два інші гени (*rmr6* та *mop1/rmr7)* кодують найбільші субодиниці рослинних РНК-полімераз IV та V. Четвертий ген, *rmr1*, кодує гіпотетичний фактор ремоделювання хроматину родини Snf2.

Роль siRNA у парашутуванні. Оскільки всі ідентифіковані гени, для яких встановлено участь у процесах парамутування, подібні до компонентів сайленсигну за участю siRNA *Arabidopsis*, то було запропоновано механізм парамутування за аналогією з **РНК-залежним метилюванням ДНК** (RNA-dependent DNA methylation). Підтвердженням того, що siRNA залучені в процес парамутування, є те, що повтори у локусі *b1* транскрибуються з обох ланцюгів ДНК з утворенням siRNA.Більше того, в мутантах *mop1* та *mop2/rmr7* рівень цих siRNA значно знижений. Зниженим рівнем siRNA характеризуються також мутації *rmr1* та *rmr6*.

Однак існуючі дані передбачають, що присутності siRNA не достатньо для виникнення парамутації в природних умовах. На противагу RdDM у *Arabidopsis*, за якого спостерігається кореляція між сайленсингом та рівнем siRNA, рівень транскрипції повторів у локусі *b1* однаковий у особин як з *B-I*, так і з *B'* алелями та навіть у особин з алелем *b1-K55*, що містить тільки одну копію повтору. Більше того, рівні відповідних siRNA у *B-I* та *B'* не відрізняється. З цієї причини, можливо, що незважаючи на те, що siRNA є необхідними для парамутації, однієї їх присутності недостатньо.

Додаткові дані було отримано в ході аналізу мутантів *mop2-1*. Мутація *mop2-1* є домінантною по відношенню до наявності парамутації, інакше кажучи — у гетерозиготних рослин *mop2-1/Mop2* парамутація не спостерігається. При цьому зниження сайленсингу забезпечується за рахунок значного зменшення кількості siRNA, синтезованих на повторах у локусі *b1*. Рівень транскрипції повторів у гетерозигот *mop2-1* не змінюється, що показує, що MOP2/RMR7 приймають участь в біогенезі siRNA на більш пізніх етапах. В той же час, встановлений стан сайленсингу у гетерозигот *mop2-1* зберігається незалежно

від зниження рівнів siRNA, а послаблюється він тільки у гомозиготних мутантів. Ці дані демонструють, що **формування та підтримання** парамутацій є різними етапами процесу, хоча MOP2/RMR7, як видається, залучені до обох. Очевидно, що siRNA-залежна активність MOP2/RMR7 має місце під час формування парамутації, але не підтримання відповідного стану. В той час як парамутація виникає на ранніх стадіях розвитку, siRNA в молодих тканинах поки що виявлено не було. Цікаво, що, хоча мутація *mop2-1* домінує по відношенню до парамутацій *b1* та *pl1*, відсутність парамутації в локусі *p1* спостерігається лише за гомозиготного стану *mop2-1*. Більше того, сайленсований епіалель *P1-rr'* не підлягає відновленню, незважаючи на вплив гомозиготних за *mop2-1* трьох попередніх поколінь. Ці результати свідчать, що існують відмінності у парамутаційних процесах в різних локусах.

Продемонстровано, що MOP1 є необхідним для формування парамутації в багатьох досліджених локусах та для підтримання сайленсингу локус-специфічним чином. В локусах *b1* та *pl1* сайленсинг встановлюється відразу в першому поколінні мутантних рослин *mop1-1*. На противагу цьому, сайленсинг в локусі *p1* відбувається з відносно низькою частотою, а повне відновлення експресії потребує впливу на *mop1-1* протягом декількох поколінь. На відміну від *mop2-1,* мутації *mop1-1* є рецесивними по відношенню і до встановлення, і до підтримання парамутаційного стану. Порушення парамутації в генетичному оточенні *mop1-1* характеризується зниженням рівнів відповідних siRNA. Беручи до уваги, що у гетерозиготних мутантів *mop2-1* сайленсинг зберігається незважаючи на зниження концентрації siRNA, не зрозуміло, чи залежить роль MOP1 у підтриманні сайленсингу від siRNA. Епіалель *B',* відновлений на фоні *mop1-1,* зберігає ознаки того, що він був сайленсований у попередніх поколіннях. Повторне введення MOP1 дикого типу шляхом схрещування призводить до негайного відновлення сайленсінгу з частотою, яка була б неможливою при спонтанному рівні парамутацій.

Все вищесказане дозволяє зробити припущення, що siRNA відіграють певну роль в формуванні парамутцій, а для підтримання відповідного стану залучаються додаткові механізми.

Спонтанний парамутаційний процес. Враховуючи той факт, що принаймні в локусі *b1*, наявність siRNA не є достатньою для формування парамутацій, особливий стан хроматину у місцях повторів є обов'язковим фактором для активації siRNA-залежного сайленсингу. Припускають, що у випадку виникнення спонтанних парамутацій, відповідний стан хроматину може встановлюватися шляхом випадкових змін таких факторів, як ДНК-зв'язуючі білки або модифікації хроматину, або може бути наслідком, особливо у місцях повторів, особливого нестійкого хроматинового стану. У якості прикладу можна навести *trans* сайленсинг гена *FWA*, який бере участь у контролі часу цвітіння у *Arabidopsis*. Два стабільні епіалелі гена *FWA* відрізняються один від одного ступенем спорідненості до метилювання ДНК в тандемних повторах промоторної ділянки. Метилювання повторів у епіалелях *FWA* асоційовано з сайленсингом гена *FWA*, наслідком чого є набуття фенотипу раннього цвітіння. Епіалелі *fwa* з неметильованими повторами ектопічно експресують *FWA*, що призводить до набуття фенотипу пізнього цвітіння. Рівень синтезу siRNA з двох епіалелей є однаковим, і, крім того, вони не сприйнятливі до метилювання ДНК *de novo*. На відміну від випадку з парамутаціями, неметильований епіалель не піддається сайленсингу у випадку трансгетерозиготи. Проте, коли повтори вносять в лінії, епіалелі яких є метильованими, трансген ефективно метилюється. Але коли ці ж повтори вносять в лінії з неметильованими *fwa* епіалелями, це призводить тільки до випадкового часткового метилювання ДНК. Це дозволяє припустити, що siRNA-опосередкований сайленсинг залежить від стану хроматину досліджуваного локуса, і що за певних обставин хроматин може змінювати свій стан. Більше того, здається, що передача інформації на хроматин між геномним і трансгенним епіалелями відбувається siRNA-незалежним шляхом. Однак у

випадку парамутацій ми не можемо виключити можливість того, що спонтанні зміни індукуються неконтрольованим “вибухом” синтезу siRNA. Така модель підтверджується тим фактом, що штучно підвищений рівень siRNA з повторів *b1* може призвести до парамутацій. Парамутації у *b1* локусі, як спонтанні, так і індуковані внаслідок присутності парамутагенних епіалелей, мають однакові наслідки. Проте в локусі *r1* спонтанний сайленсинг не є спадковим і не спричиняє формування парамутагенних епіалелів. Це може пояснюватися певними фундаментальними відмінностями в механізмах виникнення парамутацій у цих локусах, або ж формування спонтанних та індукованих парамутацій може відрізнятися своїми механізмами, хоча в *b1* локусі вони і призводять до однакових наслідків. Якщо останнє передбачення має місце, то різницю між локусами *b1* та *r1* можна пояснити особливостями структури локуса *b1,* що супроводжується його більшою сприйнятливістю до парамутацій як таких.

Індукований парамутаційний процес. Враховуючи той факт, що рівень siRNA є однаковим в ядрах *B-I* і *B’*, цілком імовірно, що siRNA-сприйнятливий стан хроматину індукується в парамутантному епіалелі siRNA-незалежним чином. Так, пряма фізична взаємодія між *B-I* та *B’* епіалелями відбувається тільки тимчасово. Така взаємодія може призвести до передачі стану хроматину *B’* на хроматин епіалелю *B-I*, якщо, наприклад, хроматин-модифікуючі ферменти стабільно асоційовані з *B’*. Інша можливість полягає в тому, що епіалель *B’* локалізується в певному ядерному компартменті, де може відбуватися siRNA-залежний сайленсинг. Так, пряма взаємодія між епіалелями може призвести до внутрішньоядерного переміщення ділянки парамутантного епіалелю в такі компартменти. У *Arabidopsis* білкові компоненти siRNA сигнального шляху формують дискретне ядерне оточення. Вважається, що RdDM здатне відбуватися саме в цих так званих ядерних тільцях. Навіть якщо безпосередні фізичні взаємодії між алелями досі не були виявлені, немає і достовірних доказів їх відсутності. Ще одна можливість полягає в тому, що *B-I*

та *B'* характеризуються різною експресією ДНК-зв'язуючих білків, які здатні специфічно взаємодіяти з *b1* повторами. Такі білки продукуються одним з парамутагенних алелів в гетерозиготі і, взаємодіючи з іншим, роблять його сприйнятливим до siRNA-залежного сайленсингу. На сьогодні залишається незрозумілим, як диференційна експресія таких білків може бути досягнута в ізогенних лініях, але вже існуючі дані дозволяють припустити, що такий механізм може існувати: білок CBBP (CXC domain b1-repeat binding protein), який зв'язується з *b1* повторами, напрацьовується в достатній для детекції кількості тільки у *B'* особин. Теоретично, незважаючи на відсутність різниці siRNA в зрілих тканинах *B-I* та *B'* особин, диференційний синтез siRNA повинен активно відбуватися на початкових стадіях розвитку. Виходячи з такої моделі, siRNA є єдиною сигнальною молекулою. Однак, як і у випадку фізичних взаємодій між алелями, про диференційне накопичення siRNA досі не повідомлялось. Аналогію можна провести з дослідженнями на *Arabidopsis*, де пригнічення експресії гена *DDM1*, який кодує фактори ремоделювання хроматину та задіяний в процес метилювання ДНК, пов'язана з підвищенням синтезу siRNA в пилкових рослинних ядрах. Так, siRNA, імовірно, доставляються в гамети, де відбувається активна експресія *DDM1*, для того, щоб рекрутувати білки машинерії RdDM. Проте, парамутації виникають в соматичних клітинах, а не в гаметах. Так, наприклад, слабка пігментація і низький рівень транскрипції локусу *b1* у нащадків F1, які містять парамутагенні та парамутантні епіалелі, свідчить, що сайленсинг відбувається вже після запліднення. Так само, не можна виключити можливість того, що siRNA накопичується у великій кількості у *B'* гаметах та використовується у подальшій модифікації у зиготі *B-I* алеля. На сьогодні залишається невідомим, коли саме відбуваються парамутації. Крім того, у випадку з *r1* локусом, окремі частини однієї рослини можуть характеризуватися різним рівнем його експресії, що помітно у соматичних клітинах. Крім того, парамутації у локусі *r1* можуть бути індуковані у проростках сигналами навколишнього середовища ще до продукування гамет. Слід підкреслити цікавий факт, встановлений в

дослідженні гена *rmr*, який кодує фактор ремоделювання хроматину, задіяний у процесі парамутування. У локусі *pl1* продукт *rmr1* необхідний для підтримки парамутаційно залежного сайленсингу. Незважаючи на скорочення кількості siRNA, мутація у гені *rmr1* не впливає на парамутагенність, що ще раз підтверджує те, що епігенетична інформація може бути передана і siRNA-незалежним чином.

Успадковування набутої інформації. Навіть якщо siRNA є єдиними сигнальними молекулами, які спричиняють парамутації, вже встановлений репресований стан може підтримуватися і без наявності siRNA, що і було показано в дослідженнях з мутаціями *mop2-1* та *mop 1-1*. Як і у випадку з *Arabidopsis*, RdDM приймає участь у процесах метилювання ДНК, посттрансляційних гістонових модифікаціях, регулюванні структури хроматину та у підтримці його репресованого стану. Аналіз структури хроматину показав наявність сайту гіперчутливості ДНКази I в повторах *B-I*. Цей факт узгоджується із нещодавно отриманими результатами, в процесі отримання яких використовувались анти-H3-гістонові антитіла в імунопреципітації хроматину (ChIP). Аналіз розташування нуклеосом на ДНК продемонстрував індукцію експресії *b1* у тканині з алелем *B-I* за умови збіднення цієї ділянки на нуклеосоми. Відповідні відмінності спостерігалися в саджанцях з низьким рівнем транскрипції *b1*. У саджанцях з *B-I*, ChIP сигнал однорідно детектується здовж всього повтору, що свідчить про випадковий розподіл нуклеосом. На відміну від цього, *B'* повтори містять нуклеосоми, які розташовуються у місцях з'єднання між одиницями повторів, що має особливе значення, оскільки є однією з характеристик послідовності у повторюваному регіоні, яка відрізняє *B-I* та *B'* від парамутаційно нейтральних алелів, які несуть тільки одну копію повтору. Чи можна вважати такі позиціоновані нуклеосоми однією з форм епігенетичної пам'яті, яка визначає транскрипційну активність епіалелей, та чи мають вони безпосередній вплив на інші процеси, які призводять до сайленсингу *B'*, залишається незрозумілим, оскільки, незважаючи на низький

рівень експресії *b1* в саджанцях, спостерігається значна різниця в рівнях експресії між *B'* і *B-I*.

Аналіз метилювання ДНК дозволив встановити різницю у його патернах між *B-I* та *B'*. У ядрах *B-I* ділянки повторів залишаються в значній мірі неметильованими, в той час як в *B'* спостерігається збільшення рівня метилювання ДНК, в основному на ділянках з'єднання одиниць повторів в місцях, де до цього виявлені нуклеосоми. Коли обидва епіалелі зустрічаються в гетерозиготі, метилювання ДНК *de novo* індукується в до цього неметильованому алелі *B-I*. У подальшому нещодавно парамутований епіалель поступово набуває подібного до *B'* метилювання. Однак залишається не з'ясованою роль метилювання ДНК у сайленсингу *b1*. У молодих саджанців спостерігається незначне збільшення рівня метилювання ДНК у алелях, які парамутували нещодавно, в той час як транскрипція з *B'* є в кілька разів нижчою, ніж з *B-I* у тій же тканині. Можливо, у молодих саджанцях в епіалелях *B'*, які нещодавно парамутували , сайленсинг є ще не повністю налагодженим. Про це свідчить той факт, що в той час як метилювання ДНК чітко корелює зі зменшенням транскрипційної активності та стабільністю сайленсингу, воно не є первинним наслідком парамутації.

Чи може метилювання ДНК підтримувати сайленсовий стан, якщо він вже встановлений на *B'*, залишається не зрозумілим. У той час як метилювання цитозину в контексті CpG, може бути реалізоване за участі ДНК метилаз, RdDM-індукованому метилюванню асиметричних цитозинів потрібна постійна присутність відповідних siRNA. Так, у RdDM-дефектних мутантних лініях *Arabidopsis* нестача siRNA призводить до втрати метилювання ДНК в цільових послідовностях. У кукурудзи мутація *mop1-1* призводить до відсутності siRNA, які транскрибуються з мобільного елемента *MuDR* (належить до родини *Mutator)*, і, як наслідок, супроводжується зменшенням метилювання ДНК в інвертованих повторах *MuDR* та *Mu* елементів. Якщо метилювання ДНК являє собою спадкову мітку сайленсигу в парамутаціях, то залишається невідомим, яким чином епіалелі можуть відновлюватися у *mop1-1* організмів, здатних

зберігати пам'ять про сайленсинг в попередніх поколіннях, і як сайленсинг може бути підтриманий у випадку гетерозигот *mop2-1/Mop2*, незважаючи на зниження рівня кількості siRNA.

У *Arabidopsis* RdDM, як правило, пов'язане з суттєвим рівнем диметилювання гістона H3 по лізину 9 (H3K9me2). На відміну від цього, значний рівень H3K9me2 на повторах алеля *B'* можна виявити тільки в тканині зрілих лусок, в той час як у саджанцях на *B'* спостерігається дуже низький рівень H3K9me2 і не відрізняється від такого на *B-I*. Ці спостереження вказують на те, що рівень H3K9me2 варіює на *B'* повторах тканиноспецифічно, або його кількість регулюється під час розвитку рослини, не відіграючи жодної ролі у парамутаціях та не виконуючи функції спадкових міток сайленсингу.

Роль ДНК-зв'язуючих білків. Як зазначалося вище, CBBP білок специфічно взаємодіє з *b1* повторами. На відміну від білків, ідентифікованих раніше, CBBP не характеризується подібністю до вже відомих компонентів siRNA гетерохроматинового сайленсового шляху. CBBP належить до невеликої родини білків, які зв'язуються з ДНК та містять у своєму складі CXC-домен. Гомологія між представниками родини обмежується CXC-доменами. Досі відсутня інформація стосовно ортологів CBBP за межами однодольних рослин. З використанням трансгенного підходу було продемонстровано, що в умовах конститутивної експресії CBBP під убіквітиновим промотором у *B-I* епіалеля виникає сайленсований стан. Такий новостворений сайленсованих стан подібний до природного у алеля *B'*, оскільки спадкування та формування парамутацій відбувалось навіть після того, як трансген видаляли. Однак загальна стабільність та парамутагенність у цьому випадку нижчі, ніж такі у *B'*. В той же час рівні мРНК *cbbp* подібні у нетрансгенних рослин *B-I* і *B',* хоча білковий продукт був ідентифікований лише в *B'*, що може пояснюватись пост-транскрипційним сайленсингом білка, що і корелює з вимкненням *b1*. Насправді, незважаючи на наявність високого рівня мРНК у трансгенних рослинах, кількість білка відповідала такій у нетрансгенних *B'*. За рахунок чого

така різниця у накопиченні білка CBBP досягається в ізогенних лініях, залишається невідомим.

CBBP здатний формувати мультимерні комплекси, однак точна стехіометрія цих комплексів залишається невідомою. Враховуючи той факт, що повторювані послідовності ДНК є загальною рисою парамутацій, можна припустити, що мультимеризація повтор-зв'язуючих білків може відігравати важливу роль в цих процесах. Один з можливих механізмів може полягати в тому, що певна структура хроматину залежить від того, як молекули CBBP, які зв’язуються з різними копіями повторів, взаємодіють між собою. І саме такі хроматинові структури потенційно можуть бути сприйнятливі або ні до siRNA-залежного сайленсингу. Згідно з іншим гіпотетичним сценарієм, мультимеризація CBBP може призводити до фізичної взаємодії між алелями. Як було припущено вище, такі взаємодії можуть призводити або до прямого копіювання хроматинового стану, або ж до зв’язку парамутантних алелей зі специфічними ядерними компартментами, де siRNA-залежний механізм може індукувати сайленсинг.

Залишається визначити, чи бере CBBP участь у виникненні парамутацій в інших локусах і чи це відбувається не тільки у кукурудзи. Це важливо тому, що індукування парамутацій не продемонстровано для ортологів CBBP у інших видів. Таким чином, поки що CBBP не можна визнати універсальним білковим фактором формування парамутацій. Однак, він може брати участь в інших механізмах, взаємодіючи з білками, які характеризуються властивостями CBBP, зокрема, здатністю до утворення більш складних мультимерів.

РОЗДІЛ 10. ЗОВНІШНІ ФАКТОРИ ТА МОДУЛЯЦІЯ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Як вже зазначалося, зміни епігенетичних міток пов'язані з розвитком низки захворювань, наприклад, раку, астми, метаболічних порушень та репродуктивних функцій. Такі епігенетичні зміни можуть обумовлюватись як генетичними факторами, так і чинниками навколишнього середовища такими як недоїдання, паління тютюну, впливом полютантів, оксидативного стресу, а також мікроорганізмів, особливо якщо їх вплив спричиняється під час критичних періодів розвитку організму. Таким чином, епігенетичні зміни виступають у ролі посередників, з допомогою яких зовнішні фактори реалізують свій вплив на організм в цілому, та розвиток захворювань зокрема (Таблиця 10.1).

Таблиця 10.1. **Епігенетичні зміни за впливу речовин на розвиток захворювань**

Речовина	**Періол впливу**	**Ген або МГЕ**	**Епігенетичні наслідки**	**Тип тканини або клітин**	**Вік виявлення**	**Функція/ сигнальний шлях**
PAHs	пренатально	*ACSL3*	гіперметилювання	Пуповинні лейкоцити	новонароджений	астма патогенез
BPA	пренатально	*COMT, SULT2A1*	гіперметилювання	печінка	ембріон	Метаболізм ксенобіотиків
	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Плацента, нирки, печінка	ембріон	метаболізм
Кадмій	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Пуповинна кров	4.5 роки	дівчатка: розвиток органів, морфологія, мінералізація; хлопчики: апоптоз
	преконцепційний	*LINE-1*	гіпометилювання	Пуповинна кров	дорослий	Мутабільність
Миш'як	early gestation	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Пуповинна кров	новонароджений	Хлопчики: канцерогенез
	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні	Пуповинна кров	новороджен	Стрес, апоптоз, запалення

			ДНК		ий	
	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Пуповинна кров	новонароджений	Сайти зв'язування транскрипційних факторів
Ртуть	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Пуповинна кров	новонароджений	Імунна система
	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Плацента	новонароджений	Нейроповедінкові сигнальні шляхи
Свинець	пренатально	*Alu, LINE-1*	гіпометилювання	Пуповинні лейкоцити	новонароджений	Мутабільність
Марганець	ембріональний	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Плацента	новонароджений	Ріст плоду, рак, розвиток нервової системи
Нікотин	пренатально	*AluYb8, LINE-1*	гіпометилювання	Клітини буккального епітелію	немовля	Мутабільність
	пренатально	*IGF2*	гіперметилювання	Пуповинні лейкоцити	немовля	Ріст та розвиток
	пренатально	*Sat2*	гіпометилювання	Гранулоцити периферійної крові	дорослий	Мутабільність
	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні ДНК	Пуповинна кров	новонароджений	Розвиток, детоксикація
	пренатально	*MYO1G* *CNTNAP 2*	гіпометилювання гіперметилювання	Кров	підлітковий	Еластичність та міграція клітин, розвиток мозку
	пренатально	*BDNF-6* екзон	гіперметилювання	Кров	підлітковий	Дозрівання нейронів
	пренатально	*AHRR*	гіпометилювання	Кров, плацента, мононуклеарні клітини периферійної крові, клітини буккального епітелію	новонароджений	Ріст та диференціація клітин
	пренатально	*RUNX3*	Різниця в метилюванні	Плацента	новонароджений	Транскрипційні фактори
	перинатально	*miR-16, miR-21, miR-146a*	Зниження експресії	Плацента	новонароджений	Процеси росту та розвитку
Канабіс	пренатально	*DRD2*	Зниження експресії	Вентральний стріатум	ембріон	Дофаміновий рецептор

		opioid-related genes	Порушення регуляції	Різні частини головного мозку	ембріон	Когнітивна та емоційна поведінка
Алкоголь	пренатально	*LINE-1, AluYb8*	Різниця в метилюванні	Плацента	новонароджений	Мутабльність
	пренатально	MWAS	Різниця в метилюванні	Клітини буккального епітелію	дитинство	Глутаматергічні синапсиси, протокатгерини, сигналінг Ніпро

У деяких тканинах новонароджених монозиготних близнюків ідентифіковано выдмынності експресії низки генів, які, імовірно, відображають внутрішньутробні епігенетичні відмінності. Загалом патерн метилювання ДНК особини змінюється з віком. Так було показано, що відмінності в таких патернах зростають з віком у монозиготних близнюків. Генетично ідентичні монозиготні близнюки демонструють деяку епігенетичну дискордантність при народженні, яку можна ідентифікувати у вигляді відмінності експресії певних генів. Від народження до старості у монозиготних близнюків спостерігається накопичення відмінностей у епігеномі, які частково відображають історію умов життя. Крім того, стохастичний дрейф у епігеномі та його наслідки, наприклад, моноалельна експресія певних генів, імовірно, також вносять суттєвий вклад в описані відмінності.

У дослідженнях *in vitro* було показано, що нестача білків у пренатальний період спричиняє гіпометилювання промоторних регіонів генів глюкокортикоїдного репецтору (glucocorticoid receptor; *GR*) та *PPARα* (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) у печінці щурів, яке спостерігалося і у нащадків F2. Такі зміни не відбувалися у випадку додавання у їжу фолієвої кислоти. Також було показано, що надмірне харчування новонароджених щурів призводить до гіперметилювання промотора гену, який сприяє розвитку анорексії (anorexigenic gene). Чи передаються такі зміни нащадкам подальших поколінь, у дослідженні не оцінювалось. ДНК, виділена зі сперми мишей, які підлягали впливу повітря з металургійних заводів, виявилася стійко гіперметильованою ще довго після припинення впливу. Крім того, було продемонстровано, що харчування матері змінює метилювання у окремих

сайтах CpG на ділянці зв'язування ngf1a (nerve growth factor) гену *GR* у гіпокампі нащадків. Така епігенетична модифікація зберігалася і у дорослому віці, впливаючи на відповідь на стрес, і передавалася нащадкам F2.

Виявлено, що чинники навколишнього середовища найбільш суттєво впливають на епігеном в період тотального репрограмування, тобто, протягом ранніх стадій ембріонального розвитку. Крім того, раннє дитинство також є періодом особливої вразливості, особливо у клітинах зародкового шляху жінок, оскільки геном ооцитів залишається у гаплоїдному стані деметильованим, а отже, шкідливі впливи середовища потенційно порушують їх епігенетичний стан протягом багатьох років. Такі впливи можуть мати наслідки як щодо фертильності, так і щодо початкового епігенетичного стану нащадків такої жінки. Також шкідлива дія навколишнього середовища може проявлятися у впливі на метилювання ДНК соматичних клітин дорослих особин, що було продемонстровано при дослідженні старіння та різноманітних захворювань.

Обмінні процеси та споживання поживних речовин. Були продемонстровані епігенетичні зміни гену *Igf2 (Insulin-like growth factor 2)* у людей, які підлягали жорсткому зниженню калорійності їжі протягом так званої Голодної зими у Голандії (1944-1945 рр.). Крім того, було виявлено, що люди, які потерпали від голоду у підлітковому віці або юності, у дорослому віці мають достовірно знижений ризик розвитку колоректального раку, який характеризується підвищенням метилювання CpG-острівців (CpG island methylator phenotype; CIMP), що свідчить про роль впливів на ранніх етапах життя у патогенезі даного захворювання.

Фолати є основним джерелом метильних груп, які використовуються при метилюванні гістонів та ДНК. В одному з досліджень продемонстровано, що фолати можуть впливати на ризик розвитку колоректального раку з CIMP. Проте, у інших подібних дослідженнях такого ефекту не виявлено. Більшість робіт по нестабільності мікросателітних повторів, що характеризуються гіперметилюванням промотору гена *MLH1(MutL homolog 1 E.coli)* та CIMP,

дали такі ж негативні результати. З іншого боку, у деяких дослідженнях був продемонстрований зв'язок між споживанням алкоголю (який руйнує фолати) та ризиком колоректального раку, який був сильнішим у випадках MSI-H (Microsatellite instability high) та CIMP пухлин.

Ще одним напрямком досліджень впливу харчування на епігенетичні процеси є дослідження miRNA. Ідея, що екзогенні miRNA, які споживаються з їжею, можуть епігенетично регулювати експресію генів, з'явилась у зв'язку з нещодавніми дослідженнями, які продемонстрували наявність рослинних miRNA у сироватці крові людини та інших ссавців. Одна з таких рослинних miRNA, а саме MIR168a, яка у мишей може бути тільки рослинного походження, зв'язує кодуючи ділянку послідовності гену ссавців *LDLRAP1(low density lipoprotein receptor adaptor protein 1) in vitro*. Функціональні наслідки для ссавців були продемонстровані експериментально. Зокрема, введення MIR168a *in vitro* та *in vivo* знижувало експресію *LDLRAP1*. Цей напрямок досліджень свідчить, що існує ще один механізм, за участі якого особливості харчування можуть змінювати ризик захворювань людини.

Епігеном та забруднення повітря. Є докази того, що забруднювачі повітря можуть обумовлювати епігенетичні зміни, такі як метилювання ДНК та зміни кількості miRNA. Зокрема в епідеміологічних дослідженнях людини було показано, що контакт з $PM_{2.5}$ (забруднення повітря частинками не більше 2.5 мкм) та PM_{10} пов'язаний з гіпометилюванням мобільних елементів *Alu* та/і LINE1 у лейкоцитах та клітинах букального епітелію. Крім того, такий вплив призводить до змін метилювання ДНК гену *NOS2A (Nitric oxide synthase 2a),* продукт якого залучений у продукування оксиду азоту. Люди, які перебувають у сильно забруднених місцях, які характеризуються високим рівнем PM та озону, демонструють гіперметилювання гену *FOXP3 (Forkhead box P3)* у регуляторних Т-клітинах, тоді як новонароджені, які пренатально зазнавали впливу поліароматичних вуглеводнів (polyaromatic hydrocarbon; PAH) характеризуються гіперметилюванням гена *ACSL3* (*Long-chain-fatty-acid—CoA*

ligase 3) у лейкоцитах пуповинної крові. Слід зазначити, що є дані з приводу ролі обох вказаних генів у розвитку астми. Крім того, вплив поліароматичних вуглеводнів пов'язують з гіперметилюванням мобільних елементів *Alu* та LINE1. Набагато менше свідчень існує з приводу впливу забруднення повітря на зміни експресії miRNA, тому, можливо, що несприятливі ефекти компонентів забруднення повітря проявляються у модифікації алельних варіантів генів, продукти яких залучені у процесинг miRNA.

Епігеном і паління тютюну. Паління матері під час вагітності пов'язують зі зниженням метилювання низки послідовностей, які повторюються, включаючи Sat2 (satellite 2), *Alu* та *LINE1* у дітей, гомозиготних за нуль-мутацією гену *GSTM1 (Glutathione S-transferase Mu 1)*. Паління матері також пов'язують з підвищенням рівня метилювання ДНК у певних генах, таких як *AXL* (від грецького «anexelekto» - неконтрольований), *PTPRO (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta)* та *IGF2*. У дорослих пацієнтів, хворих на рак легень, кількість та тривалість активного паління, а також пасивне паління, пов'язані з підвищенням рівня метилювання ДНК генів *p16, MGMT (O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase)* та *DAPK (Death-associated protein kinase).* Паління тютюну також асоційоване зі змінами метилювання ДНК у клітинах пухлин плоскоклітинної карциноми стравоходу (esophageal squamous cell carcinoma). Крім того, встановлено достовірне збільшення частоти аномального гіперметилювання ДНК у клітинах раку простати та шлунку та у пацієнтів з підвищеним ризиком колоректального раку. Ген *F2RL3 (Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3)* гіпометильований у людей, які палять, що, як припускається, може призводити до підвищеного ризику смертності курців від серцево-судинних захворювань.

Епігеном та оксидативний стрес. Активні форми кисню відіграють важливу роль у низці клітинних процесів, а саме в окиснювально-відновних реакціях, імунній відповіді, сигнальних шляхах, процесах ремоделювання

хроматину та експресії генів. Вони можуть потенційно впливати і на епігенетичні процеси. Зокрема, було показано, що активні форми кисню інгібують зв'язування білка MeCP2, який є важливим епігенетичним регулятором та рекрутує цитозин-метил трансферази та гістон-деацетилази на ДНК. Багато факторів навколишнього середовища можуть генерувати активні форми кисню, а отже, потенційно впливати на епігенетичні процеси через механізми оксидативного стресу.

Епігеном та важкі метали. Вплив свинцю в пренатальний період пов'язують зі зниженням рівня метилювання ДНК повторів *LINE1* та *Alu* у пуповинній крові, подібного до такого у літніх людей. Дослідження на людині показали, що миш'як призводить як до глобального гіперметилюванням, так і до глобального гіпометилювання у мононуклеарних клітинах периферійної крові в залежності від дози. Крім того, він обумовлює гіперметилювання деяких генів, таких як *CDKN2A (Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A), RASSF1A* (*Ras association domain-containing protein 1*) та *PRSS3 (Protease, serine, 3),* порушення в яких призводять до формування різних захворювань, в тому числі онкопатологій. Наявність зважених у повітрі часток свинцю, кадмію та хрому пов'язана з експресією miRNA у периферийній крові, а концентрація нікелю та миш'яку у повітрі позитивно корелює з H3K4me3 та H3K9ac у лейкоцитах. Люди, які працюють на шкідливому виробництві, зокрема з нікелем, характеризуються підвищеним рівнем H3K4me3 та зниженим H3K9me2 у клітинах периферійної крові. Кадмій може спричиняти підвищення експресії генів ДНК-метилтрансфераз *DNMT1* та *DNMT3A* у фібробластах легень ембріонів людини. Крім того, вплив кадмію призводить до гіперметилювання і відповідно сайленсингу генів *MSH2 (MutS protein homolog 2), ERCC1 (Excision repair cross-complementation group 1), XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1)* та *OGG1 (8-Oxoguanine glycosylase 1)* у бронхіальних епітеліальних клітинах людини.

Епігеном та органічні сполуки. Працівники бензозаправок та поліцейські, які професійно піддаються впливу низьких рівнів бензолу, мають достовірно нижчий рівень метилювання елементів *LINE1* та *Alu*, гіперметилювання *p15* та *MAGE-1* (*Melanoma-associated antigen 1*) у крові.

Навколишнє середовище, епігенетичні та генетичні чинники. Слід зазначити, що більшість робіт по дослідженню ефектів факторів навколишнього середовища на епігеном не враховує здатності генетичної складової модифікувати цей зв'язок. Проте, нещодавно було проведено дослідження саме у цьому напрямку, а саме вивчено внесок генетичних та епігенетичних факторів у зміни такого показника, як рівень оксиду азоту під час видиху. Вимірювання даного показника надає можливість зведеної оцінки активності *in vivo* індуцибельної синтази оксиду азоту (inducible nitric oxide synthase; iNOS). Таким чином було встановлено взаємозв'язок між ефектами елементів забруднення повітря PM2.5, гаплотипів промотору гену *NOS2A* та метилювання промоторних гаплотипів генів *NOS2A* та *NOS2*, які кодують iNOS.

Отже, **епігенетичні процеси можуть бути посередниками** між факторами навколишнього середовища та організмом, включаючи формування захворювань, оскільки: 1) певні фактори викликають помірні зміни епігеному; 2) новий епігенетичний стан може зберігатися після припинення дії фактору, що його спричинив; 3) зміни фенотипу пов'язані зі змінами епігеному після дії цього фактору середовища. Крім того, слід відмітити, що зміни епігенетичних міток, обумовлені впливами навколишнього середовища, можуть відбуватися у клітинах зародкового шляху та іноді передаватися нащадкам (трансгенераційна спадковість).

РОЗДІЛ 11. ПРОГРАМУВАННЯ ФЕНОТИПУ У РАННЬОМУ ОНТОГЕНЕЗІ

Розвиток організму - це динамічний процес, який залежить від взаємодії між генами і факторами навколишнього середовища. В організмі ця взаємодія реалізується через вплив на диференціацію клітин. Хоча розвиток, безумовно, залежить від роботи конкретних генів, регуляція їх активації та репресії є не менш важливим аспектом. Таким чином, специфічні тканинні фенотипи виникають у результаті функціонування генних каскадів в конкретних умовах впливу певних чинників (наприклад, харчування), які регулюють транскрипцію генів.

Відомо багато факторів, які можуть змінити активність генів під час розвитку, однак епігенетичні механізми виступають в якості посередників в процесі динамічної взаємодії між генами і навколишнім середовищем. Епігенетичні модифікації все частіше досліджуються в контексті розвитку і можуть бути досить консервативним механізмом формування фенотипів у особин різних видів і навіть таксонів. Крім того, з'являється все більше доказів того, що умови проходження ранніх стадій життєвого циклу можуть обумовлювати певні епігенетичні зміни, і, таким чином, служити в якості механізму пластичності розвитку. Нові дані щодо регулювання певними чинниками оточення стабільності і потенційного успадковування епігенетичної мінливості спричиняють виникнення нових інтригуючих питань щодо ролі епігенетики в розвитку. Чи являє собою епігенетична мінливість молекулярну стратегію (білок-білкові, ДНК-білкові та ферментативні реакції), яка впливає на процеси розвитку, і відповідно, забезпечує пластичність у відповідь на стан навколишнього середовища? Такі епігенетичні механізми характерні для багатьох видів і таксонів. Спадковість епігенетичної мінливості може також бути важливою в контексті концепції універсальності (тобто, як потенційний механізм, який генерує подібність між предками і нащадками), проте в даний час роль епігенетики в спадковості і еволюції є темами, які потребують подальших досліджень.

Розвиток та зміни рівнів метилювання ДНК

Останнім часом роль метилювання ДНК у розвитку представників різних видів і таксонів стає все більш очевидною. У мишей спострігаються дуже високі рівні 5mC в геномі, а період після запліднення характеризується глобальним деметилюваннням з подальшим постімплантаційним тканинноспецифічним підвищенням рівня 5mC (**репрограмування геному**). У багатьох видів ссавців, включаючи свиней, щурів та людину, рівень метилювання ДНК в чоловічому пронуклеусі знижується після запліднення. Тим не менше, важливо зазначити, що динаміка метилювання-деметилювання у пронуклеусі не є повністю консервативною у ссавців, і, наприклад, деметилювання ДНК у батьківському пронуклеусі овець та кролів може не відбуватися. Так само і у жаб (Xenopus) ідентифікуються високі рівні метилювання ДНК протягом усього періоду після запліднення і на початку розвитку зародку. Незважаючи на відсутність консервативності часової динаміки системи метилювання ДНК, очевидно, що ця епігенетична модифікація є характерною рисою ссавців, а також наявна у рослин та комах**.**

Як вказано вище, динамічні зміни патерну метилювання ДНК спостерігаються у низки видів у ранньому ембріональному розвитку. Однак ключове питання полягає в тому, чи може патерн метилювання ДНК змінюватись у відповідь на вплив факторів навколишнього середовища. Цікаво, що вже у ранніх дослідженнях було встановлено, що метилювання ДНК може відбутися у відповідь на вплив гормонів та інших клітинних сигналів. Порівняння ембріонального метилювання ДНК, отриманої у жінок з суперовуляцією (стимуляція збільшення кількості ооцитів під дією гонадотропінів) і жінок без суперовуляції, показало, що суперовуляція може викликати порушення ходу метилювання ДНК. Використання запліднення *in vitro* (IVF - *in vitro* fertilization) аналогічним чином дозволило встановити, що зміни в ембріональному метилюванні ДНК залежать від типу середовища, яке використовуєтья для інкубації сперми і ооцитів. Подальше вивчення цих

ефектів показало, що патерн метилювання ДНК в імпринтованих генах особливо чутливий до впливу суперовуляції, і порушення в ньому можуть призводити до хвороб геномного імпринтингу (наприклад, синдромів Ангельмана та Прадера-Віллі) у осіб, зачатих за допомогою штучних репродуктивних технологій.

Метилювання ДНК може бути відповіддю на гормональні і клітинні впливи на початку ембріогенезу. Тому важливо враховувати пластичність метилювання ДНК під час ембріонального і постнатального розвитку. Існує все більше доказів епігенетичних змін у відповідь на токсикологічні, гормональні, соціальні та інші впливи навколишнього середовища. Наприклад, вплив так званого ендокринного дезінтегратора бісфенолу-А (bisphenol-A) в пренатальний період може викликати зміни патернів метилювання ДНК у мозку мишей та клітинах людини. Епігенетичні ефекти у відповідь на вплив бісфенолу-А також можна спостерігати у новонароджених щурів.

Епігенетична пластичність може спостерігатися і у зрілому віці. Наприклад, зміни рівня тестостерону у дорослих щурів супроводжуються змінами метилювання ДНК генів вазопресину (*AVP; arginine vasopressin*) і рецептора естрогену (*ERA; estrogen receptor α*) у нейронах. Вплив соціального стресу пов'язаний зі зниженням метилювання гена *CRF (corticotrophin releasing factor*) в тканині гіпоталамуса мишей. Навіть процес навчання, який супроводжується пластичністю мозку впродовж всього життя пов'язаний зі змінами метилювання ДНК. Ці епігенетичні зміни вважаються «фіксацією» досвіду, який набувається протягом усього життя. Отже, фенотипові особливості людини (розвиток нервової системи, ризик виникнення захворювання, поведінка) можуть формуватися за участі метилювання ДНК. Прикметно, що у монозиготних близнюків спостерігаються відмінності у патернах метилювання ДНК, і з часом ці розбіжності посилюються.

Епігенетика і пренатальне харчування

Пренатальне і постнатальне харчування можуть виступати у якості сигналів навколишнього середовища. Виявлено, що епігенетичні профілі значною мірою залежать від кількісного і якісного складу їжі на ранніх стадіях життя.

Пренатальне харчування і ризик майбутніх захворювань. Взаємозв'язок між якістю середовища на ранніх періодах життя та майбутнім ризиком захворювань дорослих людей був вперше описаний у 1977 році Форсделом (Forsdahl). Він виявив, що у популяції рівень смертності немовлят позитивно корелює з підвищеним ризиком серцево-судинних захворювань у середньому віці. Наступні дослідження у Великобританії показали зворотній зв'язок між вагою при народженні та підвищеною смертністю від серцево-судинних захворювань. Численні епідеміологічні дослідження підтвердили такий результат: низька вага при народженні пов'язана з підвищеним ризиком формування як серцево-судинних захворювань, так і ожиріння, гіпертонії та діабету 2 типу. Проте у всіх дослідженнях вказувалось, що вага при народженні є дуже грубим показником внутрішньоутробного середовища, який може бути відображенням сукупної дії багатьох чинників, а саме материнських, середовищних та плацентарних факторів.

Вплив безпосередньо харчування на ранніх етапах життя на можливе формування хвороби у дорослому віці було найчіткіше показано у дослідженнях, пов'язаних з наслідками Голодної зими 1944 року у Нідерландах. У цих роботах було показано, що люди, матері яких зазнали голоду періконцептуально (до і після запліднення) та у перший триместр вагітності, не характеризувалися зниженням ваги при народженні у порівнянні з дітьми, матері яких голоду не зазнавали. Проте такі люди у дорослому віці демонстрували підвищений ризик ожиріння та розвитку серцево-судинних захворювань. В той же час, люди, матері яких голодували на більш пізніх строках вагітності, характеризувалися зниженою вагою при народженні та підвищенням резистентності до інсуліну та гіпертонії. Проте не тільки

недостатнє харчування, яке має довготривалі фенотипові ефекти, а і надмірне пренатальне харчування також пов’язане з підвищенням ризику розвитку метаболічних захворювань.

Отримані епідеміологічні дані були підтверджені численними дослідженнями на різних тваринних моделях, зокрема, при утриманні щурів чи мишей при загальному обмеженні харчування, або на ізокалорійній дієті з низьким вмістом білка чи, навпаки, з високим вмістом жирів під час вагітності та/або лактації. Цікаво, що нащадки, народжені від самок, яких утримували на таких дієтах, демонстрували фенотипічні відхилення віл норми, подібні до таких у людей, а саме серцево-судинні та метаболічні захворювання, включаючи ожиріння, нечутливість до інсуліну, гіпертонію та підвищення рівнів холестерину в крові. Наприклад, годування щурів їжею з обмеженим вмістом білку під час вагітності призводить до порушень гомеостазу глюкози, судинної дисфункції, імунологічних розладів, підвищеної чутливості до оксидативного стресу, відкладання жирів та впливає на харчову поведінку. Індукція на ранніх етапах ембріогенезу довготривалих змін фізіології шляхом зміни дієти матері означає індукцію довготривалих змін експресії генів у нащадків, що у свою чергу призводить до зміни активності метаболічних шляхів та процесів контролю гомеостазу. Так, у нащадків самок щурів, яких утримували на дієті зі зниженим вмістом білку під час вагітності, спостерігалося підвищення експресії генів глюкокортикоїдного рецептора (glucocorticoid receptor, GR) та рецептора, що активує проліферацію пероксисом (peroxisomal proliferator-activated receptor, PPAR) у печінці, пов'язане зі зниженням метилювання їх ДНК.

Для дослідження феномену збільшення кількості серцево-судинних захворювань у світі та проблем з особливостями «вестернізованого» стилю харчування, використовуються тваринні моделі з надмірним харчуванням у період вагітності. Так, утримання самок щурів на дієті, яка збільшує схильність до ожиріння, перед спарюванням та під час лактації, призводить як до ожиріння

матері, так і до ожиріння та гіперфагії, зниження маси м'язів, зниження локомоторної активності та прискореного статевого дозрівання нащадків.

Крім того, на тваринних моделях було продемонстровано важливість особливостей харчування батька. Так, було показано, що нащадки самців, які утримувались на дієті з низьким вмістом білків, характеризуються підвищеним рівнем експресії у печінці багатьох генів, які залучені у процеси біосинтезу ліпідів та холестеролу, та зниженим рівнем естерів холестеролу. У таких тварин також змінені рівні низки miRNA (miRNA 21, let-7, mir-199, mir98 та mir210). Крім того, було показано, що дієта батька з високим вмістом жирів призводить до підвищеної маси тіла, ожиріння, порушення толерантності до глюкози та чутливості до інсуліна у нащадків-самиць. Виявлено, що такі особливості харчування батька змінюють експресію 642 генів, що залучені у процеси зв'язування катіонів та АТФ, формування цитоскелету та внутрішньоклітинний транспорт, у панкреатичних острівцях дорослих самиць-нащадків.

Харчування і епігенетичні зміни. У недавньому дослідженні Хейманса (Heijmans) з співавт. виявлено, що люди, чий ранній внутрішньоутробний розвиток проходив на тлі голоду в Голландії, через 60 років мають істотно знижений рівень метилювання гена інсуліноподібного фактора 2 (IGF2) у порівнянні з їх однолітками з регіонів, які не зазнали голоду. Зміни в характері метилювання пізніше були виявлені і для низки інших генів, які відіграють важливу роль у розвитку метаболічних і серцево-судинних захворювань. У людей, народжених матерями, які голодували, був достовірно знижений рівень метилювання гена *INSIGF* (*Insulin-insulin-like growth factor*), і підвищений – генів *IL10 (Interleukin-10), LEP* (*leptin), ABCA1 (ATP-binding cassette transporter), GNASAS* (*GNAS antisense RNA*), експресія якого відбувається тільки з алеля, успадкованого від батька, і *MEG3* (maternally expressed 3), експресія якого відбувається тільки з алеля, успадкованого від матері.

Показано, що з рівнем метилювання ДНК прямо корелює доступність певних мікроелементів і вітамінів, залучених у **1-вуглецевий метаболізм**

(таких як фолати, метіонін, холін і вітамін B12), які є основними донорами метильних груп і ко-факторами, залученими в процес метилювання. Виявлено, що дієта з недостатньою кількістю **фолатів** призводить до геномної нестабільності і гіпометилювання ДНК. Дефіцит в їжі фолату і метіоніну може призвести до змін в імпринтингу гену *IGF2*.

Уотерланд і Джіртл (Waterland and Jirtle) вперше продемонстрували, що додавання донорів метильних груп в корм самок мишей агуті до та протягом вагітності, а також безпосередньо після пологів, збільшує рівень метилювання ДНК метастабільного епіалеля *Avy* (*viable yellow agouti*), що відповідає за жовте забарвлення їх шерсті. Внаслідок цього колір шерсті у новонароджених мишенят ставав таким же, як у мишей дикого типу – бурим. Ці ж дослідники надалі виявили у мишей при додаванні в корм донорів метильних груп епігенетичну пластичність іншого метастабільного епіалеля, *AxinFu*. Періоди чутливості обмежувалися не тільки раннім ембріогенезом, але поширювалися і на середньо-гестаційну стадію.

У низці популяційних досліджень продемонстрована кореляція між вмістом в їжі фолатів і схильністю до коронарних захворювань серця і раку у людей. Пацієнти з атеросклеротичними ураженнями судин часто мають підвищений рівень гомоцистеїну і S-аденозілгомоцистеїну та знижений рівень метилювання ДНК. Низький рівень фолатів призводить до гіпергомоцистеїнемії, яка пригнічує активність ключових інгібіторів метаболізму 1-вуглецю. У людей з мутаціями гена метилентетрагідрофолат редуктази (methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR), який відіграє ключову роль в метилюванні ДНК, спостерігається нижча концентрація фолатів у крові у порівнянні з особинами без таких мутацій. Це дослідження продемонструвало взаємозв'язок між епігенетичними факторами, пов'язаними з особливостями харчування, і генетичною схильністю до модуляції генетичної експресії.

Особливості харчування західної цивілізації полягають у тому числі у вживанні великої кількості **жиро- і цукровмісних продуктів**. Відомо, що багате жирами харчування протягом вагітності може спричинити збільшення

рівня естрогенів у вагітної, що в свою чергу підвищує ризик виникнення раку грудей у нащадків жіночої статі. Наприклад, у щурів Sprague-Dawley в ході нормального старіння відбувається прогресивне гіперметилювання і, відповідно, зниження транскрипційної активності гена естрогенового рецептора в клітинах молочної залози, що може бути захисним механізмом, який перешкоджає клітинній проліферації і канцерогенезу. Однак годування вагітних самок їжею з великим вмістом жирів призводить до гіпометилювання промотора естрогенового рецептора і відповідно підвищення його експресії в молочних залозах їх нащадків, що обумовлює підвищення схильності до раку грудей.

Продемонстровано, що ризик розвитку цукрового діабету 2 типу у нащадка залежить від рівня глюкози у крові матері під час вагітності. Так, ризик суттєво вищий у випадку захворювання матері на цукровий діабет. Висловлено припущення, що ці процеси залежать від епігенетичної «пам'яті», яка може зберігатися в ряді клітинних поколінь. Зокрема, різні патерни метилювання ДНК були виявлені в промоторах генів, залучених в метаболізм глюкози.

Нещодавно в низці досліджень були отримані докази позитивного впливу на здоров'я **ізофлавоноїдів** (відносяться до класу фітоестрогенів), які містяться у багатьох харчових продуктах, особливо отриманих із сої. Вплив цих речовин реалізується як через естрогенові рецептори, так і інші механізми. Передбачається, що фітоестрогени можуть бути ефективним засобом протидії деяким захворюванням, зокрема, естроген-залежним видам раку, остеопорозу і серцево-судинним патологіям. Показано, що додавання в їжу фітоестрогенів, особливо під час раннього розвитку, може призводити до антиканцерогенних ефектів щодо деяких гормонозалежних видів раку. Так, наслідком додавання в корм щурів фітоестрогенів еквола і куместрола стало гіперметилювання (і, відповідно, репресія) протоонкогена *cH-ras* в підшлунковій залозі тварин. Додавання геністейна (естрогеноподібного поліфенолу, який міститься в сої) в корм вагітним самкам призвело до зміни кольору шерсті, а також знизило ризик ожиріння у нащадків мишей агуті. Ці виражені фенотипові зміни були

асоційовані зі збільшеним рівнем метилювання шести цитозин-гуанінових сайтів ретротранспозону, який впливає на транскрипційний статус гена, який відповідає за фенотип агуті. Крім того, додавання в корм геністейна протягом неонатального розвитку мишей призвело до формування суттєвих відхилень в репродуктивній системі самок. Виявлено, що додавання в їжу дорослим щурам геністейна призводить до гіперметилювання послідовностей певних генів в простаті щурів. Результати великої кількості робіт засвідчують зв'язок вживання геністейна зі зниженням репродуктивної здатності жінок, зменшеним ризиком раку і гальмуванням процесу накопичення жиру. Передбачається, що геністейн може впливати на рівень метилювання ДНК певних генів, включаючи деякі онкосупресори. Висловлено припущення, що саме підвищений рівень геністейна в дієті, збагаченої продуктами, отриманими з сої, визначає відомий феномен більш низької схильності жителів Азії до онкозахворювань, а також збільшення поширеності раку серед азійських імігрантів до США.

Іншим природним компонентом, який має виражений модулюючий вплив на метилювання ДНК, є **поліфенол епігаллокатехін-3-галлат** (EGCG), який міститься в зеленому чаї. Виявлено, що EGCG інгібує ДНК-метилтрансферазу і реактивує специфічні гени, пов'язані з розвитком раку простати і товстої кишки в клітинних лініях людини. На думку дослідників, деякі компоненти їжі можуть також впливати на епігеном опосередковано внаслідок певних модифікацій гістонів хроматину.

У багатьох епідеміологічних дослідженнях отримані підтвердження того, що індуковані харчовими факторами епігенетичні зміни можуть передаватися наступним поколінням. В експериментах на модельних організмах активно вивчаються епігенетичні механізми, які лежать в основі подібних трансгенераціонних ефектів. Так, показано, що обмеження білкового компонента в раціоні матерів-щурів протягом вагітності призводить до того, що у їхніх нащадків протягом кількох поколінь відбувається деметилювання промоторів генів, асоційованих з метаболізмом глюкози в печінці, нирках і легенях.

У соціальних комах на ранніх стадіях розвитку зміна складу поживного середовища може призводити до морфологічних змін, пов'язаних з кастовими фенотипами. Бджоли мають функціональні ДНК-метилтрансферази, а ступінь метилювання генома змінюється в ході їх розвитку. У самок бджіл належність до соціальної або репродуктивної касти визначається шляхом раннього впливу на них маточного молочка (збільшення кількості маточного молочка призводить до розвитку бджолиних маток, а зменшення його кількості - робочих самок). Дослідження експресії ДНК-метилтрансферази DNMT3 у медоносної бджоли засвідчили, що метилювання ДНК важливе для визначення конкретного фенотипу. У нормальних умовах 75% личинок розвиваються у робочих бджіл, тоді як інгібування DNMT3 призводить до збільшення кількості личинок, які в подальшому дають бджолиних маток.

Викладені вище факти свідчать про важливу роль метилювання у розвитку представників різних видів, а також про те, що стабільність епігенома можливо підтримувати за допомогою певних дієтичних комбінацій.

Епігенетика і стреси раннього життя

Стреси, яких зазнає особина на ранніх етапах розвитку, можуть мати вплив на її мозок, фізіологію і поведінку. У людини дослідження наслідків незадовільного стану матері під час вагітності все частіше включають епігенетичну складову. Підвищення метилювання гену GR (глюкокортикоїдний рецептор, через який діють глюкокортикоїдні гормони, є однією зі складових відповіді організму на стрес) у клітинах ембріональної крові пуповини спостерігається за умов материнської депресії під час вагітності, та ідентифікується у грудних дітей 3-місячного віку. У підлітків 10-19 років, народжених жінками, які зазнали насильства з боку інтимного партнера під час вагітності, спостерігаються підвищені рівні метилювання гену GR у крові.

У щурів потомство, народжене самками, які зазнали стресу за типом «ефекту свідка» під час вагітності (в рамках спільного утримання з самкою, яка зазнала стресу), характеризується глобальним підвищенням рівнів ДНК-метилювання в клітинах кори і гіпокампу мозку. У самців, народжених від

мишей, які протягом вагітності перебували в умовах постійного стресу, встановлено зниження метилювання ДНК промотора гена *CRF* (*Corticotropin-releasing factor*) і збільшення метилювання промоторної області гена *GR* в тканині гіпоталамуса. Вказані молекулярні варіації свідчать про зміни в експресії генів та підвищення стрес-чутливості у нащадків.

В постнатальному періоді чутливість до стресу та несприятливих умов, таких як ризик насильства, відсутність піклування чи сирітство, можуть мати величезний вплив на розвиток дитини. ДНК людського мозку зберігає історію жорстокого поводження в дитинстві у вигляді підвищеного рівня метилювання гену *GR* і, відповідно, зниженої його експресії у гіпокампі. У макак-резус рівень метилювання ДНК гену транспортера серотоніну (serotonin transporter; *SERT* або *5-HTT*) збільшується в клітинах периферійної крові у випадку відлучення від матері. Ця епігенетична зміна, як було встановлено, пов'язана зі зниженням експресії гена *5-HTT* і поведінковою гіперреактивністю дітей, які були позбавлені матерів. У щурів агресивність прийомної матері може викликати довгострокове підвищення рівня метилювання ДНК гена нейротрофічного фактора мозку (brain derived neurotrophic factor; *BDNF*) в префронтальній зоні кори головного мозку, що призводить до зниження його експресії, тим самим збільшуючи імовірність їх депресивної поведінки. У дослідженнях з відлученням потомства від матерів було продемонстровано, що чутливість до стресу прямо залежить від рівня метилювання гена *AVP* в тканині гіпоталамуса.

Чинники оточення можуть призводити до змін не тільки на рівні метилювання ДНК, а й на рівні **малих некодуючих РНК** (small non-coding RNA; sncRNA). Зокрема, відомо, що sncRNA присутні у зрілій спермі ссавців і тим самим можуть брати участь у трансгенераційній спадковості. Так, у мишей було проаналізовано залучення sncRNA у формування наслідків травматичного стресу на ранніх етапах життя. Для цього було використано модель «непередбачуваного відлучення матері разом з непередбачуваним материнським стресом» (a mouse model of unpredictable maternal separation combined with unpredictable maternal stress; MSUS). Самок MSUS відлучають від

мишенят в різні моменти часу один раз на день протягом двох тижнів. Така дія травмує мишенят, а самок також піддають у цей період стресу, наприклад, утримуючи у вузькій пробірці. У дорослому віці MSUS мишенята частіше ідуть на ризик, ніж тварини з контрольної групи. Крім того, вони демонструють зміни метаболізму глюкози, що вказує на те, що травми на ранніх етапах життя спричиняють поведінкові та метаболічні зміни. Цікаво, що описані поведінкові та метаболічні особливості успадковувались у схрещуваннях мишей MSUS з контрольною групою. Було виявлено зміни експресії деяких sncRNA у спермі мишей MSUS у порівнянні з контрольною групою. Зокрема спостерігалося підвищення кількості miR-375-3p, miR-375-5p, miR-200b-3p, miR-672-5p та miR-466-5p у спермі мишей MSUS. Крім того, зміни експресії miRNA спостерігалися і у сироватці крові та структурах головного мозку, відповідальних за відповідь на стрес, а саме у гіпокампі та гіпоталамусі. Більше того, такі зміни експресії детектуються і у сироватці крові та гіпокампі нащадків мишей MSUS, а у спермі відсутні. Рівні експресії miRNA у F3 мишей MSUS були нормальними, незважаючи на схожий на F1 та F2 фенотип таких особин. Імовірно, це пояснюється тим, що зміни експресії miRNA спричинили зміни інших епігенетичних модифікацій (метилювання ДНК чи модифікацій гістонів). Крім того, у даному дослідженні було продемонстровано, що ін’єкції miRNA, виділених зі сперми мишей MSUS, у запліднені яйцеклітини нормальних самок призводять до формування характерних для перших поведінкових рис у дорослих особин, що підтверджує роль саме miRNA у відповіді на стрес раннього життя.

Таким чином, як і у випадку з якістю харчування, епігенетичні механізми, очевидно, відіграють важливу роль у визначенні фенотипу в залежності від наявності стресу на ранніх етапах розвитку.

Епігенетика і соціальний досвід на початку життя

У ссавців умови існування на початку життя визначаються характером і частотою соціальних взаємодій "мати-дитина". Наявні дані з приводу того, що

особливості цих взаємодій можуть мати довгострокові епігенетичні і нейроповедінкові наслідки. Показовими є дослідження, які були проведені на щурах. Виявлено, що материнський поведінковий патерн вилизування та догляду (licking/grooming; LG) щурят призводить до довгострокових змін у нейроендокринній функції і поведінці нащадків, зокрема, особливостей реагування на стрес та пізнавальної поведінки. Дослідження із заміною матерів підтвердили, що ці ефекти опосередковані рівнем материнської турботи, отриманої в ході постнатального розвитку. Аналіз промоторної області гена *GR* дозволяє припустити, що зміни в його експресії, асоційовані з диференціальними рівнями материнської турботи, підтримуються за допомогою зміни рівнів метилювання ДНК. Таким чином, у потомства за умов високого рівня материнської LG в ранньому постнатальному періоді знижується метилювання промоторної ДНК гена *GR* у гіпокампі, що підвищує його експресію і знижує чутливість до стресу. Низький рівень LG призводить до підвищення метилювання цієї ж ділянки гена *GR*, зниження його експресії і підвищення гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової реакції на стрес. Описані епігенетичні мітки з'являються невдовзі після народження і зберігаються у зрілому віці. Виражене LG також збільшує метилювання в гені *GAD1* (glutamic acid decarboxylase gene) в тканині гіпокампу самців, призводячи до зниження рівня його експресії та погіршення функціонування механізмів, пов'язаних з GABA (gamma-aminobutyric acid) у нейронах. Якщо особини жіночої статі зазнають слабких проявів LG з боку матерів, то це призводить до підвищення метилювання гена рецептора естрогена *ERα* (Estrogen receptor alpha) в медіальній преоптичній області гіпоталамуса і, як наслідок, вони проявляють низький рівень LG при догляді за власними нащадками. Ці індуковані матір'ю епігенетичні ефекти у самок можуть бути причиною трансгенераційної передачі материнської поведінки, яка проявляється на нейробіологичному та поведінковому рівнях.

Хоча дуже важко отримати причинно-наслідкові докази впливу досвіду раннього життя на метилювання ДНК у людини через етичні проблеми,

пов'язані з такими дослідженнями, все ж можливо визначити зв'язок певних варіацій метилювання ДНК з особливостями раннього досвіду. Так, було проаналізовано стан метилювання промоторів генів *rRNA* та глюкокортикоїдного рецептору *NR3C1* (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1; також відомий як *GR*) в гіпокампі у групи жертв суїциду у Квебеці, які зазнали насильства у дитинстві, та контрольній групі. Як відомо, рибосомні РНК формують скелет рибосоми і метилювання ДНК відіграє ключову роль у регуляції їх експресії. У даному дослідженні було показано, що у людей, які зазнали насильства у дитинстві, а у подальшому скоїли суїцид, спостерігається збільшений у порівнянні з контрольною групою загальний рівень метилювання ДНК генів *rRNA* та знижений рівень відповідних РНК у певних відділах головного мозку. Крім того, було виявлено сайт-специфічні особливості метилювання промотору гену *NR3C1,* на які впливає материнська поведінка у щурів, а також різницю експресії даного гену у людей, які здійснили суїцид та потерпали від соціальних утисків на ранніх етапах життя, та осіб, які здійснили суїцид і не зазнавали соціальних проблем у дитинстві. Епігенетична модуляція інших генів-кандидатів також відмічена у випадку суїциду, а саме, промотору *gamma-aminobutyric acid A receptor alpha 1* subunit (*GABRA1*) у фронтополярному кортексі та *tropomyosinrelated kinase B* (*TRKB*) у фронтальному кортексі.

Описані вище дослідження стосувалися епігенетичних змін певних генів у відповідь на певний досвід раннього життя, хоча такий вплив стосується багатьох фенотипових ознак, а отже, епігенетичні зміни можуть стосуватися всього епігеному. І дійсно, дослідження у цьому напрямку показали, що вплив негараздів у ранньому періоді життя на епігеном є загальним, включає багато систем та не обмежується клітинами мозку. Природні варіації материнської турботи у щурів асоційовані з певними змінами структури хроматину, метилювання ДНК, а отже, експресії генів, які відбуваються на ділянках більше 100 кб. Найбільш виражену відповідь на зміни патерну материнської турботи демонструє ділянка хромосоми, яка містить кластер родини генів

PROTOCADHERIN α, -β та -γ (Pcdh), які залучені до синаптогенезу. Було також показано, що подібна відповідь на насильство в дитинстві асоційована з різницею метилювання ДНК у ділянці геному довжиною 6.5 млн пн. у гіпокампі людей, у середині якої розташовується ген *NR3C1*. Пов’язані з особливостями виховання у ранньому житті зміни метилювання ДНК, подібні до таких у щурів та людини, виявилися поширеними і в геномі макаки-резус. Подібні зміни не обмежуються головним мозком і виявлені також у Т-клітинах.

Успадковування ознак в поколіннях забезпечує подібність нащадків з предками. Хоча така передача традиційно є предметом дослідження генетики, з'являється все більше доказів ролі і епігенетичних механізмів у таких процесах. Цей тип епігенетичної спадковості може бути актуальним для всіх таксонів, хоча поки докази є тільки для рослин та ссавців.

РОЗДІЛ 12. ГІПОТЕЗА ПРОГНОСТИЧНОЇ АДАПТИВНОЇ ВІДПОВІДІ

Більшість систем людського організму починають розвиватися невдовзі після запліднення і повністю дозрівають тільки через тижні, місяці або навіть роки після народження. Організм найбільш чутливий до зовнішніх впливів (включаючи гіпоксію, підвищений або знижений рівень материнської турботи, інфекції, гормональні впливи, вплив хімічних препаратів і токсинів) протягом внутрішньоутробного розвитку і періодів постнатального та (ймовірно) препубертатного дозрівання. Такі впливи впродовж критичних періодів дозрівання, які супроводжуються онтогенетичною пластичністю, призводять до перманентних змін у структурі та функції певних органів і систем організму.

Цей процес "онтогенетичного програмування" є адаптивним, оскільки реалізує підготовку організму до очікуваних у майбутньому умов довкілля. Глюкман (Gluckman) і Хансон (Hanson) назвали подібний вид адаптації "**прогностичною адаптивною відповіддю**" (predictive adaptive response). Відповідно до цієї концепції, збільшення пристосованості організму спостерігається у випадку подібності умов існування до і після народження. На підтримку такого сценарію свідчать дослідження на щурах та свинях, у яких за умов надмірного харчування під час вагітності та наступного вживання жирної їжі після народження не спостерігається небажаних наслідків. Якщо ж ці умови відрізняються (прогноз виявляється невірним), це може призводити до виникнення різних патологій. Так, якщо внутрішньоутробний розвиток людей відбувається за якісно або кількісно неповноцінного харчування, вони народжуються зі зниженою вагою і зміненим обміном речовин. Люди з подібним "запасливим" типом метаболізму краще виживають за умов дефіциту харчування, однак в умовах повноцінного харчування швидко набирають вагу і згодом схильні до різних проявів метаболічного синдрому. Останній сценарій в наші дні стає дедалі більш поширеним, оскільки зміни стилю життя, які спостерігаються в останні роки, часто перебувають у конфлікті з

програмованими протягом раннього розвитку прогностичними адаптивними змінами.

Багато авторів вважають, що основним молекулярним механізмом прогностичної адаптивної відповіді є зміни, які відбуваються на епігенетичному рівні. Так, Тсшентке (Tzschentke) з співавт. встановили, що з яєць домашніх качок, підданих під час інкубації температурному стресу, вилупляються каченята зі змінами в термочутливості нейронів гіпоталамуса. Автори пов'язують ці зміни з формуванням у птахів, які зазнали дії стресу, епігенетичної температурної адаптації.

Життя сучасної людини наповнене синтетичними сполуками і штучними репродуктивними технологіями, які можуть індукувати онтогенетичне програмування з непередбачуваними наслідками на пізніх етапах життя. Цілком можливо, що такі фактори роблять свій внесок в поширення різних хронічних патологій, яке спостерігається останніми десятиліттями. Розуміння того, яким чином фактори довкілля впливають на епігенетичні процеси, призводячи до онтогенетичного програмування, може забезпечити нові підходи до ранньої діагностики, попередження та лікування цих захворювань.

РОЗДІЛ 13. ГІПОТЕЗА РАННЬОГО ПРОГРАМУВАННЯ ХРОНІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПІЗНЬОГО ВІКУ

Важливо відзначити, що за нормальних умов епігенетичний профіль генів є динамічним та змінюється протягом розвитку. Іншими словами, епігенетичний профіль характерний для даного моменту часу, наприклад, народження, формує базис, на основі якого відбуваються майбутні епігенетичні зміни. Якщо цей базис змінюється під впливом пренатального середовища, то новий профіль буде відмінним від норми. Спричинені факторами оточення епігенетичні зміни можна розглядати як особисту історію впливу навколишнього середовища. Знання особливостей таких епігенетичних змін може надавати унікальні можливості для персоналізованої медицини.

Як уже зазначалося вище, існує зв'язок між впливом навколишнього середовища під час розвитку та змінами в метилюванні ДНК. Дослідження людини зазвичай включають в себе вивчення метилювання ДНК клітин крові з причини доступності зразків та стабільності даної епігенетичної модифікації. Такі дослідження загалом можна розділити на ті, в яких вивчають **глобальні зміни метилювання**, та ті, в яких аналізують його **геноспецифічні зміни**. Глобальне метилювання може бути оцінене неспецифічно на основі загального метилювання ДНК в геномі або завдяки визначенню рівня метилювання динуклеотидів CpG в послідовностях, які повторюються. Як відомо, особливе значення має аналіз метилювання ДНК в конкретних CpG-сайтах, які локалізуються у певних генах та для яких продемонстрований функціональний зв'язок із різними захворюваннями.

В елегантному дослідженні, опублікованому в журналі Journal of Pediatrics, Перкінс (Perkins) з співавторами оцінили метилювання гена *IGF-2* в ДНК лейкоцитів пуповинної крові 204 немовлят. Отримані рівні метилювання аналізували в контексті антропометричних даних дітей у віці 1 року. Немовлята були розділені за вагою та віком. Дослідження показало, що у дітей з меншою вагою рівень метилювання ДНК цього гену в середньому вищий, ніж у дітей з

більшою вагою. Проте, мабуть, один з найбільш захоплюючих результатів цього дослідження полягає у тому, що діти на штучному вигодовуванні характеризувались збільшенням метилювання *IGF-2* у порівнянні з такими на грудному вигодовуванні. Цей факт свідчить про зв’язок між умовами постнатального розвитку та метилюванням ДНК даного гена.

Зміни в метилюванні ДНК також можуть бути пов'язані з тютюнопалінням матерів та впливом токсинів під час вагітності. Зміни метилювання в локусі *IGF-2*, а також в повторюваних елементах (*LINE1* та *Alu*) були виявлені в пуповинній крові новонароджених, чиї матері палили під час вагітності. Виявлено, що вплив поліциклічних ароматичних вуглеводнів (канцерогенних речовин, які зазвичай зустрічаються в тютюновому димі), миш'яку, забруднення повітря, вживання смаженої їжі, та деяких інших чинників також може бути пов'язаний зі зниженням глобального та геноспецифічного метилювання ДНК в пуповинній крові, причому ефекти цих впливів суттєвим чином залежать від статі.

Варто зазначити, що встановлені вище зв’язки між впливом різних чинників на ранніх етапах розвитку та змінами метилювання ДНК є чисто асоціативними. Механізми згаданих ефектів досі не відомі. Крім того, багато досліджень не враховують потенційних особливостей, таких як стать, тип клітин та батьківські або трансгенераційні ефекти, а також механізмів, які здатні нівелювати такі впливи. Вказані обмеження знижують чутливість досліджень з ідентифікації подібних зв’язків. Крім того, результати подібних досліджень важко інтерпретувати у категоріях «так» чи «ні». Метилювання ДНК не завжди означає виключення гену (категорія «ні»), відповідь часто залежить від того, в якому саме місці гена воно відбувається

В аспекті епігенетики в медицині повинно враховуватись, що, по-перше, епігенетичні зміни можуть розглядатися тільки в якості біомаркерів, наприклад, як «відлуння» події раннього життя, яке може прогнозувати ризик захворювання у дорослому віці, але не має нічого спільного з його етіологією; по-друге, певні пренатальні події можуть мати конкретні молекулярні наслідки,

які можна буде використовувати як своєрідні «відбитки пальців» на молекулярному рівні.

РОЗДІЛ 14. КОНЦЕПЦІЯ ЕПІГЕНЕТИЧНОГО ДРЕЙФУ

Як відомо, метилювання ДНК є ключовою регуляторною міткою, яка виявляється на більшості (але не на всіх) цитозинових основах у контексті динуклеотиду CpG. Дослідження метилювання ДНК у нормальних клітинах, яке може змінюватися з віком, має досить довгу історію, в ході якої вже у ранніх роботах було показано, що асоційовані з віком зміни можуть впливати на невелику кількість генних локусів, особливо промоторів генів пухлин, таких як *IGF2* та *ESR1* (або *ERα*), в яких спостерігається високий вміст CpG. Також на ранніх етапах досліджень було виявлене глобальне (повногеномне) гіпометилювання з віком. Крім того, було показано, що монозиготні близнюки демонструють епігенетичні розходження патернів метилювання ДНК, які зростають з віком та різницею стилю життя. Нові технології, які дозволяють дуже точно оцінити рівні метилювання ДНК у десятках тисяч CpG-сайтів, підтвердили ці спостереження. Наприклад, було показано, що пов'язане з віком зростання метилювання ДНК відбувається здебільшого в промоторах ключових генів розвитку, які часто марковані у ембріональних стовбурових клітинах комплексом PRC2, та відомі як PolyComb Group Targets (PCGTs). Багато з таких PCGTs генів кодують відомі супресори пухлин та транскрипційні фактори, необхідні для диференціації. Стало зрозуміло, що більшість вікових змін включають втрату метилювання ДНК у сайтах з низькою щільністю CpG та гіперметилювання промоторів PCGTs генів, які мають високу щільність CpG. Отже, схоже на те, що з віком поступово порушується регуляція машинерії, яка відповідає за підтримання метилювання ДНК, що і призводить до виникнення описаних відхилень від звичайного епігенетичного стану. Цей процес і був названий **епігенетичним дрейфом**.

Тканиноспецифічність епігенетичних змін, пов'язаних з віком. Перше питання, яке з'являється щодо епігенетичного дрейфу – це тканиноспецифічніть цього феномену. У 2007 році Ica (Issa) зі співавторами

показали, що пов'язані з віком зміни метилювання ДНК, які впливають на активність певних генів, спостерігаються лише у певних тканинах. Проте у цьому контексті слід зазначити, що тканини організму мають складну будову та складаються з клітин різних типів. Отже, якщо клітинний склад тканини змінюється з віком, то це має призводити і до зміни патерну метилювання ДНК, який буде відображати зміни клітинного складу. І дійсно, низкою досліджень продемонстровано, що деякі з залежних від віку змін метилювання ДНК у цільній крові, можуть обумовлюватись зміщенням співвідношення клітин крові, особливо співвідношення мієлоїдних та лімфоїдних клітин. Було показано, що глобальне гіпометилювання спостерігається саме у мієлоїдних клітинах. Отже, пов'язані з віком зміни метилювання ДНК, які відображають зміни клітинного складу тканини, імовірно є тканиноспецифічними та загалом не спостерігаються у інших типах тканин.

Нещодавно встановлено, що існують також вікові зміни метилювання ДНК, які не залежать від типу тканини. Наприклад, гіперметилювання ДНК, яке відбувається у 69 сайтах CpG у промоторах генів PCGTs, має місце не тільки у цільній крові, а і у нормальних тканинах шийки матки та легень і навіть у перероджених клітинах яєчників. Подібні патерни метилювання, які стосуються бівалентно маркованих генів, були виявлені також у очищених CD4+ Т-клітинах та CD4+ моноцитах, що не дозволяє вважати зміни у співвідношенні типів клітин крові основною причиною таких особливостей метилювання. Мета-аналіз, сфокусований на тканинах головного мозку та крові, показав, що більша частина змін метилювання ДНК з віком є загальною для обох типів тканин, що варто враховувати для таких захворювань, як хвороба Альцгеймера.

Тим не менше, хоча у описаних вище дослідженнях не встановлено тканиноспецифічності метилювання, це не дозволяє стверджувати, що зміни в клітинному складі тканини не впливають на цей процес. Крім того, поступові зміни метилювання ДНК з віком мають відбуватися у всіх клітинах незалежно від типу тканини.

Епігенетичний дрейф та ідентифікація віку. Питання ідентифікації віку з використанням молекулярних маркерів залишається актуальним прикладним аспектом дослідження процесів старіння. У якості таких маркерів використовуються вкорочення теломер або перебудови ДНК у Т-клітинах, проте точність такого прогнозу не висока. У відповідності до концепції епігенетичного дрейфа у якості маркера віку можна використовувати метилювання ДНК. Так, у роботі Ханнум (Hannum) з співавт. (2013) показано, що за допомогою повногеномного аналізу метилювання ДНК можна визначити вік у препараті крові з середньою похибкою ±5 років. Також автори зазначають, що такі профілі метилювання ДНК корелюють з віком і у інших типах тканин, проте точна оцінка віку потребує зміни параметрів досліджень. Таким чином, можливо, що висока точність прогнозування віку у випадку використання тканиноспецифічного метилювання, принаймні частково, забезпечується за рахунок тканиноспецифічних ефектів (наприклад, пов'язаних зі зміною співвідношення клітин різних типів). Ці ефекти верифіковані для кровотворної системи, у якій було показано зміщення співвідношення клітин в сторону мієлоїдної лінії з віком. Незалежно від молекулярних механізмів змін метилювання ДНК з віком, його аналіз може мати прикладне значення, наприклад, у криміналістиці для визначення віку людини, зразок крові якої був знайдений на місці злочину. Проте такий підхід потребує подальших досліджень та пошуку більш точних маркерів та розробки методик, які є не дуже вартісними та можуть широко застосовуватись.

Більшість існуючих моделей передбачення віку є лінійними однофакторними або багатофакторними моделями, згідно яких темп накопичення змін метилювання ДНК з віком є величиною сталою. Було показано, що швидкість таких змін залежить від генетичних факторів загалом, а також від статі зокрема (у чоловіків швидкість більша). Проте незмінність швидкості цього процесу проблематична, а отже, може описуватися нелінійною моделлю. Наприклад, з використанням зразків цільної крові у хлопчиків віком від 3 до 17 років за допомогою логарифмічної моделі показано, що навіть у

такому молодому віці можна виявити вікові зміни метилювання ДНК і такі ранні зміни є причиною мінливості, яка спостерігається у дорослих. Тим не менше, у цьому дослідженні не можна виключати впливу неідентифікованих факторів, оскільки воно не включало зразки з популяцій дорослих людей, які були б отримані з різних незалежних груп. У географічно-дистанційному дослідженні близнюків, у якому порівнювались профілі ДНК-метилювання у новонароджених близнюків з такими у віці 18 місяців, були виявлені достовірні зміни метилювання ДНК, пов'язані з віком (3% різниці за 12 місяців). Треба відзначити, що у інших дослідженнях зазвичай зазначається наявність змін метилювання ДНК на рівні від 10 до 25% у ширших вікових діапазонах, охоплюючих декілька десятиліть. Отже, враховуючи описані вище результати, можна зазначити, що пов'язаний з віком епігенетичний дрейф з'являється одразу після народження та може бути особливо виражений у період до статевого дозрівання. Такий факт є дуже цікавим у світлі гіпотези про чутливість епігеному до стресових умов саме у цей період. Отже, результуюча дія факторів оточення, які впливають на метилювання ДНК у період раннього життя, може бути драйвером епігенетичного дрейфу.

Епігеничний дрейф та диференція клітин. Цікаво, що у популяціях стовбурових клітин були виявлені незалежні від тканини зміни метилювання ДНК з віком. Наприклад, вікові зміни метилювання ДНК, які відбуваються у клітинах крові та стосуються метилювання генів PCGTs, були виявлені у отриманих з кісткового мозку мезенхімальних стовбурових клітинах (МСК). Подібні зміни були також ідентифіковані у попередниках гемопоетичних клітин (ПГК). Крім того, інші особливості змін профілю метилювання, незалежні від типу тканини, наявні у обох зазначених типах клітин. Отже, можливо, що загальний епігенетичний дрейф, який встановлено у всіх тканинах, може бути спричинений змінами в основних довгоживучих стовбурових клітинах.

Якщо припустити, що епігенетичний дрейф дійсно має місце у стовбурових клітинах, то він повинен впливати на функцію останніх. Ця гіпотеза отримала підтвердження у біоінформатичному дослідженні, в якому були встановлені інтерактомні «гарячі точки», в яких ідентифікуються вікові не тканиноспецифічні відмінності метилювання ДНК. Одна з таких точок являє собою взаємодію транскрипційних факторів стовбурових клітин, у тому числі *UTF1 (Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1), SOX8* та *SOX2,* CpG-динуклеотиди у промоторах яких з віком поступово гіперметилюються. UTF1 необхідний для диференціації ЕСК людини та відомий у якості маркеру ефективності репрограмування. Іще однією «гарячою точкою» вищезгаданих взаємодій є гени сигнального шляху WNT (комбінація *Wg* (англ. *wingless*) та *Int*), який відіграє важливу роль у диференціації стовбурових клітин. Вікові зміни активності даного сигнального шляху добре відомі, проте невідомо, чи регулюються вони епігенетично. Отримання однозначних відповідей на це запитання ускладнено тим фактом, що промоторні ділянки і негативних регуляторів, і рецепторів сигнального шляху гіперметилюються з віком, отже, «чистий» ефект таких змін важко виокремити.

Показано, що пов’язані з віком зміни метилювання ДНК, які виявлені у стовбурових клітинах, можуть лежати в основі порушення функцій цих клітин, наприклад у випадку МСК та міогенних стовбурових клітин. Крім того, було показано, що зміни метилювання ДНК, асоційовані з онтогенезом гемопоетичних стовбурових клітин, відбуваються здебільшого у генах-мішенях PRC2, і особливо у генах, які повинні експресуватися у диференційованих нащадків таких клітин. Також відомо, що гіперметилювання ДНК, яке призводить до сайленсинга ключових транскрипційних факторів, необхідне для специфікації клітинної лінії у старіючих гемопоетичних стовбурових клітинах. У той же час загальна повногеномна кореляція між метилюванням ДНК та експресією генів є дуже низькою, що свідчить про те, що більшість змін метилювання ДНК генів-мішеней PRC2 впливає на їх транскрипційну активність тільки у випадку передачі клітинам-нащадкам.

Репрограмування диференційованих клітин у індуковані плюрипотентні клітини супроводжується суттєвими змінами метилювання ДНК. Цікаво, що локуси, які підлягають пов'язаним з віком змінам метилювання ДНК, перекриваються з такими за умов репрограмування клітин. На основі цього факту було висловлено припущення про можливість так званого **«епігенетичного омолодження»**, яке являє собою повне нівелювання пов'язаніих з віком накопичених змін метилювання ДНК, що призводить до відтворення профілів метилювання ДНК в ембріональних стовбурових клітинах.

Пов'язане з віком метилювання ДНК та ризик захворювань. Мішенню пов'язаного з віком метилювання ДНК часто є промотори ключових генів-супресорів пухлин. Крім того, було продемонстровано, що гени, промотори яких гіперметилюються з віком, також гіперметильовані у пухлинах. Більше того, у монозиготних близнюків була виявлена епігенетична дивергенція, пов'язана з віком, а саме величина дрейфу залежала від рівня відмінностей середовища їх існування, який визначався як різниця стилю життя та часу, проведеного близнюками окремо. Таким чином, особливості епігенетичного дрейфу можуть впливати на перебіг багатофакторних захворювань. Було показано, що зміни метилювання ДНК з віком спостерігаються у промоторах генів, на функціонування яких впливають фактори ризику виникнення раку (паління, ожиріння, запалення та експресія онкобілків вірусів). Відомо, що при формуванні онкологічних захворювань або підвищення їх ризику спостерігаються зміни метилювання ДНК, подібні до таких, що пов'язані з віком, а саме вони стосуються бівалентних міток та PCGTs. Проте, слід відмітити, що не всі зміни метилювання ДНК, які асоційовані з факторами ризику виникнення раку, відповідають таким, які відбуваються при старінні – наприклад, у випадку впливу сонячного випромінювання/УФ. Нещодавно у нормальних тканинах був описаний пов'язаний з віком мутаційний тягар, однак яких саме генів стосуються ці мутації, залишається невизначеним.

Було показано, що сайти, які набувають метилювання з віком за нормальних умов, перекриваються з сайтами, метилювання яких підвищує ризик виникнення раку шийки матки та зазвичай спостерігається перед проявом даного захворювання. Цікаво, що надекспресія вірусних онкобілків HPV (Human papillomavirus) призводить до гіперметилювання промоторів генів-мішеней PRC2. Такий результат вказує на те, що принаймні частина змін метилювання ДНК, які пов'язані з підвищенням ризику виникнення раку шийки матки, можуть бути викликані інфекцією HPV. Слід зазначити, що інфікування даним вірусом є важливим але недостатнім фактором виникнення раку шийки матки. Отже, цілком можливо, що пов'язаний з віком епігенетичний дрейф є тільки одним з факторів ризику і сприяє схильності до захворювання, а подальші епігенетичні зміни, індуковані, наприклад, HPV, можуть призводити до ініціації морфологічної трансформації.

Епігенетичний дрейф може бути причиною і інших захворювань. Так, було показано, що у хворих на прогерію Хатчінсона-Гілфорда (Hutchinson–Gilford Progeria) та синдром Вернера (Werner Syndrome) (стани передчасного старіння) зміни метилювання ДНК можуть відігравати ключову роль у проявах патологічних станів. У пацієнтів з мутаціями у генах *LMNA (Lamin A/C)* та *WRN (Werner syndrome ATP-dependent helicase),* за яких спостерігаються відповідні клінічні характеристики, наявні змінені профілі метилювання ДНК, схожі на такі, пов'язані з віком. Цікаво, що такі зміни метилювання ДНК ідентифікуються за подібної клінічної картини у хворих, у яких мутації відсутні, що може вказувати на ключову роль саме метилювання ДНК у даних захворюваннях.

Еволюційне значення епігенетичного дрейфу. Результати дослідження епігенетичного дрейфу можуть бути особливо цікавими у контексті **еволюційної теорії старіння**. Згідно однієї з теорій, старіння виникло як спосіб контролю над розміром популяції. Можливо, у випадку обмеженої кількості ресурсів або голоду, що було звичайною ситуацією на початку історії життя,

перенаселеність могла призводити до виснаження ресурсів та збільшувала ризик масового вимирання. Таким чином, природній «груповий» відбір міг сприяти таким генетичним та епігенетичним механізмам, які б забезпечували старіння та проявляли свій згубний вплив тільки по закінченню репродуктивного періоду, що дозволяло зберегти генофонд та чисельність популяції на сталому рівні. Така точка зору підтримується іншою ідеєю, відомою під назвою **концепції високо оптимізованої толерантності** (highly optimized tolerance). Дана еволюційна теорія постулює, що біологічні організми, особливо багатоклітинні, перебувають у стані високо оптимізованої толерантності, що забезпечує стійкість до різких змін оточення, допускаючи вартісні компроміси, такі як підвищення ушкоджуваності на прикладі фенотипу старіння. У такому контексті епігенетичний дрейф може виступати механізмом, який приймає участь у формуванні фенотипу старіння та пов'язаний зі збільшенням ризику захворювань та смерті (шляхом підвищення схильності до раку чи інших захворювань, можливо за посередництва імунологічного старіння). Як відомо, ще одним механізмом старіння може бути вкорочення теломер. Таким чином як і вкорочення теломер, так і епігенетичний дрейф можуть розглядатися як еволюційно вигідні для виду загалом, впливаючи–на популяційну динаміку за допомогою старіння та підвищення пошкоджуваності.

Крім того, низка інших важливих фактів свідчить про можливу роль епігенетичного дрейфу у еволюції людини. Так, нещодавно було показано, що епігенетичний дрейф відбувається не випадково у контексті інтерактому людини, а переважно впливає на гени, для яких характерна незначна кількість взаємодій. Таким чином, гени домашнього господарства (для яких характерна велика кількість взаємодій) повинні бути більш захищеними у контексті епігенетичного дрейфу. Оскільки процес епігенетичного дрейфу розпочинається після народження та описаний у дітей, то дрейф, який впливає на життєво важливі гени, повинен відмітатися відбором. На противагу цьому природній добір не може ефективно тиснути на епігенетичний дрейф, мішенями якого є менш життєво важливі гени, оскільки головні ефекти впливу

дрейфу на останні проявляються тільки після завершення репродуктивного періоду. Епігенетичний дрейф, мішенями якого є такі гени, може навіть розглядатися у якості одного з механізмів, які лежать в основі старіння та необхідні для контролю чисельності популяції.

Епігенетичний дрейф може бути прикладом явища (в англомовній літературі позначається терміном «thrift»), за якого гени, що надавали еволюційну перевагу предковим видам, сьогодні призводять до протилежного (шкідливого) ефекту у сучасному багатому на ресурси суспільстві. Так, гіпотезу епігенетичного дрейфу стали використовувати для пояснення проблеми ожиріння та метаболічного синдрому, поширених у всьому світі. Згідно такого пояснення, гени «корисні» для предкових видів, наприклад, які сприяють накопиченню жиру в очікуванні можливого голоду, тепер мають протилежний ефект. Цікаво, що епігенетичний «thrift» був запропонований як термін, що позначає механізм, який лежить в основі підвищення частоти захворювання на цукровий діабет та серцево-судинні патології серед людей, які народилися у період Голодної зими 1944 року у Нідерландах.

Підсумовуючи вищевикладене, зміни метилювання ДНК, які пов’язані з явищем епігенетичного дрейфу та, імовірно, можуть бути спадковими, являють собою випадок епігенетичного «thrift», який призводить до фенотипового різноманіття та старіння в контексті оптимізації еволюційної адаптації та виживання видів в агресивних умовах навколишнього середовища .

РОЗДІЛ 15. ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ТА ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЮДИНИ

На початку XXI сторіччя було визнано епігенетичну природу тільки трьох захворювань людини, а саме синдрому ламкої Х-хромосоми (fragile X syndrome), синдрому імунодефіциту, центроменої нестабільності та лицьових аномалій (immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies (ICF) syndrome), а також синдрому Ретта (Rett syndrome). За всих цих синдромів метилювання ДНК є модифікацією, яка призводить до характерних порушень. На сьогоднішній день стало зрозуміло, що зміни метилювання ДНК спричиняють велику кількість різноманітних захворювань людини, які виникають різними шляхами. Наприклад, клінічні картини, які пов’язані з аберантними патернами метилювання ДНК, характеризуються змінами імпринтинга. Серед таких хвороб можна назвати синдроми Ангельмана (Angelman), Прадера-Віллі (Prader-Willi), Сильвера-Расела (Silver-Russell) та Беквіта-Відемана (Beckwith-Wiedemann), онкологічні захворювання, діабет, шизофренію та аутизм. Крім того, все більше і більше даних вказують на те, що багато захворювань, пов’язаних зі старінням, також мають епігенетичну природу або принаймні епігенетичний компонент. Серед них окрім вищезгаданих раку та діабету можна назвати низку нейродегенеративних порушень, таких як хвороби Альцгеймера та Паркінсона. Аберантні патерни метилювання ДНК можуть формуватися незалежно від явища імпринтингу генів, внаслідок впливів факторів зовнішнього середовища, таких як стрес, порушення харчування, контакт зі шкідливими речовинами.

Епігенетичні зміни, спричинені факторами навколишнього середовища, можуть також призводити до аутоімунних захворювань. Наприклад, при аутоімунних захворюваннях таких як системний червоний вовчак (systemic lupus erythematosus; SLE) та ревматоїдний артрит (rheumatoid arthritis; RA) спостерігаються зміни метилювання ДНК певних генів (більш детально буде описано нижче). Крім того, алергічні реакції можуть бути пов’язані з

епігенетичними змінами, які виникають у відповідь на дію факторів зовнішнього середовища на ранніх етапах розвитку. Згідно нещодавно висунутої теорії, вплив специфічних факторів, які діють внутрішньоутробно, може спричиняти епігенетичні зміни, які відображаються на експресії залучених у імунне програмування генів, призводячи в свою чергу до розвитку алергії у нащадків та, можливо, і у наступних поколіннях. Наприклад, до захворювань з вищеописаною природою належить астма, причини виникнення якої мають як генетичну, так і середовищну складову. Було показано, що ризик виникнення даного захворювання підвищується за умови дії певних факторів зовнішнього середовища (тютюнопаління чи незбалансоване харчування матері) під час внутрішньоутробного розвитку плоду, що може призводити до змін метилювання ДНК та модифікацій гістонів хроматину специфічного локуса *Th2* (*T helper 2 type*). Вищезгадані епігенетичні зміни обумовлюють активну експресію даного локуса, що в свою чергу веде до диференціації наївних Th клітин у Th2. Така ситуація зміщує співвідношення Th1/Th2 клітин, що у подальшому і обумовлює симптоми астми.

З-поміж факторів навколишнього середовища, які впливають на епігеном, харчування відіграє значну роль у виникненні ожиріння та цукрового діабету. Накопичуються докази того, що метилювання ДНК та ацетилювання гістонів можуть відігравати головну роль у підтриманні та модуляції гладком’язових та ендотеліальних клітин. Відомо, що зміни проліферації, міграції, диференціації та апоптозу даних клітин призводять до виникнення серцево-судинних захворювань таких як атеросклероз, гіпертрофія кардіоміоцитів та серцевої недостатності. Отже, епігенетична складова наявна і у формуванні цього типу захворювань. Вірусні інфекції, бактеріальні агенти та найпростіші також можуть призводити до епігенетичних змін у клітинах організмів, які вони інфікують, що викликає низку захворювань, зокрема неоплазію та захворювання порожнини рота.

Участь епігенетичних факторів у формуванні різних типів захворювань більш детально буде розглянуто нижче.

15.1. ІМУННІ РОЗЛАДИ

Імунна система – це складний комплексний ансамбль органів, тканин, клітин і клітинних продуктів; його здатність розрізняти “своїх” від “чужих”, дозволяє йому захистити організм від потенційно патогенних агентів або речовин. Епігенетичні регуляторні механізми є центральним елементом в процесах диференціації імунної системи і її функціонуванні та забезпечують відповідну експресію генів в імунних клітинах. Патогенні фактори у свою чергу можуть розглядатися як фактори навколишнього середовища, які і викликають ці епігенетичні зміни.

Імунна система та епігенетичний контроль. У імунній системі за першого контакту з патогенним агентом індукуються епігенетичні зміни, внаслідок яких мультипотентні наївні CD4+ (мономерний трансмембранний глікопротеїн, який є маркером Т-хелперів) Т-лімфоцити диференціюються на різні субпопуляції: **Т-хелпери** 1 (Th1), Th2, і Th17-клітини. Основною функцією Т-хелперів є посилення адаптивної імунної відповіді. Дані клітини розпізнають антигени за рахунок Т-клітинного рецептора на їх поверхні. Такі антигени зв’язані з головним комплексом гістонесумісності II класу. Клітини Th1 посилюють клітинну імунну відповідь шляхом активації Т-кілерів та виділяють основний цитокін інтерферон-гама. Клітини Th2 активують В-лімфоцити, що посилює гуморальну імунну відповідь, та продукують **інтерлейкіни** 4, 5 і 13 (Interleukin-4, 5 13; IL-4, 5 13). Th17-клітини у великих кількостях продукують прозапальні цитокіни – інтерлейкін-17.

Наступні впливи патогенів здатні стимулювати CD4+ Т-клітини до диференціювання в **індуковані регуляторні Т-клітини** (inducible regulatory T cells; iTreg). Сформовані CD4 + Т-клітинні субпопуляції здатні не тільки координувати імунну відповідь на інфекцію або рак, а й роблять вагомий внесок у патогенез аутоімунних захворювань. Окрім транскрипційних факторів,

які відповідають за загальну регуляцію, в цих процесах важливу роль відіграють епігенетичні модифікації. Так, модифікації гістонів разом з позиціонуванням нуклеосом беруть участь у специфічній регуляції генів Т-лімфоцитів, а DNMT3a регулює розвиток Th1 і Th2.

Th1 і Th2 клітинні субпопуляції регулюють специфічну імунну відповідь шляхом продукування різних цитокінів, а диференціація наївних CD4 + Т-клітин, у свою чергу, індукується певними цитокінами. Наявність інтерлейкінів IL-4, IL-10 або IL-13 запускає диференціювання Т-клітин в Th2 клітини, а IL-12 або IL-15 індукують диференціацію в Th1. Остаточне співвідношення субпопуляцій Th1/Th2 клітин формується за рахунок епігенетичної регуляції активності генів цитокінів, у тому числі *Ifng (Interferon gamma)* у випадку Th1 клітин та *IL4* у випадку Th2 клітин. Така система зворотнього зв'язку здатна підтримувати рівновагу між клітинними популяціями Т-хелперів, у тому числі епігенетично.

Існують і інші шляхи диференціації наївних CD4 + Т-лімфоцитів, а саме у Treg і Th17-клітини, які, можливо, також регулюються епігенетично. Так, продемонстровано, що для Th17 клітин характерно ацетилювання гістону H3 та метилювання останнього в K4me3 у локусах *IL17* і *IL17f*. Метилювання ДНК також має важливе значення для регуляції диференціації Treg-клітин у мишей та людини, а саме локус *Foxp3* деметилюється, що важливо для стабілізації клітинної популяції.

Як відомо, **В-клітини** є важливими ефекторами гуморальної відповіді, оскільки вони розпізнають антигени, активуючись Т-хелперами. При цьому вони диференціюються в антитіло-секретуючі клітини плазми крові. Антитіла, які утворились, здатні руйнувати бактерії, віруси, і навіть пухлинні клітини шляхом активації **системи комплементу** та/або клітин, які відповідають за лізис, що в решті-решт призводить до антитіло-залежної клітинної смерті. Формування в процесі диференціації спеціалізованого фенотипу В-клітин залежить від експресії специфічних генів та репресії генів, які характерні мультипотентним попередникам. Конкретний набір транскрипційних факторів

має послідовно спрацювати для правильної регуляції; транскрипційні фактори зазвичай рекрутують комплекси ремоделювання хроматину (коактиватори або корепресори) для «увімкнення» або «вимикання» експресії генів. У випадку В-клітин - це транскрипційні фактори E2A, EBF1 (Early-B-cell factor) і Pax5 (Paired box 5). Хоча перші два й здатні активувати В-клітинну специфічну транскрипційну програму, Pax5, мабуть, все ж таки є найважливішим, не тільки тому, що його наявність є необхідною умовою для подальшої диференціації, але й тому, що він фіксує В-клітини у стані компетентності до певного антигену.

Промотор гена *CD79a (Cluster of differentiation)* є прикладом того, як епігенетичні зміни регулюють експресію генів в процесі розвитку. Цей промотор має сайти зв'язування основних В-лімфоїдних транскрипційних факторів (E2A, EBF1, Pax5 і runX1 (Runt-related transcription factor 1)), які перебувають у стані гіперметилювання на стадії клітин-попередників, і деметилюються за умов диференціації В-клітин. Перша хвиля деметилювання, ймовірно, необхідна для активації процесу; структура хроматину повинна ремоделюватись, щоб надати доступ до ДНК. Pax5 відповідає за залучення гістонових ацетилтрансфераз, таких як SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase) і білка CBP (p300/CREB binding protein) для «відкриття» структури хроматину. В той же час в інших клітинних лініях Pax5 може виступати у ролі сайленсера експресії генів, взаємодіючи з гістоновими деацетилазами родини Groucho. Існують і інші механізми молекулярної регуляції В-клітин, але вони загалом вписуються в вищезгадану схему. Епігенетичі механізми також відіграють роль у регуляції моноаллельної V(D)J перебудови та в контролі різноманітності антитіл протягом розвитку В-клітин.

Епігенетичні механізми та інфекційні захворювання. Вроджений і набутий імунітети пов'язані між собою процесингом антигенів, який призводить до зв’язування антигену з молекулами **головного комплексу гістосумісності** MHC (major histocompatibility complex) на поверхні Т-клітин.

Основними регуляторами гуморальної імунної відповіді є антигени в комплексі з MHC II класу на поверхні CD4+ Т-клітин. В тимусі білки комплексу MHC-II переважно потрібні для відповіді на власні антигени, а поза ним його роль полягає в активації Т-клітин. Деякі цитокіни, в тому числі гамма-інтерферон (IFN-γ), здатні посилювати імунну відповідь шляхом підвищення експресії комплексу генів MHC-II в імунних клітинах.

Контроль генів комплексу MHC-II являє собою складну систему, де вирішальне значення системи регуляції відіграє епігенетичний компонент, в тому числі модифікації гістонів, такі як ацетилювання та метилювання, а також метилювання ДНК. CIITA (class II transactivator) вважається основним фактором, відповідальним за експресію генів MHC-II. Сам по собі він не здатен зв’язуватись з ДНК. CIITA рекрутує гістон-модифікуючі ферменти і АТФ-залежні комплекси ремоделювання хроматину до промоторів генів MHC-II, що в свою чергу регулюється складним поєднанням метилювання ДНК і модифікаціями гістонів.

До спеціалізованих антиген-презентуючих клітин (antigen-presenting cells; APC) належать дендритні клітини (ДК) і макрофаги, які зустрічаються в периферійних тканинах, де вони захоплюють антигени для процесингу та доставки їх на лімфоїдні органи та для презентації Т-лімфоцитам. Епігенетична регуляція експресії генів також досліджувалась на ДК. Під час активації ДК в пост-септичній і нормальній селезінці було показано більш низьке співвідношення H3K4me3 і H3K27me2 в промоторі гену *IL12*, що корелює зі зниженням його експресії. Таке зниження співвідношення вказаних гістонових міток обумовлюється порушеннями зв'язування гістонових метил-трансферазних комплексів. Цей механізм можна розглядати як межу між виснаженням ДК і їх дисфункцією після важкого системного запалення.

Епігенетичні механізми та аутоімунність. Несприйнятливість власних клітин в якості чужорідних антигенів є необхідною умовою забезпечення належного функціонування імунної системи. Нездатність системи

реалізовувати аутоімунні процеси все ще залишається до кінця не зрозумілою. Дослідження на моно- та дизиготних близнюках підтверджують те, що генетичні чинники сприяють формуванню більшості аутоімунних захворюваннь, хоча хвороби з окремими ознаками аутоімунних захворювань у випадку ідентичних близнюків у патогенезі містять також середовищну складову. Середовищно індуковані епігенетичні зміни, наприклад, зміна метилювання ДНК, дійсно пов'язані з впливом зовнішніх факторів за деяких форм аутоімунних захворювань. Дисфункція епігенетичних механізмів, спричинена навколишнім середовищем, призводить до формування аномальних патернів експресії генів у деяких клітинних популяціях, порушуючи тим самим аутотолерантність. Внаслідок цього в клітинах, які зазнали таких впливів, може підвищуватися ризик розвитку аутоімунних захворювань у генетично схильних до цього осіб. Таким чином, дослідження генетичних і епігенетичних факторів в єдиному контексті є ключовим для розуміння причин деяких аутоімунних захворювань.

Як відомо, частота аутоімунних захворювань вища у жінок, хоча причина такого явища залишається незрозумілою. Одні дослідження вказують на роль жіночих статевих гормонів в цих процесах. Інші ж припускають, що свій внесок у генетичну схильність до аутоімунних реакцій вносить ще одна Х-хромосома. Як вже зазначалося, одна з Х-хромосом, залишається сайленсованою в жіночих соматичних клітинах завдяки певним епігенетичним механізмам, таким чином, деякі дослідники вважають, що інактивація Х-хромосоми здатна впливати на розвиток аутоімунних реакцій.

Конкордатність у монозиготних близнюків за такими багатофакторними захворюваннями, як рак, серцево-судинні порушення та аутоімунні хвороби є різною. Висока конкордантність у випадку монозиготних близнюків має місце за домінантних моногенних захворювань, а полігенні захворювання характеризуються показниками в межах 5-75%. Мінливість конкордатності може обумовлюватись епігенетичною складовою таких захворювань.

Системний червоний вовчак (SLE) є аутоімунним запальним захворюванням, яке характеризується продукуванням аутоантитіл до різних ядерних антигенів. Гени, які пов'язують зі схильністю до SLE, знаходяться в кластері МНС. Було продемонстровано, що близнюки характеризуються геномними епігенетичними відмінностями, які і можуть бути причиною фенотипових особливостей. Показано наявність значних відмінностей у метилюванні ДНК, як глобально, так і на специфічних послідовностях, між близнюками, дискордантними за SLE. Цікаво зазначити, що цей показник більш подібний між різними людьми, хворими на SLE, ніж у парі дискордантних близнюків.

Патогенез іншого аутоімунного захворювання, **ревматоїдного артриту** (RA), також частково опосередкований епігенетичними факторами, У даному випадку фактори середовища можуть спричинити захворювання у генетично схильних осіб, в результаті чого спостерігається гетерогенна клінічна картина. Епігенетичні модифікації приймають участь у регуляції запальної відповіді у межах цитокінового сигнального каскаду. Відомий своєю центральною роллю в індукції генів, відповідальних за запалення, транскрипційний фактор NFκB (nuclear factor-kB) є особливо важливим у випадку з RA та іншими аутоімунними захворюваннями, і тому розглядається як патогенний чинник і потенційна терапевтична мішень. NFκB рекрутується до своїх цільових промоторів лише за відкритої конформації хроматину. Тому припускають, що активація каскадів запальних процессів є предметом епігенетичною регуляції. Ацетилювання гістону H4 і фосфоацетилювання гістону H3 спостерігається у відповідь на передзапальну активацію промоторів генів вищевказаного каскаду. Крім того, за цього процесу спостерігається також збільшення зв’язування NFκB з промоторами деяких цитокінових та хемокінових генів. Загалом деацетилювання контролює процес запалення у випадку PA, тому що інгібування I/II класу HDAC або III класу HDAC (сіртуїнів) поступово блокує продукування макрофагами IL-6 та TNF-α (tumor necrosis factor-α) як у здорових людей, так і хворих на RA.

Розсіяний склероз (РС), демієлінізуюче захворювання, яке призводить до нейродегенерації та інвалідності серед молодих людей, також характеризується дискордантністю у монозиготних близнюків, вказуючи на можливу роль зовнішніх чинників в його патогенезі. Аналіз метилювання ДНК у CD4 + Т-клітинах хворих на РС не показав суттєвих відмінностей у випадку, коли порівняння проводилося між здоровими братами та сестрами і здоровими особами, які не є родичами. Проте, було продемонстровано, що частота захворюваності на РС в парах мати-дочка у порівнянні з парами батько-син є набагато вищою, що свідчить про те, що стать хворих батьків визначає ризик наступного розвитку РС у нащадка. Ці генетичні та епідеміологічні дослідження переконливо вказують на роль епігенетичного компоненту у патогенезі РС.

Цукровий діабет 1 типу є аутоімунним захворюванням, за якого спостерігається руйнування Т клітинами інсулін-продукуючих β-клітин у панкреатичних острівцях. Відомо, що більше 30 різних локусів пов'язані з цукровим діабетом 1 типу. Окрім того, деякі теорії патофізіології даного типу діабету припускають, що розвиток захворювання є результатом поєднання впливів зовнішніх факторів (через епігенетичні механізми) і підвищеного ризику, який обумовлений генетичними факторами. Підвищений рівень в сироватці крові молекул, які зазвичай ідентифікуються на початку запальних процесів, був виявлений і на перших стадіях захворювання на цукровий діабет 1 типу, що, можливо, свідчить про наявність епігенетичного компоненту у цьому процесі. У CD4 + Т-клітинах хворих на дане захворювання був виявлений підвищений рівень H3K9me2 у промоторах генів, які потенційно пов'язані з патогенезом, таких як *CLTA4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)*. Біоінформатичний аналіз дозволив ідентифікувати гени, такі як *transforming growth factor-β (TGF-β), NF-kB, p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), toll-like receptor (TLR)* та *IL-6*, які одночасно пов'язані як із запальним процесом, так і з аутоімунними захворюваннями.

Епігенетичні особливості імунних клітин в процесі старіння. Старіння - це біологічні зміни, які відбуваються в конкретному організмі в контексті часу та проявляються у зниженні фізіологічних можливостей. Накопичення помилок на молекулярному рівні призводить до порушення функцій клітин. Реалізація таких подій відбувається шляхом генетичних та епігенетичних взаємодій, а епігенетичні механізми приймають участь у регуляції процесів, пов'язаних зі старінням імунної системи.

Функція Т-клітин і клітинний імунітет мають вирішальне значення для роботи імунної системи. Наївні Т-клітини мають важливе значення для активації первинної імунної відповіді і для індукції Th1-клітинного захисту, який запускає опосредовану Т-лімфоцитами цитотоксичну відповідь. Зміни в імунній системі, які пов’язані з віком, тягнуть за собою порушення структури і функцій тимуса таким чином, що спостерігається чітке зменшення у тимусі числа наївних Т-клітин. Не тільки тимус як орган, а і Т-клітини самі по собі характеризуються численними функціональними дефектами, у тому числі вкороченням теломерів їх хромосом, зменшенням кількості Т-клітинних рецепторів, зниженням рівня продукування IL-2. Співвідношення клітин CD4+/CD8+ також дещо змінюється разом зі зміною складу цитокінів і погіршенням реакції на стрес.

Як було зазначено вище, метилювання ДНК бере участь у регуляції багатьох процесів імунної відповіді, наприклад, експресії антигену HLA (human leukocyte antigen), дозрівання лімфоцитів і диференціації Th1 та Th2 клітин і перебудові рецепторів Т-клітин. Промотори генів, які кодують субодиниці рецепторів Т-клітин, гіперметильовані в **подвійно-негативних тимоцитах і циркулюючих попередниках Т-клітин** (double-negative thymocytes and circulating T cell precursors), а деметилювання *TCRβ* (*T cell receptor*) призводить до вибіркової експресії алелів в цих клітинах. Промотори неактивних TCR алелей гіперметильовані і характеризуються компактністю хроматину. Деметилювання промоторів генів *CD8α* і *CD8β* (кодують дві ізоформи глікопротеїну CD8) відбувається при переході від подвійних негативних до

CD4+ CD8+ подвійних позитивних тимоцитів; при цьому така ж ситуація спостерігається і для промотора CD4.

В літературі часто зустрічається інформація з приводу залежних від віку змін в метилюванні ДНК. Так, у тканинах хребетних з віком спостерігається зниження загального рівня метилювання цитозинів. Показано, що таке деметилювання має місце і в організмі людини та відбувається в мозку, печінці, слизовій оболонці тонкої кишки, серці, селезінці і Т-лімфоцитах. Вікові зміни у рівні метилювання ДНК, ймовірно, роблять свій внесок у процеси старіння Т-клітин. Миші, гетерозиготні за нуль-алелем гену *Dnmt1*, фенотипово є нормальними, але ознаки імунного старіння і випадки аутоімунних захворювань у таких особин розвиваються раніше, ніж у тварин відповідного їм віку і посліду, що корелює з гіпометильованням ДНК. Отже, можна говорити про причино-наслідковий зв'язок між цими явищами. Такі особливості метилювання ДНК нагадують картину, яка спостерігається за онкологічних захворювань, частота яких суттєво залежить від віку, і за яких також виявлено значну втрату метилювання ДНК. Можливо, саме це пояснює, чому вік за таких захворювань є одним з основних факторів ризику. Онкологічна трансформація також пов'язана з епігенетичною регуляцією генів комплексу MHC, а саме певні зміни в експресії згаданих генів можуть перешкоджати нормальному функціонуванню системи презентації антигену та імунній реакції на рак. Повязані з віком зміни в метилюванні промоторів генів також сприяють порушенню роботи імуноспецифічних генів, які кодують поверхневі білки, цитокіни IL-2 і IFN-γ, та генів, які беруть участь у основних клітинних сигнальних шляхах, що забезпечують гомеостаз клітини.

Так звані **природні кілери** (Natural killer; NK-клітини) - це цитотоксичні клітини, які здатні розпізнавати як вірусно-, так і не вірусно модифіковані клітини пухлин MHC-незалежним шляхом, відіграючи особливо важливу роль у випадку з онкозахворюваннями. На відміну від Т-клітин кількість NK-клітин з віком збільшується. Тим не менше, ці клітини зменшують проліферацію, цитотоксичну здатність і напрацювання IFN-γ у відповідь на вплив IFN-α і IL-2.

Як і у випадку з Т-клітинами, зміни метилювання ДНК можуть впливати на регуляцію цих цитокінів, що і обумовлює зміну функціонування NK-клітин. Метилювання ДНК та інші епігенетичні механізми також важливі для встановлення і підтримки клонального різноманіння KIR (Killer-cell immunoglobulin-like receptor) і Ly49 рецепторів в NK-клітинах. Епігенетичний контроль наборів рецепторів кожної NK-клітиніи і популяційного набору цих клітин в цілому дозволяє комплексу МНС реагувати на зміни в оточуючому середовищі. Ця рівновага може змінюватись у відповідності з віковими змінами імунної системи, а залежні від віку епігенетичні зміни можуть пояснювати зниження цитотоксичності NK-клітин, що і призводить до підвищення ризику інфекційних захворювань та раку.

З віком гуморальний імунітет організму також зазнає змін на різних рівнях: різноманітність і відповідність імуноглобулінів знижується у зв'язку з порушенням формування центрів, які є місцем проліферації і дозрівання В-клітин. Також порушується продукування довгострокових імуноглобулінів та В-лімфоцитів. Зменшується як кількість функціональних імуноглобулін-секретуючих В-клітин, так і титри антиген-специфічних імуноглобулінів. Змінюється кількість самих В-клітин і набір антитіл, які змінюють свою специфічність. У результаті цього скорочується тривалість гуморальної відповіді і знижується здатність В-клітин до специфічної первинної та вторинної відповідей у літніх людей.

Епігенетичні чинники залучені в процес диференціації і дозрівання В-клітин. Зміни епігенетичного статусу, пов'язані зі старінням, можуть бути відповідальними за зміну функцій В-клітин у літніх людей з причин модифікації шляхів диференціації та регулювання і перебудов BCR/Ig генів. Крім того, механізми, описані для інших типів клітин, можуть бути чинними і для згаданих вище процесів, таких як активація клітин у відповідь на цитокіни або проходження клітинного циклу, апоптоз і метаболічні зміни.

Функціонування APC також може зазнавати порушення у процесі старіння організму з точки зору міграційного потенціалу, здатності до

процесингу антигенів, експресії стимулюючого сигналу, або ж кількості цитокінів в мікросередовищі. Хоча презентація антигену ДК лише злегка відрізняється у літніх людей у порівнянні з молодими, кількість їх менша у периферійній крові та фолікулах, що призводить до зниження ефективності першої лінії оборони проти інфекцій і пухлин. Для нормальної клітинної імунної відповіді на ракові клітини антигени мають бути презентовані комплексом MHC I класу (рівень експресії такого зазвичай знижений в пухлинних клітинах) цитотоксичних Т-лімфоцитів. Обробка пухлинних клітин інгібіторами DNMT або інгібіторами гістондеацетилаз збільшує експресію *MHC-I* в клітинах метастаз карцином, що призводить до активізації знищення останніх за допомогою антиген-специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів. Це свідчить про роль епігенетичних механізмів у зниженні рівня експресії генів MHC I класу в пухлинних клітинах.

Зміни в патернах метилювання ДНК часто спостерігаються в пухлинних клітинах і можуть також змінювати процес презентації пухлинних антигенів Т-клітинам. ДК літніх людей, здатні стимулювати наївні CD8 + Т-клітини з тією ж ефективністю, що і молоді ДК, на відміну від нормальної стимуляції наївних CD4 + Т-клітин; така різниця, ймовірно, зумовлена змінами в кількості або структурі клітинних поверхневих рецепторів і молекул MHC, які впливають на сигналінг.

Макрофаги відіграють важливу роль в процесах ініціації запальних реакцій, елімінації патогенних мікроорганізмів і пухлинних клітин, регулюванні адаптивної імунної відповіді. Вони діють безпосередньо, знищуючи свої цілі, або ж опосередковано, шляхом вивільнення медіаторів, наприклад, таких як, IL-1, TNF-α та IFN-γ, які здатні активувати інші запальні клітини. Ступінь експресії MHC-II в макрофагах при старінні різко знижується, і роль у цих процесах відіграють епігенетичні механізми. З віком також погіршується фагоцитарна активність макрофагів та їх здатність до знищення, що супроводжується зниженням утворення реакційно здатних проміжних сполук кисню (NO_2 і H_2O_2) та зниженням кількості цитокінів, напрацьованих

макрофагами (TNF-α, IL-1), експресія генів яких регулюється епігенетичними механізмами.

В цілому, епігеномномні зміни в процесі старіння, описані на багатьох як імунних, так і не імунних клітинах, пояснюють зниження функціональності імунної системи і підвищеної сприйнятливості до інфекцій і раку у людей похилого віку.

15.2. ЕПІГЕНЕТИКА ТА ОНКОЛОГІЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Свідчення ролі епігенетичних механізмів у розвитку раку отримані як у експериментах *in vitro*, так і *in vivo*, а також в клінічних та епідеміологічних дослідженнях. Отримані дані дещо не узгоджуються з традиційними поглядами на онкологічні захворювання, які розглядають рак як хворобу, що є результатом накопичення генетичних змін у онкогенах та генах-супресорах пухлин, що призводить до неконтрольованого клітинного росту. Сьогодні вважається, що епігенетичні зміни відіграють роль в канцерогенезі, а отже, існує зв'язок між впливом факторів оточення та розвитком хвороби. Незважаючи на швидкий розвиток знань у цій галузі науки, все ще залишається безліч питань відносно внеску епігенетики в канцерогенез, зокрема, чи можуть епігенетичні зміни, спричинені зовнішніми факторами, ініціювати розвиток раку, чи можуть епігенетичні зміни бути ініціаторами онкогенетичних процесів, чи останні є наслідком клітинної трансформації і генетичних змін та чи може епігенетична терапія запропонувати шлях до лікування раку.

У даному розділі буде розглянуто епігенетичні механізми канцерогенезу та наведено результати досліджень, здійснених на тваринних моделях, які сприяють розумінню ролі епігенетики в процесах виникнення та прогресії злоякісних пухлин.

Порушення метилювання ДНК

Як уже зазначалося вище, онкологічні захворювання супроводжуються суттєвим порушенням метилювання ДНК. Формування зміненого патерну метилювання ДНК супроводжується гіпометилюванням дистальних регуляторних ділянок і повторів разом з гіперметилюванням CpG-острівців.

Відомо, що ДНК, отримана з різних типів пухлин, характеризується специфічними профілями метилювання динуклеотидів CpG, а різні пухлини - різними шляхами онкогенезу. Однак як саме метилювання CpG пов'язане з клінічними проявами, досі не відомо, хоча гіпометилювання ДНК є однією з перших описаних епігенетичних змін за онкологічного процесу у людини. У 80-ті роки XX століття було показано, що ДНК з ракових тканин людини має більш низький відсоток метильованого цитозину, ніж ДНК тканин здорових органів. Пізніше було продемонстровано на повногеномному рівні обернену кореляційну залежність вмісту 5mC та прогресування пухлини. В подальшому подібну залежність було показано для різних типів пухлин. Така картина характерна для міжгенних повторів, що може сприяти нестабільності геному та розвитку раку.

Хоча ДНК ракових клітин глобально гіпометильована, певні ділянки залишаються гіперметильованими, а отже, метильовані в нормі ділянки гіпометилюються, а гіпометильовані – навпаки стають гіперметильованими. Геномні ділянки, які гіперметильовані за онкологічних захворювань, як правило, є CpG-острівцями. Цей процес відбувається за допомогою механізму надлишкової експресії DNMT. Вважається, що ці ферменти формують комплекс з онкогенними транскрипційними факторами для ініціації *de novo* метилювання CpG-острівців в промоторних ділянках.

Сайти CpG, які знаходяться в промоторній області, але за межами CpG-острівців, є об’єктом гіпометилювання. Вони зазвичай знаходяться в промоторних ділянках репресованих генів і метильовані в нормальних клітинах. В перероджених клітинах ці ділянки гіпометильовані, що порушує їх репресію. Так, у випадку імпринтованих генів гіпометилювання CpG-сайтів в

промоторних ділянках призводить до їх біаллельної експресії, що також пов'язано з канцерогенезом.

Метилювання послідовностей, які повторюються. Послідовності, які повторюються, складають близько половини генома людини і, як правило, сильно метильовані. За онкологічних процесів спостерігається гіпометилювання цих ділянок. Центромерні та прицентромерні тандемні повтори, а також елементи *Alu* і *LINE1* - це найбільш часто досліджувані повторювані послідовності за онкологічних захворювань, для яких продемонстровано гіпометильовання.

Вищезгадані центромерні та прицентромерні тандемні повтори відіграють роль у підтримці гетерохроматину на ділянках контактів сестринських хроматид. Гіпометилювання цих ділянок може призвести до деконденсації хроматину і, відповідно, хромосомних перебудов, які є складовою геномної нестабільності. Наприклад, виключення гена *DnmtI* в культурі мишачих ембріональних стовбурових клітин супроводжується збільшенням частоти хромосомних транслокацій. Крім того, перехід гетерохроматинових ділянок в еухроматиновий стан може призвести до збільшення копій генів, залучених у онкогенез.

Тим не менш, хромосомні аномалії - це не єдиний наслідок гіпометилювання послідовностей, які повторюються, у розвиток перероджених клітин. ***Alu*** і ***LINE1*** елементи - це ретротранспозони, які для збільшення своєї копійності використовують РНК-інтермедіат. Загалом геном людини містить близько 30% таких послідовностей. Ідентификовано більше 500 тисяч елементів *LINE1* у геномі людини, серед яких повнорозмірних близько 100 екземплярів. В той же час, налічується більше 1 мільйона копій *Alu*-елемента. Обидва елементи містять послідовності, подібні до промоторних, що вказує на їх потенційну здатність приймати участь у регуляції транскрипції генів. Як вже вказувалось, у непереродженних тканинах *LINE1* та *Alu*-елементи репресуються завдяки метилюванню ДНК в той час, коли за онкологічних процесів вони

гіпометильовані. Так, гіпометилювання елементів *LINE1* супроводжує початкові етапи онкогенезу за колоректального раку, гепатоцелюлярного раку і раку сечового міхура. Одночасне гіпометилювання *Alu*-елементів і *LINE1* продемонстровано за раку передміхурової залози, пухлин підшлункової залози і карциноїдних пухлин. Було показано, що зниження рівня метилювання елементів *LINE1* і *Alu* супроводжується геномною нестабільністю за дрібноклітинного раку легенів, відіграючи потенційну роль у формуванні неоплазії цього органу.

Гіпометилювання згаданих ретротранспозонів і їх подальша активація має декілька наслідків для процесу онкогенеза. Вони можуть викликати інсерційний мутагенез і формування процесивних псевдогенів, делецій та інверсій в геномі. Все це може супроводжуватися хромосомними аномаліями, аберантною експресією генів та загалом нестабільністю геному.

Особливості метилювання CpG-острівців та експресії генів в нормі та патології. Як вказувалося вище, ДНК ракових клітин характеризується гіперметилюванням CpG-острівців в промоторних ділянках генів. На відміну від гіпометилювання міжгенних CpG-сайтів, яке призводить до нестабільності геному, гіперметилювання CpG-острівців сприяє прогресуванню канцерогенезу внаслідок пригнічення експресії генів-супресорів пухлин. Наприклад, промотор гена *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), який є геном-супресором пухлин та відповідає за пригнічення проліферації, зазвичай гіперметильований при раку головного мозку та раку щитовидної залози, в той час як *APC (Anaphase-Promoting Complex),* який бере участь у регуляції клітинного циклу, адгезії типу «клітина-клітина» та клітинної активності, інактивується внаслідок гіперметилювання при раку легень, молочної залози та колоректальному раку. Пригнічення експресії регулятора клітинного циклу p16 характерне практично для всіх типів раку людини. Інактивація цих супресорів пухлин безпосередньо стимулює формування новоутворень завдяки відсутності контролю над клітинними процесами. В додаток до генів-супресорів пухлин

гіперметилювання інших генів, таких як гени репарації ДНК і транскрипційних факторів, можуть опосередковано призвести до канцерогенезу внаслідок подальшого пригнічення експресії інших генів або накопичення генетичних помилок. Наприклад, експресія факторів транскрипції GATA-4 і GATA-5 (назва походить від сайту-зв'язуання, який являє собою послідовність нуклеотидів GATA) пригнічена при колоректальному раку та раку шлунку. Інактивація генів репарації ДНК, таких як *O-6-methylguanine-DNMT*, зазвичай характерна для первинних новоутворень.

Явище гіперметилювання промоторів генів є ранньою подією в канцерогенезі. Припускають, що вибір конкретної послідовності для гіперметилювання може бути пов'язаний з ділянками суттєвих епігенетичних репрограмувань і є наслідком таких подій. Інше пояснення полягає в тому, що певні промотори генів впізнаються комплексом DNMT з онкогенними транскрипційним факторами. Крім того, можливо, що гіперметилювання є наслідком пухлино-специфічного гістонового коду. Може здатися, що гіпометилювання і гіперметилювання є взаємовиключними процесами в канцерогенезі, та ці патерни зазвичай співіснують в межах однієї і тієї ж пухлини, хоча вони зустрічаються на різних геномних ділянках. Окрім того, комплекс епігенетичних порушень, які відбуваються внаслідок гіпо- та гіперметилювання, може призводити до формування різних форм раку. Тим не менш, такі порушені патерни метилювання є досить стабільними, проте не незворотніми. Порушення регуляції метилювання ДНК, яке спостерігається при раку, відбувається в контексті інших епігенетичних змін. Білки, здатні зв'язуватися з метильованою ДНК, також сприяють пригніченню експресії генів та залучені до епігенетичної регуляції. Зокрема, такі білки взаємодіють з білками, які беруть участь у контролі зв'язування ДНК та гістонів.

Ремоделювання хроматину за онкологічних процесів

Багато форм раку супроводжуються також змінами конформації хроматину, які відбуваються в тому числі з причини порушення регуляції різних класів гістон-модифікуючих ферментів.

Метилювання гістонів. Як вже зазначалося, метилювання гістонів бере участь у регуляції транскрипції та пов’язано як з активацією, так і з пригніченням експресії генів. За онкологічних процесів може відбуватися порушення регуляції ферментів метилювання та деметилювання гістонів (Таблиця 15.2.1). Одним з ключових ферментів метилювання лізинів є білок **EZH2**, К-метилтрансфераза, який каталізує триметилювання H3K27. Білок EZH2 є компонентом **Polycomb repressive complex 2** (PRC2; білковий комплекс, який включає в себе як К-метилтрансферазу, так і білки, що розпізнають H3K27me3). Мітка H3K27me3, як правило, важлива для пригнічення експресії генів, пов'язаних з розвитком і диференціацією стовбурових клітин, в тому числі кластера *Hox* генів. При багатьох формах раку EZH2 надлишково експресується на транскрипційному та білковому рівнях, зокрема за раку простати, молочної залози, лімфоми та гліобластоми. У ракових клітинах H3K27me3 також пригнічує експресію генів незалежно від метилювання промоторів генів, в той час як в нормальних клітинах EZH2 контролює метилювання ДНК, взаємодіючи з ДНК-метилтрансферазами. Крім того, порушення регуляції інших компонентів PRC2 та білків, які з ним взаємодіють, також характерні для онкологічних процесів.

На відміну від H3K27me3 (мітка репресованого хроматину), метилювання гістонів може також бути маркером, пов'язаним з транскрипційною активацією. **Mixed lineage leukemia** (MLL) - К-метилтрансфераза, яка каталізує метилювання H3K4 (мітка активного хроматина). MLL є антагоністом PRC2, активуючи гени, які беруть участь в розвитку і диференціації. За лейкемії спостерігаються ампліфікація *MLL* або злиття з іншими генами. У мишей введення злитої конструкції *MLL-AF9* призводило до розвитку гострого лейкозу. Такі злиття призводять до формування унікального профілю експресії

генів у порівнянні зі звичайним В-попередником гострої лімфобластної лейкемії. Зокрема, у пацієнтів з MLL транслокаціями було продемонстровано аномально високий рівень експресії генів ранніх стадій кровотворення.

Таблиця 15.2.1. **Приклади порушення регуляції метилювання гістонів за онкологічних захворювань**

Гістон-модифікуючий фермент	**Тип модифікації**	**Клітинна функція/ як саме пов'язано з раком**
Лізин метилтрансферази		
MLL	H3K4	Активація транскрипції/ злиття з іншими генами ідентифіковано при лейкемії
SETDB1	H3K9	Репресія транскрипції/ ампліфікації гена при меланомі
EZH2	H3K27	Репресія транскрипції/ порушення пов'язані з агресивністю пухлин, порушення регуляції при раку молочної залози, раку простати, множинній мієломі
NSD1	H3K36, H4K20	Активація транскрипції/ злиття з іншими генами ідентифіковано при лейкемії, множинній мієломі
DOT1	H3K79	Репарація пошкоджень ДНК/ залучений у розвиток лейкемії
Лізин деметилази		
LSD1	H3K4, H3K9	Репресія транскрипції/ порушення регуляції при раку молочної залози, надекспресія при агресивному перебігу раку простати
JMJD2C	H3K9	Активація транскрипції/ перебудова при лімфомі, ампліфікації при раку молочної залози та раку гортані
JMJD3	H3K27	Активація транскрипції/ порушення регуляції при агресивному перебігу раку простати
Білки, які «прочитують» метильовання лізинів		
ING4	H3K4	Супресор пухлин/ делеція при раку молочної залози, шиї та голови, знижена експресія при гліомі
BMI-1	H3K27	Онкоген/ надекспресія при лімфомі, лейкемії, колоректальному та раку молочної залози

Як вже зазначалося, метилювання гістонів знімається за допомогою різних ферментів, специфічних до певних амінокислотних залишків. JMJD2C є

К-деметилазою, яка каталізує видалення міток метилювання з H3K9, маркера, зазвичай пов'язаного з репресією генів. Ампліфікація JMJD2C (Jumonji Domain Containing 2C; також відомий як KDM4C - Lysine-specific demethylase 4) спостерігалася за різних форм раку, включаючи рак молочної залози та рак стравоходу. Було показано, що Lysine specific demethylase 1 (LSD1), К-деметилаза, яка відповідає за H3K9 і H3K4, надекспресуються за естроген-незалежного раку молочної залози, мезенхімальних пухлин та раку сечового міхура. Отже, деметилази та метилтрансферази гістонів мають важливе значення в процесі канцерогенезу.

Ацетилювання гістонів. У одному з перших досліджень гістонових модифікацій за розвитку раку було виявлено значне зниження загального рівня моноацетилювання гістонів. На сьогоднішній день накопичені докази порушення нормальної функції HAT (histone acetyltransferases) та HDAC (histone deacetylases), які призводять до змін структури хроматину та спостерігаються за канцерогенезу.

Як вже зазначалося, існує три родини HAT: Gcn5, p300/CBP та MYST. Була показана роль HAT кожної групи у канцерогенезі, що призводило або до активації, або до репресії різних генів. Так, порушення експресії HAT Gcn5 разом з компонентами Wnt (комбінація Wg (*wingless*) та Int) сигнального шляху, який зазвичай зазнає змін регуляції у ракових клітинах, спостерігається за раку молочної залози. Білки CBP та p300 здатні ацетилювати всі чотири корові гістони, а також негістонові білки, такі як p53, Rb, E2F та Myb (**my**elo**b**lastosis). Було показано, що гени обох вказаних HAT є важливими генами-супресорами пухлин. HAT ще однієї родини (MYST) важливі в гомеопоезі, і їх регуляція порушується за гострого мієлоїдного лейкозу. У випадках M4/M5 лейкемії стабільні та нестабільні транслокації t(8;16)(p11;p13) викликають злиття між MOZ (monocytic leukemia zinc finger; гістонова ацетилтрансфераза родини MYST) та CBP, що призводить до аберантного ацетилювання білків хроматина. Подібна ситуація спостерігається у деяких випадках гострого моноцитарного

лейкозу внаслідок транслокації t(8;22)(p11;q13), що призводить до злиття MOZ та p300.

Як вже згадувалось, HDAC – це ферменти, які каталізують деацетилювання гістонів та залучені у репресію транскрипції. Подібно до HAT, субстратом для них є не тільки гістонові, але і негістонові білки важливі для канцерогенезу, а саме p53, YY1 (Yin Yang 1) та STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3). У людини ідентифіковано близько 20 білків з HDAC активністю, і можливо, що різні HDAC відповідають за деацетилювання конкретних амінокислотних залишків хвостів гістонів та негістонових білків. У багатьох дослідженнях було показано зміни експресії HDAC при різних типах раку (Таблиця 15.2.2).

Таблиця 15.2.2. **Порушення регуляції HDAC за онкологічних захворювань**

HDAC	Експресія при раку	Генетичний доказ
Клас I (гомологи RDP3 білка дріжджів, ядерне місцезнаходження, повсюдна експресія)		
HDAC1	Надекспресія у раку шлунку, молочної залози, колоректальному, легенів, печінки та лімфомі Ходжкіна	Нокдаун спричиняє зупинку росту, знижує життєздатність та викликає апоптоз у ракових клітинах прямого кишечника, молочної залози та остеосаркомі; HDAC1/ HDAC2 нокдаун спричиняє зупинку росту фібробластів, геномну нестабільність, а також знижує виживання трансформованих клітин *in vivo*
HDAC2	Надекспресія раку шлунку, простати, колоректальному, легень, лімфомі Ходжкіна та Т-клітинній лімфомі шкіри	Нокдаун спричиняє зростання арешту, знижує життєздатність та викликає апоптоз у ракових клітинах прямого кишечника та молочної залози, викликає апоптоз та зменшення пухлин легень *in vivo*; HDAC1/ HDAC2 нокдаун спричиняє зупинку росту фібробластів, геномну нестабільність, а також знижує виживання трансформованих клітин *in vivo*
HDAC3	Надекспресія при раку шлунку та молочної залози, гострому лімфобластному лейкозі, коло ректальному раку, лімфомі Ходжкіна; зниження експресії у пухлинах печінки	Нокдаун у ракових клітинах прямого кишечника знижує виживання, спричиняє апоптоз в клітинах гострого лімфобластного лейкозу
HDAC8	Надекспресія при нейробластомі	Нокдаун знижує проліферацію клітин пухлин легень, прямої кишки та шиї
Клас IIa (гомологи RDP3 Hda1 білка дріжджів, рухаються між ядром та цитоплазмою, тканинно специфічна експресія)		
HDAC4		Нокдаун у клітинах хонрдосаркоми спричиняє експресію фактору росту ендотелію судин та

		уповільнює ріст пухлини, а також спричиняє апоптозу у пухлинах прямого кишечника та гліобластоми *in vivo*
HDAC5	Надекспресія у медулобластомі, зниження експресії в пухлинах легень	Нокдаун знижує ріст та життєздатність клітин медулобластоми
HDAC7	Надекспресія при гострому лімфобластному лейкозі, зниження експресії в пухлинах легень	Нокдаун спричиняє зупинку росту клітин раку молочної залози та прямої кишки
HDAC9	Надекспресія при гострому лімфобластному лейкозі, медулобластомі	Нокдаун HDAC9/10 інгібує гомологічну рекомбінацію та підвищує чутливість до виникнення пошкоджень ДНК та знижує ріст і життєздатність клітин медулобластоми
Клас IIb (гомологи білка дріжджів Hda1, в основному цитоплазматичне місцезнаходження, тканинно специфічна експресія)		
HDAC6	Надекспресія клітинах раку молочної залози, Т-клітинній лімфомі шкіри, зниження експресії в пухлинах легень	Нокдаун знижує експресію фактору росту ендотелію судин та життєздатність клітин з причини накопичення неправильно укладених білків
HDAC10		Нокдаун HDAC9/10 інгібує гомологічну рекомбінацію та підвищує чутливість до виникнення пошкоджень ДНК та знижує ріст і життєздатність клітин медулобластоми
Клас IV (гомологи у дріжджів не виявлені, цитоплазматичне місцезнаходження, тканинно специфічна експресія)		
Class 11	Надекспресія за раку молочної залози, печінки, нирок	Нокдаун спричиняє апоптоз у клітинних лініях раку прямої кишки, простати, молочної залози та яєчників

Експресія гістонових деацетилаз HDAC1, HDAC5 та HDAC7 може слугувати молекулярним маркером для ідентифікації перероджених тканин. За деяких форм раку, таких як рак простати, молочної залози, легень, печінки, шлунку та колоректальний рак, підвищення експресії конкретних HDAC пов’язане зі зниженням виживаності та гіршим прогнозом захворювання незалежно від форми раку та стадії захворювання. Більше того, підвищення експресії HDAC пов’язано з ключовими подіями формування пухлини, таких як епігенетична репресія гена-супресора пухлин *CDKN1A* (який кодує cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{waf1/cip1}$) та ключових генів, які кодують ферменти репарації розривів ДНК, наприклад, *breast cancer 1, early onset* (*BRCA1*) та *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (*ATR*). Проте підвищення експресії HDAC не завжди є маркером негативного прогнозу. Так, високі рівні експресії HDAC6

вказують на кращий прогноз у хворих на естроген-залежний рак молочної залози.

У мишей втрата моноацетилювання H4K16 характерна для ранніх етапів раку шкіри. В культурах тканин первинної лімфоми і колоректальної аденоми також ідентифіковано гіпоацетилювання у порівнянні із нормальними клітинами, що свідчить про важливу роль HDAC в процесі канцерогенезу. Довготривалий нокдаун гену *HDAC3*, HDAC першого типу, призводить до інгібування перенесення β-катеніну в ядро. Інгібування HDAC3 призводить до порушення Wnt сигнального шляху, підвищуючи експресію рецептора вітаміна D, що в свою чергу обумовлює підвищення чутливості цих клітин до впливу вітаміну.

Вищеописані особливості регуляції HDAC в ракових клітинах свідчать про те, що вони можуть бути новим об’єктом для боротьби з раком. Сьогодні в Сполучених Штатах Америки схвалені для використання два **препарати-інгібітори HDAC**, які застосовуються за шкірної Т-клітинної лімфоми (cutaneous T-cell lymphoma), а саме suberoylanilide hydroxaminc acid (vorinostat) та romidepsin. Крім того, низка препаратів проходять клінічні випробування (Таблиця 15.2.3). Інгібітори HDAC розділяють на групи згідно їх хімічної структури, включаючи гідроксамові кислоти (trichostatin A, vorinostat), карбонові кислоти (valproate, butyrate), амінобензаміди (entinostat, mocetinostat), циклічні пептиди (apicidin, romidepsin), епоксидні кетони (trapoxins) та гібридні молекули. Різні групи таких речовин мають різний механізм дії і інгібують різні HDAC, тому перед їх застосуванням необхідно перевірити ефективність їх дії на конкретний тип пухлини у конкретної людини. Загалом вважається, що інгібітори HDAC можуть призводити до апоптоза ракових клітин, затримки їх росту, старіння та імуногенності, а також можуть ініціювати їх диференціацію та інгібувати ангіогенез. Найбільш частим детектованим ефектом є апоптоз клітин пухлини. Варто зазначити, що такі препарати являють собою новий епігенетичних підхід в терапії раку. У подальшому їх можливо використовувати у поєднанні з іншими протипухлинними агентами, такими як

препарати хіміотерапії, а також з радіотерапією. Так, інгібітори HDAC у поєднанні з хіміотерапевтичними препаратами показують кращій ефект, ніж самі по собі.

Таблиця 15.2.3. **Стан клінічних досліджень інгібіторів HDAC**

Інгібітор HDAC	**Найвища фаза дослідження**	**Тип раку**	**Найкращий клінічний результат**
Panobinostat (LBH-589)	III	Т-клітинна лімфома шкіри	Т-клітинна лімфома шкіри - 74% пухлинне зменшення, лімфома Ходжкіна - 74% пухлинного зменшення, макроглобулінемія Вальденстрема - мінімальна або краща відповідь у 47% пацієнтів
Belinostat (PXD101)	II	Тимома	Суттєво підвищена виживаємість
Entinostata (MS2275)	II	Меланома	Деяка клінічна активність, багатообіцяючі фармакокінетичні та фармакодинамічні показники
Mocetinostat (MGCD01030)	II	Злоякісні пухлини В- клітин	Контроль хвороби (35%) за лімфоми Ходжкіна
Givinostat (ITF2357)	II	JAK2-експресивні мієлопроліферативні новоутворення	Полегшення свербіння (біля 100%), спленомегальна редукція
Practinostat (SB939)	II	Рак простати	Незначна клінічна ефективність, але багатообіцяючі фармакокінетичні показники
Chidamine (CS055/HBI-8000)	II	Солідні пухлини та лімфоми	Часткова відповідь у 5/31 пацієнтів під час I фази
Quisinostat (JNJ-26481585)	II	Т-клітинна лімфома шкіри	31,6% редукція пухлини
Abexinostat (PCI-24781)	II	Фолікулярна лімфома	Редукція пухлини у 86%, коефіцієнт повної відповіді 64%
CHR-3996	I	Різні (в основному солідні пухлини)	Сприятлива фармакокінетика та фармакодинамічні показники
AR-42	I	Гематологічні новоутворення	Мінімальна клінічна відповідь при мієломі та Т-клітинній лімфомі

Використання тваринних моделей для дослідження канцерогенеза

Тваринні моделі дозволяють ідентифікувати епігенетичні маркери канцерогенеза. Типовим методом дослідження тканино-специфічного раку є вивчення наслідків впливу токсикантів або трансгеннних конструкцій. Рак легень – це один з прикладів онкологічного захворювання, для якого епідеміологічний аспект добре досліджений, проте ранні етапи розвитку

хвороби погано охарактеризовані. Більше двох десятків років тому саме на тваринних моделях було продемонстровано, що дана форма раку може спричинятися 3-метілхолантреном (3-methylcholanthrene) та діетил-нітрозаміном (diethylnitrosamine). Сьогодні показано, що розвиток раку легень пов'язаний з підвищенням рівня метилювання промоторів генів регуляторів клітинного циклу *p27* та *p57* та змінами в метилюванні генів *p16, APC* та *Cdh13 (Cadherin 13).* Вважається, що хронічне запалення може призводити до соматичних мутацій і онкологічних трансформацій як при раку легенів, так і раку передміхурової залози. З використанням мишиної моделі трансгенної аденокарциноми передміхурової залози (transgenic adenocarcinoma of mouse prostate) було показано, що за раку простати снижується експресія гена фермента оксидативного стресу *Nrf2* (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) за рахунок метилювання ДНК та хроматинового сайленсингу. Використання мишиної моделі гострого лімфобластного лейкозу дозволило продемонструвати епігенетичний сайленсинг гіпотетичного гена-супресора пухлин *Idb4 (Inhibitor of DNA binding)* у мишей та людини, але не в солідних пухлинах. Використовуючи надекспресію онкогена *MYC* (*Myelocytomatosis*) в рамках бітрансгенної моделі Т-клітинної лімфоми у мишей було показано епігенетичні зміни, особливо метилювання ДНК, яке призводило до сайленсингу генів-супресорів пухлин *Pten* та *p53.*

Тваринні моделі є унікальною можливістю вивчення впливу терапевтичних препаратів при канцерогенезі. У мишей з індукованим раком порожнини рота було продемонстровано ефективність застосування деметилюючого агенту 5-азоцитидину. Деметилюючий агент зебуларин (zebularine) значно знижує метилювання промотра гена p16, що супроводжується зменшенням розмірів пухлин у мишей BALB/c nu/nu з карциномою сечового міхура людини. Вищезгадані інгібітори гістонових деацетилаз також вивчаються як претенденти на протипухлинні препарати саме на тваринах. Інгібітор HDAC воріностат відновлює експресію гена-супресора пухлин *BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death)*, який сайленсований у

лімфоїдних пухлинах, що було показано на мишиній моделі гострого лімфобластного лейкозу. Ще один інгібітор HDAC, вальпроєва кислота індукує гіперацетилювання гістонів і інгібує ангіогенез, покращуючи виживання мишей з медулобластомою.

15.3. МЕТАБОЛІЧНИЙ СИНДРОМ В КОНТЕКСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНИХ ЗМІН

Неінфекційні захворювання, такі як діабет та серцево-судинні захворювання (ССЗ) у світі є основними причинами смерті 35 мільйонів людей в рік. Зокрема, частота ожиріння, пов'язаного з хворобою обміну речовин, швидко зростає у зв'язку зі змінами в стилі життя, які характеризуються збільшенням калорійності харчування та зниженням витрат енергії. Одним із методів ідентифікації осіб, які знаходяться у групі ризику стосовно вищезгаданих захворювань є використання сукупності **критеріїв метаболічного синдрому** (metabolic syndrome; MetS) в якості діагностичного інструменту. Існує перелік симптомів, які стосуються клінічних проявів MetS, однак концептуально MetS можна визначити як поєднання серцево-судинних факторів ризику, включаючи ожиріння (особливо центральне ожиріння), порушення толерантності до глюкози та інсулінорезистентність, дисліпідемію, гіпертригліцеридемію, підвищення циркуляції вільних жирних кислот, зниження "гарного" холестерину (“good” cholesterol) та гіпертонію. Зовсім недавно до переліку клінічних проявів MetS було віднесено синдром полікістозу яєчників, атеросклероз, передзапальні стани, окислювальний стрес та неалкогольну жирову хворобу печінки (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD). Отже, MetS характеризується вельми складною, багатофакторною етіологією та патогенезом, включаючи взаємодію між спадковістю, харчуванням, відсутністю фізичної активності, поведінкою, соціологічними тенденціями, особливостями накопичення жиру, хронічними запаленнями, порушенням функцій мітохондрій та окислювальним стресом.

Клінічні ефекти MetS та його наслідків є очевидними, однак необхідно визнати, що цей синдром варто розглядати не просто як дисбаланс між споживанням та витратою енергії. Свідченням цього є той факт, що поки не існує ефективних стратегій лікування даного захворювання. Так, люди, які страждають надлишковою вагою або ожирінням, не обов'язково хворіють на цукровий діабет та ССЗ. Серед інших компонентів MetS, на додаток до надмірного індексу маси тіла, в першу чергу варто зважати на довгострокові порушення обміну речовин. Наприклад, використання вимірювання окружності талії в контексті MetS являє собою відносно простий метод розрахунку не тільки підвищеного ризику атеросклеротичних ССЗ, але і інших клінічних проявів. Багатокомпонентний характер MetS не тільки є «ключем» для ідентифікації індивідів, схильних до метаболічних порушень, але й надає можливість для дослідження його основних механізмів.

Вважалося**,** що клінічні прояви MetS можуть мати адаптивне значення для організму, який розвивається в умовах обмеженого харчування, особливо, якщо такі умови підтримуються протягом всього життєвого циклу. Таким чином, при недостатньому харчуванні матері індукується зсув в сторону накопичення відносно вихідного енергетичного балансу плоду.

Створена на грунті цих уявлень **гіпотеза «пластичності розвитку»** припускає здатність організму метаболічно адаптуватися на ранніх стадіях розвитку до несприятливих умов оточення для того, щоб відповідати умовам навколишнього середовища, які очікуються у майбутньому. Проте, іноді реалізація цього механізму може призводити до небажаних наслідків. Це має місце в регіонах, які зазнають різких соціально-економічних змін. Якщо розвиток організму припадає на такі часи, його оточення протягом дорослого життя не відповідає тому, яке було у період розвитку плоду, що і спричиняє формуванняя MetS.

Збіднене харчування може бути пов'язане як з глобальним недоїданням, так і з недостатністю тих чи інших поживних речовин, зокрема, білків, що призводить до внутрішньоутробної затримки росту плода та його низької ваги

при народженні. Однак невідповідне харчування матері під час вагітності може бути також пов'язане із споживанням продуктів з високим вмістом жирів та калорій, що характерно для західного суспільства. Це також може призводити до підвищеної схильності до MetS нащадків в дорослому віці. Наприклад, у людей гіперхолестеринемія, обумовлена особливостями харчування, призводить до утворення бляшок у аорті дітей, що у подальшому збільшує ризик розвитку атеросклерозу та ССЗ у останніх. Відповідні ефекти спостерігали у гризунів, коли материнське харчування з високим вмістом жиру під час вагітності призводило навіть у нащадків, переведених на нежирний лабораторний дієтичний корм, до метаболічно згубних наслідків, які зберігалися в зрілому віці (гіперінсулінемія, порушення толерантності до глюкози, гіпертензія, зміни структури кісток, дисфункція ендотелію, гіпертрофія адипоцитів, окислювальний стрес, гіперфагія, серцево-судинні ефекти та мітохондріальна дисфункція, а також підвищена експресія ліпогенезного гена, що веде до прогресування від NAFLD до більш гострого неалкогольного стеатогепатита). Харчування більшості людей в "прозахідному" суспільстві пов’язано з вживанням насичених жирів, як під час розвитку, так і в дорослому віці. Хоч особливості харчування не відрізняються в період внутрішньоутробного розвитку і дорослому віці, це все ж призводить до розвитку MetS у дорослому віці.

Надмірна вага батьків як ризик розвитку MetS. Дослідження на тваринних моделях засвідчили, що розвиток MetS може призводити до трансгенераційного (протягом декількох поколінь) ожиріння. У людей можуть спостерігатися подібні тенденції. Одночасно з епідеміями ожиріння спостерігається ріст серцево-судинних та метаболічних захворювань у дорослих. Відповідні тенденції відомі також для дітей та підлітків, разом з передчасним розвитком судинно-ендотеліальної гіпертензії та цукрового діабету 2 типу. Крім того, ріст частоти таких захворювань корелює зі збільшенням кількості повних жінок дітородного віку та кількості вагітних

жінок з ожирінням. У нащадків матерів з гестаційним цукровим діабетом або діабетом 1 типу спостерігається збільшення випадків захворювання на цукровий діабет 1 та 2 типів. Таким чином, материнське ожиріння пов'язане не тільки зі збільшенням материнської захворюваності, але і з прискореним розвитком MetS у нащадків. Проте, ризик розвитку MetS залежить не тільки від особливостей харчування матері. Ожиріння у чоловіків може впливати на кількість сперматозоїдів, їх рухливість, морфологію та пошкодження ДНК, що також може вплинути на здоров'я нащадків. Дослідження на щурах показали, що ожиріння самців призводить до дисфункції панкреатичних β-клітин у їх нащадків жіночої статі, що в свою чергу спричиняє порушення розвитку секреції інсуліну та толерантності до глюкози, які погіршуються з віком. Отже, залежні від ожиріння трансгенераційні ефекти можуть мати місце як по материнській, так і по батьківській лінії.

Епігенетичні аспекти метаболічного синдрому. Очевидно, що у випадку схильності до захворювання вирішальну роль відіграє наявність генетичного компоненту. Ідентифіковано відносно мало однонуклеотидних поліморфізмів (SNPs), пов'язаних з підвищеним ризиком MetS. В той же час, незначні зміни в експресії ключових генів метаболізму, концентрації білків та їх активності у відповідь на зміни харчування матері протягом розвитку плоду відповідають за підвищений ризик розвитку захворювання у нащадків. Виходячи з цього можна передбачити, що таке транскрипційне регулювання опосередковується епігенетично.

На сьогоднішній день можна виділи три основні напрямки досліджень: 1) ідентифікація епігенетичних маркерів, за допомогою яких можна було б передбачити майбутні проблеми зі здоров’ям, та детекція людей з найбільшим ризиком захворювання; 2) визначення факторів навколишнього середовища, які можуть впливати на експресію генів через епігенетичні механізми та призводити до ожиріння та розвитку MetS; 3) розробка нових терапевтичних стратегій, які можуть призвести до епігенетичних змін та покращення стану

хворих. У цьому зв'язку головними завданнями є підбір надійних епігенетичних маркерів регуляції ваги тіла, визначення того, які з них є найбільш вразливими до змін харчування, ідентифікація активних речовин, які можуть впливати на епігеном, визначення найбільш сприятливих періодів життя для подібних впливів і генетично компоненти даних процесів. На сьогоднішній день досягнуто певного прогресу у даній проблемі (Таблиця 15.3.1).

Таблиця 15.3.1. **Приклади епігенетичної регуляції метаболічних процесів пов'язаних з ожирінням та діабетом II типу**

Метаболічний процес	**Ген**	**Повна назва гена**	**Епігенетичний механізм**
Ліпогенез	*CEBRA*	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α	Ацетилювання та метилювання гістонів
	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor α	ДНК-метилювання
Регуляція апетиту	*LEP*	Leptin	ДНК-метилювання
	MC4R	Melanocortin 4 receptor	ДНК-метилювання
	NPY	Neuropeptide Y	ДНК-метилювання
	POMC	Proopiomelanocortin	ДНК-метилювання, ацетилювання та метилювання гістонів
Гомеостаз маси тіла	*FTO*	Fat mass and obesity associated	ДНК-метилювання
Гомеостаз глюкози	*ADIPOQ*	Adiponectin	ДНК-метилювання та ацетилювання гістонів
	GLUT4	Insulin-responsive glucose transporter 4	ДНК-метилювання та ацетилювання гістонів
	INS	Insulin	ДНК-метилювання та ацетилювання гістонів
Гіпоксія	*HIF1A*	Hypoxia inducible factor 1	ДНК-метилювання, ацетилювання та метилювання гістонів
Запалення	*IFNG*	Interferon γ	ДНК-метилювання
	TNF	Tumor necrosis factor α	ДНК-метилювання
Накопичення ліпідів	*FASN*	Fatty acid synthase	ДНК-метилювання
Стрес	*NR3C1*	Glucocorticoid receptor	Ацетилювання гістонів

Теплоутворення	*UCP1*	Uncoupling protein 1	ДНК-метилювання

Метилювання ДНК та MetS. Оскільки метилювання ДНК є стабільною епігенетичною міткою, його розглядають у якості одного з можливих механізмів розвитку MetS. Як згадувалось раніше, обмеження поживних речовин у раціоні самок гризунів може призводити до зниження метилювання ДНК промоторів генів ключових метаболічних регуляторів транскрипції, таких як *peroxisome proliferator activator receptor-α* (*PPARα*) навіть в тканині печінки потомства покоління F2. Крім того, обмеження білка у раціоні матері викликає гіпометилювання генів глюкокортикоїдного рецептора (*GR*) та *PPARα*, яке може супроводжуватись, принаймні частково, зменшенням концентрації фермента DNMT1, що має місце і у нащадків. За додавання фолатів у їжу рівні метилювання вказаних генів нормалізуються, але промотори інших генів, таких як інсулінового рецептора, зберігаються гіпометильованими. Вищеописані ефекти реалізуються через глюкокортикоїди, обумовлюючи гіпометилювання промотора рецептора ангіотензину (*angiotensin receptor; At1b)* у плода, викликаючи у останнього ранню наднирникову гіперекспресію цього гена, що в свою чергу закладає підгрунтя для розвитку гіпертонії в зрілому віці. У самок, які перебувають на збідненому білками раціоні протягом гестаційного періоду, ці патологічні зміни можуть бути виправлені за допомогою інгібітору 11β-гідроксилази метірапону (metyrapone). Як зазначалося вище, NAFLD передує розвитку MetS. Подібний перебіг подій описаний і для промотору *Liver X receptor* (*LXR*), який приймає участь у метаболізмі холестерину і жирних кислот, тим самим підтверджуючи можливість процесів довгострокового епігенетичного програмування у ліпідному гомеостазі печінки.

Вплив недоїдання матері на епігеном та метаболізм організму досліджувався на різних тваринних моделях. Однак, варто зазначити, що такі тваринні моделі з обмеженням білків у раціоні представляють собою холін-дефіцитний стан, який сам по собі обумовлює зміну профілю метилювання, що слід враховувати за їх використання. Крім того, ставлення до таких

експериментів у суспільстві на фоні підвищення ожиріння залишається дискусійним. З іншого боку, дослідження з використанням мишей Agouti (A(vy)) з ожирінням показали, що генетична схильність до ожиріння посилюється, коли алель A(vy) передається наступним поколінням, а додавання у їжу донорів метильних груп зменшує цей ефект. Високий вміст жирів у харчуванні матері потенційно може також обумовлювати ожиріння у нащадків шляхом змін метилювання ДНК генів, що детермінують рівень апетиту. У мишей, народжених матерями, яких утримували на дієті з високим вмістом жирів, спостерігається глобальне та ген-специфічне гіпометилювання промоторів, що призводить до довготривалих змін поведінки та надання переваги у харчуванні продуктам, які обумовлюють розвиток ожиріння, а саме з високим вмістом жиру та цукру. Гено-специфічне гіпометилювання спостерігається у промоторах таких генів, як транспортер дофаміну (*Dopamine active transporter, Dat*), опіоїдного рецептора (*Mu opioid receptor*; *Mor*) та препроенкефаліну (*Proenkephalin; Penk*). Тим не менш, залишається невизначеним, як саме описані модифікації метилювання обумовлюють зміни у виборі продуктів харчування. Цікаво, що зміни метилювання відбуваються у промоторах ключових генів метаболізму, що пов'язано з накопиченням жиру у мишей, яких вигодовували на раціоні, що сприяє ожирінню. Такі особливості метилування, однак, не корелюють з експресією генів, залучених у MetS, що вказує на інші механізми, які лежать в основі зв’язку дієти та збільшення жирової маси тіла.

Модифікації гістонів та MetS. Модифікації гістонів також можуть відігравати роль у процесі «онтогенетичного програмування» підвищеного ризику захворювання на MetS. У щурів білкове обмеження раціону матері спричиняє зниження на 75% експресії гена клітинного циклу p16 в молочній залозі у нащадків, що призводить до зростання ризику формування пухлин. Вважається, що таке зниження рівня експресії реалізується через зменшення ацетилювання гістона H4 та деметилювання гістона H3 в лізині 4 (H3K4me2).

Модифікації гістонів також відіграють роль у розвитку діабету 2 типу. У випадку **внутрішньоутробної затримки росту** знижується експресія фактора транскрипції гомеобокс 1 (homeobox 1 transcription factor; *Pdx1*), який відповідає за розвиток підшлункової залози та диференціацію β-клітин. В клітинах острівців Лангерганса ділянка хромосоми, в якій розташовується ген *Pdx1,* характеризується хроматином з відносно низьким рівнем метилювання, високим рівнем ацетилювання H3 і H4 та триметилювання H3K4me3 (мітки активного хроматину). У недорозвинутих острівцях Лангерганса за внутрішньоутробної затримки росту спостерігається знижений рівень ацетилювання гістонів, а H3K4me3 не детектується, в той час як наявна мітка гетерохроматину H3K9me2. Показано, що у приматів розвиток NAFLD за збагаченого жиром харчування матері корелює з гіперацетилюванням H3K14 у клітинах печінки плода та зниженням експресії HDAC1. Було показано зв'язок цих епігенетичних змін зі специфічними варіаціями експресії ключових генів, залучених у метаболізм печінки, а саме з підвищенням експресії глутамінової піруват-трансамінази 2 (glutamic pyruvate transaminase 2, *Gpt2*) та зниженням експресії гена периферійного регулятора циркадного ритму (*neuronal PAS domain protein 2, Npas2)* у нащадків особин, яких утримували на збагаченій жиром дієті.

Епігенетика та циркадні ритми. Більшість метаболічних процесів у живих організмах відбуваються ритмічно з періодом в ~24 години, а коливання активності збігаються з циклом день-ніч. Ці 24-годинні ритми найчастіше називаються **циркадними ритмами** (від лат. *circa* — близько, кругом і лат. *dies* — день), що регулюються **ендогенним молекулярним годинником,** робота якого забезпечується певними генами. Ці ритми пов’язані не тільки зі щоденним циклом світло-темрява, але також можуть бути синхронізовані іншими зовнішніми чинниками, в тому числі температурним та харчовим. Молекулярні механізми циркадних ритмів реалізуються в супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса, хоча також виявляються в периферичних тканинах, у тому

числі тих, які важливі для підтримання енергетичного гомеостазу. Циркадні ритми генеруються за допомогою унікальної системи транскрипційної та трансляційної взаємодій. Центральними елементами цієї системи є транскрипційні фактори, які містять **PAS домен**, а саме циркадний переривач циклів рухової активності (circadian locomotor output cycle kaput, **CLOCK**) та мозковий і мускульний аналог рецептора ARNT-1 (brain and muscle aryl 1-hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1, **BMAL1**), які формують гетеродимерний комплекс, що активує транскрипцію генів, які містять **E-box** енхансерні послідовності, у тому числі гени *Period (Per1, Per2, Per3*) та *Cryptochrome (Cry1* та *Cry2).* Білки Per та Cry формують комплекси і переміщуються в ядро, де вони негативно регулюють активність CLOCK та BMAL1. Гетеродимер CLOCK-BMAL1 також активує транскрипцію інших генів циркадного ритму, таких як аргінін-вазопресин (*arginine vasopressin; Avp*), D-сайт-зв'язуючий білок (*D-site binding protein; Dbp*), тиреотропний ембріональний фактор (*thyrotroph embryonic factor; Tef*), ядерний органний рецептор (*the nuclear orphan receptor RevErbα,* reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog), інгібітор 1 активатора плазміногену *(plasminogen activator inhibitor 1*; *Pai-1*), лактат-дегідрогеназа А (*lactate dehydrogenase A, Ldh-a*) та елемент відповіді рецептора активатора проліферації пероксисом [peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element; PPRET], які у свою чергу регулюють транскрипцію низки метаболічних ферментів.

Циркадні зміни у експресії також характерні для генів гормонів, таких як інсулін, глюкагон, адипонектин, лептин та грелін, та багатьох ядерних рецепторів. Зміни компонентів системи циркадних ритмів, наприклад, мутації гена *CLOCK* у мишей, призводять до появи ознак метаболічного синдрому, а саме гіперлептинемії, гіперфагії, гіперліпідемії, ожиріння, стеатозу печінки, гіперглікемії та гіперінсулінемії. Крім того, миші, мутантні за *CLOCK* та *BMAL1*, характеризуються згладженими добовими коливаннями рівня глюкози та тригліцеридів, які можуть бути відкоректовані шляхом утримання на кормах з високим вмістом жирів. Інші дослідження на тваринах показали експресію

генів циркадного ритму в супрахіазматичних ядрах гіпоталамуса і в ключових метаболічних тканинах підшлункової залози і печінки плода, засвідчуючи, що циркадні ритми на ранніх етапах розвитку чутливі до навколишнього середовища і фізіології вагітної самки. Дієтичне обмеження білків у вагітних самок щурів негативно впливає на циркадні ритми локомоторної активності нащадків. Відповідні факти були зафіксовані і для людини, що дозволило висловити припущення про те, що порушення циркадних ритмів сприяє проявам метаболічного синдрому.

Оскільки показано, що ожиріння матері призводить до підвищеного ризику розвитку MetS у нащадків, то можна припустити, що цей процес контролюється епігенетично. Активація деяких цільових генів комплексу CLOCK-BMAL1 супроводжується змінами в ацетилюванні гістона H3 в хроматині промоторних ділянок генів *Per1, Per2* та *Cry1*. Крім того, білок CLOCK сам по собі має гістон-ацетилтрансферазну активність, яка і забезпечує CLOCK-BMAL1-залежну трансактивацію генів циркадних ритмів. Таким чином, епігенетичні механізми запускають принаймні декілька клітинних метаболічних каскадів. Наприклад, **PPARα** є ядерним рецептором, який зв'язує ендогенні неестерифіковані "вільні" жирні кислоти, в свою чергу регулюючи транскрипцію генів, залучених в метаболізм ліпідів і глюкози, Гетеродимер CLOCK-BMAL регулює транскрипцію гена *PPARα,* що підвищує концентрацію білка PPARα, який зв'язується з PPAR-реагуючим елементом (PPRET), запускаючи транскрипцію гена *BMAL1.* Наведений приклад демонструє взаємозвязок між циркадним та метаболічним ліпідними процесами.

Особливості харчування також можуть виступати в якості регулятора активності генів циркадного ритму. Білок CLOCK ефективно зв’язується з BMAL1 та E-box елементами генів циркадного ритму завдяки своїй HAT-активності у присутності відновлених нікотинамід-аденін-динуклеотидів (NADH і NADPH). І навпаки, окислені форми цих кофакторів інгібують зв'язування ДНК з гетеродимером CLOCK-BMAL1 і, відповідно, знижують

активність генів циркадного ритму. CLOCK та BMAL1 зв'язується з гістоновою деацетилазою Sirtuin1 (SIRT1), утворюючи комплекс, для якого субстратом є NAD+. SIRT1 забезпечує коливання експресії генів циркадного ритму за рахунок дезацетилазної та HDAC активностей, впливаючи на BMAL1, PER та H3K9Ac/H4K16Ac в цільових промоторах. Таким чином, рівні NAD+ можуть підвищувати HDAC активність білка SIRT1, що призводить до транскрипційної репресії. Якщо SIRT1 не активний, то ритмічність в експресії генів циркадного ритму не спостерігається. Оскільки NAD + /NADH окислювально-відновна рівновага залежать від метаболічного стану клітини, то це співвідношення і визначає роботу CLOCK-BMAL1-SIRT1 комплексу та синхронізується харчуванням та ритмічною експресією генів циркадного ритму. Таким чином, порушення харчування в період розвитку може призвести до епігенетичних змін основних метаболічних генів, які обумовлять модуляції в ритмі експресії та підвищать сприйнятливість до MetS.

Існують факти, які свідчать на користь цієї гіпотези. Так, високий вміст жирів в продуктах харчування материнського організму призводить до підвищення експресії гену *Npas2* в клітинах печінки плода, принаймні частково, за рахунок гіперацетилювання лізину 14 гістону H3. Однак, як саме це пов'язано з фенотипом MetS, залишається невизначеним.

Отже, материнське ожиріння стає все більш поширеним в всьому світі, що призводить до розвитку MetS у нащадків. Епігенетичні механізми виступають в ролі посередників між середовищем як пренатального, так і постнатального розвитку, та формуванням хвороби. У багатьох дослідженнях було показано, що неоптимальне харчування матері (можливо, і батька) як до, так і під час розвитку плода призводить до формування конкретного епігенотипу (Рис 15.3.1). Такий епігенотип обумовлює профіль експресії генів метаболізму, що в свою чергу призводить до змін фізіологічних показників та розвитку захворювання. Важливо, що такі епігенетичні зміни, обумовлені харчуванням, можуть мати вплив і на фенотип наступних поколінь.

Рис. 15.3.1. Схематичне зображення формування MetS (адаптовано з Bruce and Cagampang, 2011).

15.4. КАРДІОВАСКУЛЯРНА ПАТОЛОГІЯ

Спадкова обумовленість ССЗ варіює в залежності від статі та умов проживання людини. Дані різних досліджень свідчать, що внесок генетичних чинників у розвиток таких захворювань складає від 40 до 80%. Іншими факторами, які здатні впливати на поширеність ССЗ, є взаємодія генетичних та середовищних чинників (потенційно опосередкованих епігенетично), різниця у генному імпринтингу та інші. Таким чином, наявні на сьогоднішній день дані дозволяють припустити, що епігенетичні механізми можуть відігравати значну роль у патогенезі ССЗ.

ССЗ та метилювання ДНК. Показано зв'язок метилювання ДНК з такими ССЗ, як **атеросклероз** та **запалення судин** (васкуліт). Хоча механізми такого зв'язку залишаються не повністю зрозумілими, існує декілька прикладів специфічних асоціацій. Так, **гени рецепторів естрогенів** *ESR1* та *ESR2* (estrogen receptors), які є генами-протекторами атеросклерозу та експресуються у гладких м'язових клітинах судин (ГМКС), гіперметильовані у хворих на атеросклероз. Втрата продуктів генів *ESR1* та *ESR2* може підвищувати ризик ушкоджень судин.

Інший приклад пов'язаний з відповіддю ендотеліальних клітин на **нестачу фолієвої кислоти**. Відсутність даного вітаміну епігенетично пов'язана з порушенням функцій ендотелію та інших аспектів ССЗ, включаючи ішемічну хворобу серця, анемію, атеросклероз та припадки. Низькі рівні фолієвої кислоти сироваткової крові призводять до підвищення рівня гомоцистеїну в крові. Гіпергомоцистеїнемія пов'язана зі зниженням синтезу оксиду азоту (NO) [через неправильне фосфорилювання серину ендотеліальної NO-синтази (eNOS)] та зменшення напрацювання фактора роста ендотелія судин VEGF (Vascular endothelial growth factor), протеїн кінази B (Akt) та позаклітинної регуляторної кінази 1/2. Гіпергомоцистеїнемія як така асоційована з пригніченням ангіогенезу, проліферації ГМКС, дисліпедемії, окислювального стресу судин та порушенням регенерації та функціонування ендотелію. Крім того, було показано, що при гіпергомоцистеїмії спостерігається зниження

загального рівня метилювання CpG та метилювання промоторів певних генів, що в свою чергу змінює рівні їх експресії. Підвищення рівня експресії транскрипційного фактора nuclear factor-κB через взаємодію з IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) та білками родини c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) може викликати порушення функціонування судин, оскільки запускає каскад реакцій, який призводить до запалення.

Порушення регуляції метилювання ДНК на різних стадіях ембріонального розвитку може призводити до вроджених пороків серця, порушень функціонування тканин судин разом з підвищенням ризику виникнення ССЗ. Виходячи з цього очевидно, що внутрішньоутробне середовище відіграє визначальну роль у цих процесах.

ССЗ та гідроксиметилювання цитозину . У 2009 році було виявлено роль гідроксиметилювання у ембріональному розвитку людини. 5-**гідроксиметилцитозин** (5hmC) – це проміжна сполука, яка утворюється за активного деметилювання 5mC ферментами TET (TET1, TET2 та TET3). 5hmC асоційований як з транскрипційно активним станом, так і з транскрипційно неактивним станом генів.

Існують дані з приводу наявності взаємозв’язку 5hmC та порушень серцево-судинної системи, хоча функціональне значення гідроксиметилювання ДНК до кінця не зрозуміле. Відповідно, було висловлено припущення, що 5hmC відіграє певну роль у детермінації тканино-специфічної експресії генів та регуляції експресії генів, які залучені у плюрипотентність та диференціацію клітин серцево-судинної системи. Крім того, 5hmC може бути одним з регуляторів розвитку серця та легень плоду, хоча такі механізми до кінця не зрозумілі.

Відомо, що багато генів, міжгенних ділянок та повторів є гідроксиметильованими у клітинах серця. Так, було виявлено, що зниження експресії гену *EGFR (Epidermal growth factor receptor),* пов’язане з гіперметилюванням або порушенням регуляції гідроксиметилювання,

спричиняє порушення диференціації мітрального клапану серця, що в свою чергу призводить до аортального стенозу та гіпертрофії лівого шлуночка.

Результати інших досліджень свідчать, що **ішемія-реперфузія** супроводжується глобальними змінами рівня 5hmC, але не 5mC. Так, було виявлено, що рівні 5hmC знижені в уражених ішемією-реперфузією мишиних нирках, але такого не спостерігається для 5mC. Показано також і специфічні зміни: ішемія-реперфузія знижує рівень 5hmC у генах *Cxcl10 (C-X-C motif chemokine 10)* та *Ifngr2 (Interferon gamma receptor 2)*, що призводить до підвищення синтезу мРНК даних генів. У ендотеліальних клітинах ген *Cxcl10* експресується у відповідь на різноманітні стани запалення, а отже, може брати участь у залученні лейкоцитів до місця запалення. Кількість мРНК ферментів гідроксиметилювання TET1 та TET2 істотно знижена у нирках, уражених внаслідок ішемієї-реперфузії, але рівень мРНК TET3 не змінюється. Наведені дані свідчать, що ішемія-реперфузія змінює експресію ферментів гідроксиметилювання TET у нирках мишей, що впливає на рівні 5hmC. А такі зміни в свою чергу обумовлюють зміну експресії генів, таких як *Cxcl10* у ендотеліальних клітинах, що загострює ішемію/реперфузію нирок.

ССЗ та гістоновий код. Гістоновий код відіграє важливу роль у багатьох аспектах нормального функціонування серцево-судинної системи, включаючи відповідь ендотеліальних клітин на гіпоксію та стрес, ангіогенез та відновлення після інфаркту міокарда.

Ген *NOS3*, який має відношення до ССЗ, став одним із перших, для яких була показана регуляція за участі гістонового коду. .Даний ген кодує фермент eNOS, який каталізує утворення NO з L-аргініна у кровоносних судинах. NO є фактором, який розширює судини та відіграє важливу роль у регуляції тонусу останніх і захисті від розвитку атеросклерозу. *NOS3* транскрибується у ендотеліальних клітинах судин. З іншого боку, ГМКС, які знаходяться під ендотеліальними клітинами у артеріях, не експресують eNOS. Така диференційна експресія контролюється за участі епігенетичних механізмів. У

ендотеліальних клітинах присутність гістонових міток активного хроматину (H3K9ac, H4K12ac та метилювання H3K4) на ділянці проксимального промотора даного гена забезпечує успішне рекрутування RNAPII. У ГМКС *NOS3* репресований через відсутність гістонових міток активного хроматину та наявність метилювання ДНК і білків MeCP2 у ділянці проксимального промотора даного гена. Ефективність синтезу eNOS у ендотеліальних клітинах залежить від дії багатьох факторів. За короткотривалого (протягом 1 години) впливу гіпоксії на вказані клітини спостерігається помітне зниження кількості eNOS. Таке зниження кількості даного білка здається функціонально нелогічним, оскільки продукт його діяльності, NO, має судинорозширювальний ефект. Проте вважається, що зниження концентрації eNOS може відігравати роль у активації індукованих гіпоксією факторів сигнальних шляхів ангіогенезу. Було показано, що механізм регуляції описаного вище зниження транскрипції NOS3 полягає у видаленні гістонів разом з мітками активного хроматину з промоторної ділянки даного гену. У випадку більш тривалої дії гіпоксії (24 години), гістони повертаються на промоторну ділянку, проте вже без модифікацій активного хроматину. Тому ген залишається неактивним і після тривалої гіпоксії. У відновленні експресії *NOS3* бере участь комплекс ремоделювання хроматину SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4; також відомий як BRG1). Отже, описаний вище епігенетичний механізм пояснює, принаймні частково, порушення функцій ендотелію при гіпоксії.

Проходження крові по судинах обумовлює постійний стрес внутрішніх стінок артерій. Такий процес носить назву **«стрес зсуву»** («shear stress»). **Ламінарний стрес зсуву** («laminar shear stress») також є важливим фактором регуляції експресії *NOS3* у ендотеліальних клітинах людини. Зокрема, було показано, що такий тип стресу призводить до активації та рекрутування гістонової ацетилтрансферази p300 у специфічну ділянку (**shear stress response element**; SSRE) промотору *NOS3*, що в свою чергу обумовлює ацетилювання певних лізинів на гістонах H3 та H4. Таке ацетилювання гістонів дозволяє

хроматину на даній ділянці гена у відповідь на дію стресу зсуву залишатися у відкритому, тобто транскрипційно-активному стані, забезпечуючи експресію *NOS3*.

Гістонові деацетилтрансферази HDAC також відіграють важливу роль при ішемії-реперфузії міокарду, особливо після інфаркту. Так, інгібування HDAC за допомогою обробки **TSA (trichostatin A)** у культурі ембріональних стовбурових клітин стимулює міогенез та ангіогенез. Більше того, у дослідженнях *in vivo* на мишах було показано, що обробка TSA покращує функціональне відновлення міокарда після інфаркту шляхом попередження трансформації міокарда та зниження у міокарді та сироватці крові фактору некрозу пухлини альфа (tumour necrosis factor alpha). Крім того, інгібування HDAC покращує формування нових міозитів та мікросудин у серці разом з підвищенням цитокінезу. Таким чином, інгібування HDAC може мінімізувати втрати функціональної активності міокарду після інфаркта, стимулюючи ангіогенез. У іншому дослідженні було показано, що введення TSA призводить до загострення атеросклерозу у мишей, які характеризуються відсутністю рецепторів ліпопротеїнів низької щільності. Цей факт підкреслює необхідність більш детального вивчення епігенетичних процесів, пов’язаних з ССЗ.

ССЗ та регуляторні РНК. **LncRNA** є одним із факторів регуляції активності генів. Можливо, порушення таких механізмів також призводить до розвитку ССЗ. Пошуки асоціацій нуклеотидних поліморфізмів на рівні геному з певними фенотиповими проявами (Genome-wide association study; GWAS) є потужним методом виявлення генетичної обумовленості різних захворювань. З використанням даного підходу було показано, що тільки частина ССЗ пояснюється генетичним поліморфізмом білок-кодуючих генів, а приблизно 43% SNP знаходяться у міжгенних ділянках. Багато з таких міжгенних ділянок транскрибуються у некодуючі РНК. Велика кількість SNP, асоційованих з ССЗ, локалізовані у некодуючих ділянках геному.

Втрата успадковуваності мультифакторіальних захворювань може мати епігенетичне пояснення. Так, часто не вдається знайти поліморфні варіанти локусів, відповідальних за генетичну схильність до ССЗ. Натомість виявляють епігенетичні ефектори у якості головних детермінант успадковуваності даного типу захворювань. Наприклад, хромосомний локус 9p21 є найбільш використовуваним маркером ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда та ішемічного інсульта. Цікаво, що даний регіон геному загалом позбавлений білок-кодуючих генів, проте містить lncRNA *ANRIL* (antisense noncoding RNA in the *INK4* locus), яка є медіатором епігенетичної регуляції генів.

ANRIL була вперше ідентифікована у сім'ї з меланомою нервової системи у непов'язаних з ССЗ дослідженнях локусу *INK/ARF.* Дане дослідження опублікували практично одночасно з ідентифікацією локусу ризику ішемічної хвороби серця, який перекривається з *ANRIL.* Така асоціація була виявлена незалежно чотирма групами вчених. Подальші дослідження показали, що функція *ANRIL* полягає у цис-рекрутуванні комплексів PRC1 та PRC2 на сусідні з локусом гени. *ANRIL* експресується у тканинах, які уражені атеросклерозом, що робить її основним кандидатом на участь у розвитку ССЗ. Високий рівень експресії *ANRIL* пов'язаний з утворенням атеросклеротичних бляшок і корелює з важкістю захворювання. На сьогодні рівень експресії *ANRIL* використовується у якості індикатора активності локусу ризику атеросклерозу.

Подальше висвітлення цих епігенетичних механізмів відкриває нові перспективи у розумінні регуляції генів, які залучені у розвиток ССЗ. Оскільки епігенетичні процеси є динамічним та відповідають на дію чинників середовища, то вони надають також пояснення причин різноманіття форм та важкості цих захворювань, що неможливо пояснити з точки зору тільки класичної генетики.

15.5. НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Останніми роками активно розвивається напрямок досліджень з визначення ролі епігенетичних модифікацій у контексті неврологічних захворювань. Кількість відомих порушень розвитку нервової системи, які були б асоційовані з епігенетичними змінами, обмежена. Деякі з таких порушень проявляються у осіб, які є носіями мутацій з частковою втратою функції (partial loss-of-function) або у мозаїків-носіїв Х-зчеплених рецесивних мутацій. На противагу цьому список нейродегенеративних захворювань, асоційованих з віком, для яких характерні зміни епігенетичних процесів, є великим. Найбільш відомими серед таких захворювань є **хвороба Гентінгтона** (Huntington's disease; HD; причиною є експансія повторів у гені *huntingtin, HTT),* сімейні форми **хвороби Паркінсона** (Parkinson's disease; PD; викликані мутаціями у різних генах, серед яких *α-synuclein, parkin, PTEN induced putative kinase 1, parkinson protein 7, leucine-rich repeat kinase 2* та *glucosidase- ß acid*) та сімейні форми **хвороби Альцгеймера** (Alzheimer's disease; викликані мутаціями у генах *amyloid precursor protein, presenilin1* та *presenilin2*). Насправді більшість випадків нейродегенеративних захворювань, включаючи вищеперераховані та **бічний аміотрофічний склероз** (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) і **лобно-скреневу деменцію** (frontotemporal dementia), спричинені дуже складною та поки що повністю не описаною взаємодією між генетичними та середовищними факторами.

Фактори оточення, такі як особливості харчування, стилю життя, травми, вплив хімічних агентів та важких металів, можуть бути відповідальними за епігенетичні зміни, які часто мають місце на початку та в процесі розвитку нейродегенеративних захворювань. Такий зв'язок факторів середовища з епігенетичними змінами, які вони індукують, був продемонстрований на прикладі хвороби Альцгеймера.

Серед вищезгаданих факторів найбільш вивченим є незбалансоване харчування. Добре відома роль вітамінів групи В у регуляції 1-вуглецевого метаболізму та у зміні потенціалу метилювання. 1-вуглецевий **метаболізм** регулюється присутністю фолату, вітамінів В6 та В12 (серед інших метаболітів)

і S-аденозилметіоніном (S-adenosylmethionine; SAM), який є донором метильних груп. Після перенесення метильної групи з SAM на різноманітні субстрати (ДНК, ліпіди, білки, РНК) перший перетворюється на S-аденозилгомоцистеїн (S-adenosylhomocysteine; SAH). SAH, який може виступати в якості негативного регулятора метилтрансферазних реакцій, в свою чергу в нормі перетворюється на гомоцистеїн. Функціонування двох сигнальних шляхів, в рамках яких відбуваються реакції, субратом яких виступає гомоцистеїн, потребують вітамінів групи В. Сигнальний шлях, за якого гомоцистеїн підлягає **реметилюванню** до метіоніну (попередник SAM), проходить за участі фолату та вітаміну В12. Внаслідок **транссульфурації** гомоцистеїн перетворюється на цистатіонін (який надалі управляє синтезом глутатіону) за участі вітаміну В6. Дефіцит цих трьох вітамінів, який може бути викликаний нестачею вживання чи розладом всмоктування, може бути причиною зменшення ефективності утворення гомоцистеїну та накопичення SAH, оскільки динамічна рівновага у реакції перетворення SAH на гомоцистеїн буде зсунута в сторону синтезу SAH. Зміни метаболізму 1-вуглецю у рамках одного з вищеописаних шляхів можуть призводити до гіпергомоцистеінемії та збільшення концентрації SAH, що призводить до порушень реакцій метилювання у клітині. Отже, нестача вітамінів групи В може призводити до нейродегенерації, порушуючи процес метилювання ДНК внаслідок нестачі донора метальних груп SAM. Добре відомо, що гіпергомоцистеінемія та нестача вітамінів групи В пов’язані зі зниженням об’єму головного мозку, порушенням когнітивних функцій та погіршенням пам’яті, причиною чого може бути дисбаланс і потенціалу метилювання, і окисно-відновного потенціалу, що викликає порушення надходження кальцію, формування амілоїдних бляшок та внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубків tau-білка, апоптозу та смерті нейронів за рахунок прямої або опосередкованої зміни експресії генів.

Однією з найбільш інтригуючих особливостей динаміки епігенетичних змін є те, що вони можуть виникати на початку життя організму, а проявлятися

у похилому віці. Дослідження когнітивних розладів показали, що розвиток хвороби може залежати від характеру взаємодії середовища та генотипу у ранньому житті, видозміни такої взаємодії можуть бути важливими у патогенезі психоневрологічних та нейродегенеративних захворювань.

Порушення в метилюванні ДНК, які призводять до нейродегенерації, можуть обумовлюватись мутаціями у генах, які кодують фактори метилювання. Наприклад, мутації гену *DNMT1*, які призводять до втрати активності ферменту та порушення метилювання ДНК, відповідальні за спадкові форми нейродегенеративних патологій центральної та периферійної нервової системи, такі як розлади розумової діяльності, сенсорна невропатія, втрата слуху, церебральна атаксія та нарколепсія. Вищезгадані мутації були виявлені в 20 та 21 екзонах гена *DNMT1* та супроводжувались як загальним зниженням рівня метилювання ДНК, так і гіперметилюванням конкретних послідовностей, і як наслідок, до формування патологічних фенотипів. Крім того, зв'язок між змінами в активності метилтрансфераз на нейродегенерацією був продемонстрований на тваринних моделях та культурах клітин. Наприклад, з використанням культури клітин NSC34 було показано, що підвищена активність DNMT може індукувати апоптоз нейронів. При індукуванні апоптозу камптотецином підвищувались рівні експресії метилтрансфераз *DNMT3a* та *DNMT1,* що призводило до збільшення рівня 5mC. В свою чергу надекспресія *DNMT3a* викликала нейродегенерацію та апоптоз нейронів, тоді як нестача цього білка та вплив інгібіторів ДНК-метилтрансфераз (прокаїнамід та RG108) затримували процеси апотозу у моторних нейронах. Аналогічний результат було встановлено і для моторних клітин, отриманих від хворих на бічний аміотрофічний склероз. Такі результати свідчать про зв'язок між активностю DNMT та розвитком ALS і, можливо, іншими нейродегенеративними процесами. Також було показано, що нокаут *DNMT1* підвищує нестабільність повторів у культурі клітин людини, а також викликає аберантне метилювання ДНК та експансію повторів CAG у локусі *spinocerebellar ataxia type 1* (*SCA1)* в зародковій лінії мишей.

На сьогодні ідентифіковано низку генів та локусів, які демонструють диференційне чи аберантне метилювання за деяких нейродегенеративних захворювань, особливо спорадичних форм останніх. Частина цих генів пов'язана тільки з певною формою захворювання (I група), тоді як інші – з багатьма (II група), більше того, деякі нейрокогнітивні порушення асоційовані з аберантним метилюванням ДНК не у одному, а у різних локусах.

Ген ***Frataxin*** **(*FXN*)** відноситься до I групи. Одна з його мутацій, яка пов'язана зі зміною кількості повторів GAA, призводить до виникнення атаксії Фрідрейха (Friedreich's ataxia). Крім того, було показано, що експресія такого мутантного алеля, яка обумовлює вік початку захворювання та важкість перебігу симптомів, залежить від особливостей метилювання ДНК, яка фланкує ці повтори. Порушення гену ***ataxin-2*** **(*ATXN2*)** призводять до іншої форми атаксії (spinocerebellar ataxia type 2; SCA2). У цьому випадку за розвиток захворювання також відповідає зміна кількості повторів іншого тринуклеотиду CAG, але їх конкретне число тільки частково впливає на вік початку захворювання, який може дуже сильно варіювати. Було показано, що за вік початку та тяжкість симптомів також відповідає метилювання ДНК, яке впливає на експресію мутантного алеля цього ж гена. Цікаво, що дисфункція даного гену обумовлює також на розвиток таких захворювань як хвороба Паркінсона, ALS та часткова лобно-скренева дегенерація, та цілком можливо, що принаймні частковий епігенетичний внесок у перебіг даних захворювань пояснюється особливостями метилювання послідовності цього ж гену. Крім того, роль метилювання ДНК у спорадичних випадках хвороби Паркінсона була продемонстрована у дослідженнях на гені ***SNCA (Synuclein alpha)***. Добре відомо, що мутації у даному гені, а також зміни у рівні його експресії асоційовані з даним захворюванням. Цікаво, що промотор *SNCA* деметильований у корі, чорній субстанції та путамені головного мозку у пацієнтів зі спорадичною формою хвороби Паркінсона, що вказує на роль метилювання ДНК у надекспресії гена *SNCA* у хворих. Гіпометилювання специфічної CG-збагаченої ділянки є характеристикою тільки певних ділянок

мозку хворих на спорадичні форми даного захворювання. Цей факт свідчить про різну схильність до геноспецифічного метилювання в різних відділах головного мозку при формуванні нейродегенеративних патологій. Крім того, і інші локуси також асоційовані з ризиком виникнення хвороби Паркінсона (*PARK16 - Parkinson disease 16, GPNMB - glycoprotein NMB* та *STX1B - Syntaxin 1B).*

Серед нейродегенеративних захворювань хвороба Альцгеймера є однією з найбільш проблемних, а отже, дослідження цієї патології вкрай важливе через дуже високу захворюваність та вартість санітарної допомоги хворим. Крім того, в рамках даного напрямку ведуться інтенсивні дослідження можливої ролі факторів зовнішнього середовища та стилю життя і епігенетичних причин у різниці початку, перебігу та тяжкості цього захворювання у різних людей.

Складна неменделівська етіологія хвороби Альцгеймера свідчить про те, що епігенетичні модифікації можуть бути механізмами, які обумовлюють початок та перебіг цього захворювання. З однієї сторони відомо, що патерн метилювання ДНК людини динамічно змінюється протягом життя та різниться у різних відділах мозку. З іншої, було продемонстровано, що епігенетичні зміни можуть відігравати роль у розвитку даного захворювання, оскільки певні локуси, такі як *PSEN1 (Presenilin1)*, деметильовані у хворих. Хоча дані стосовно особливостей метилювання ДНК у таких хворих потребують підтвердження, багато доклінічних симптомів свідчать про центральну роль у цих процесах саме метилювання ДНК. Зокрема було продемонстровано, що особливості харчування можуть призводити до змін у метилюванні з подальшим впливом на експресію гену *PSEN1,* формуванні та депонуванні агрегатів амілоїдних білків. В одному з досліджень трансгенні лінії мишей, які використовуються у якості моделі хвороби Альцгеймера (лінія TgCRND8), утримувались на дієті без вітамінів B12, B6 та фолату. Як було зазначено вище, дані вітаміни є важливими для проходження метаболізму 1-вуглецю та регуляції потенціалу метилювання в контексті активності метилтрансфераз. Середовищний стрес, спричинений нестачею вітамінів B, призвів до зниження

співвідношення SAM/SAH, а отже і потенціалу метилювання, інгібування DNMT та стимулювання ДНК-деметилаз, гіпометилювання промотора гена *PSEN1*, надекспресії даного гена, посилення формування та депонування амілоїдів у синильних бляшках та, врешті-решт, до когнітивних порушень. Додавання у їжу SAM може призводити як до фенокопіювання норми у мишей з хворобою Альцгеймера, так і до часткового відновлення даного фенотипу. У інших дослідженнях прямо або опосередковано було підтверджено роль вітамінів В та метилювання ДНК у молекулярних механізмах, пов'язаних з хворобою Альцгеймера. Проте було висловлено припущення, що зміни метилювання ДНК можуть відбуватися внаслідок накопичення амілоїдів, а не навпаки. Якщо це так, зміни метилювання ДНК можуть бути наслідком захворювання, а не його причиною.

Перші успіхи у розумінні епігенетичних механізмів нейродегенеративних захворювань пов'язані з дослідженням хвороби Альцгеймера. Одним з прикладів цього є вивчення ролі 5-гідроксиметилювання у регуляції експресії генів. Іншим прикладом є дослідження, яке стосувалося вищезгаданої теорії, згідно якої епігенетичні зміни можуть відбутися на ранніх етапах життя, але проявитися у похилому віці. Дана теорія надає дослідженням хвороби Альцгеймера поле для інтенсивних досліджень, яке розвиває **модель LEARn** (Latent Early-life Associated Regulation). Згідно даної теорії фактори середовища можуть мати згубний вплив на геном через встановлення шкідливих епігенетичних міток в ранній період життя (перщ за все, пренатально). Така ідея узгоджується із загальноприйнятим уявленням про те, що нейродегенеративні процеси часто розпочинаються за багато років до першої появи клінічних симптомів або їх молекулярних доказів. У той же час дана концепція пропонує моніторити взаємодію з середовищем на ранніх етапах життя, щоб знайти ефективні способи упередження таких патологічних процесів.

Через високу варіабельність симптомів хвороби Альцгеймера та інших нейродегенеративних порушень, яка стосується віку початку захворювання,

тривалості та тяжкості перебігу і серйозності симптомів, дуже цікавий підхід являють собою дослідження монозиготних близнюків, які демонструють дискордатність за такими захворюваннями. У нещодавніх дослідженнях було показано, що головною причиною фенотипової дискордатності монозиготних близнюків є епігенетичні відмінності, які обумовлені різними зовнішніми факторами. У якості прикладу можна навести дослідження на монозиготних близнюках деменції з тільцями Леві, хвороб Альцгеймера, Гентінгтона та атаксії. Між здоровими та хворими близнюками виявлено суттєву різницю у патернах метилювання ДНК.

15.6. ЕПІГЕНЕТИКА ШИЗОФРЕНІЇ

Шизофренія та споріднені захворювання, такі як біполярні розлади та аутизм, вважаються комплексними і гетерогенними за своєю етіологією захворюванням, що відображається у величині конкордатності менше 70% у монозиготних близнюків та неменделівському характері успадкування. Нещодавно було досягнуто кращого розуміння генетичних аспектів даних захворювань, а перелік мікроделецій та поліморфізмів, пов’язаних з ризиком шизофренії, дуже швидко поповнюється. Проте у великої кількості хворих генетичні причини захворювання взагалі не виявляються.

Враховуючи те, що за допомогою генетичних підходів не вдалося встановити причини захворювання, було висловлено припущення, що саме епігенетичні механізми (можливо, у взаємодії з генетичними факторами) можуть відігравати центральну роль у патофізіології шизофренії. Термін «епігенетика» у контексті неврології та трансляційної медицини вживається для опису низки молекулярних механізмів, які забезпечують підтримання структури та функціонування хроматина у постмітотичних клітинах та клітинах, які діляться. У цьому відношенні перспективними видаються посмертні дослідження головного мозку, за яких аналіз хроматину поєднують з кількісним визначенням РНК та білків для опису експресії генів.

Для шизофренії та інших психіатричних розладів характерна відсутність клітинної патології, натомість спостерігаються варіювання рівнів РНК, які кодують широкий спектр транскриптів, залучених у процеси нейтротрансмісії, мієлінізації та метаболізму. Для регуляції експресії цих генів важливе як метилювання ДНК, так і ковалентні модифікації гістонів у їх промоторах.

Посмертні дослідження мозку при шизофренії. До недавнього часу більшість робіт по дослідженню метилювання ДНК при шизофренії проводилися з використанням посмертних зразків тканин кори головного мозку. У низці піонерських досліджень, які були зосереджені тільки на незначній кількості генів-кандидатів, пов'язаних з порушеннями функцій кори при шизофренії, було продемонстровано різні рівні аберантного гіпер- чи гіпометилювання у контексті динуклеотидів CpG у регуляторних ділянках та промоторах. Таке явище описано для генів глікопретеїну позаклітинного матриксу *REELIN, catechyl-O-methyltransferase (COMT)* та *SOX10*, який кодує транскрипційний фактор, важливий для мієлінізації та функціонування олігодендроцитів. Такі зміни метилювання пов'язані зі зниженнями рівнів мРНК даних генів, що узгоджується з репресивною функцією метилювання CpG поблизу TSS. Проте роль метилювання *REELIN* та *COMT* не підтверджена у інших дослідженнях. Така ситуація може спричинятися низкою факторів. Наприклад, метилювання CpG у багатьох тканинах може бути чутливим до соціального середовища, ішемії, токсинів, вживання нікотину та алкоголю, психостимуляторів та антипсихотичних препаратів. Імовірно, що ці фактори також беруть участь у формуванні патернів метилювання ДНК у нервових тканинах, сприяючи тим самим їх зміни у посмертному мозку.

Більш комплексний аналіз метилювання ДНК приблизно 8 000 генів нещодавно проводили у лобовій корі хворих на шизофренію та біполярні розлади. Разом було ідентифіковано близько 100 локусів, які демонстрували зміни метилювання ДНК у порівнянні з контрольними зразками. Такі локуси об'єднують високо гетерогенну групу різноманітних генів, які регулюють

глутаматергічну (glutamatergic) та ГАМК-ергічну (GABAergic) нервову передачу та розвиток. Шизофренія та біполярні розлади демонструють подібні зміни метилювання низки генів, що корелюють з деякими клінічними, генетичними та нейрохімічними особливостями, загальними для обох порушень. Особливо важливо, що до списку локусів зі зміною метилювання ДНК входить принаймні один, дісбіндін (dysbindin), який обумовлює генетичний ризик психозу. Це цікаво ще й тим, що для низки локусів ризику показаний вплив поліморфізмів послідовності ДНК на епігенетичні модифікації хроматину клітин головного мозку. Крім того, у описаному вище дослідженні було виявлено, що кількість локусів з гіпер- та гіпометилюванням ДНК приблизно однакова, що робить малоймовірним припущення, щодо асоціації шизофренії з загальним дрейфом проти підвищення (або зниження) метилювання ДНК у мозку.

Слід відмітити, що загальна величина пов'язаних з захворюванням змін метилювання ДНК у порівнянні з контролем є незначною. Так, у роботі Мілла зі співавторами (Mill et al.) виявлено, що рівень метилювання одного з ключових генів, *WDR18 (WD repeat domain 18),* при захворюванні дорівнює 17% проти 25% у контролі. Проте слід відмітити, що складно навіть для однокопійних генів екстраполювати відсотки метильованої ДНК, які отримані з використанням гомогенатів тканин, на кількість клітинних ядер. Можливо, що зміни метилювання ДНК при шизофренії відбуваються у порівняно невеликій кількості клітин кори головного мозку.

Зміни модифікацій гістонів у хворих на шизофренію досліджувались з використанням або клітин периферійної крові, або посмертних тканин мозку у декількох роботах. Пізніше перевага надавалася дослідженням метилювання лізинів, які менше підлягають змінам при аутолізисі та іншим впливам після смерті. Як і метилювання динуклеотидів CpG у геномній ДНК, метилювання лізину та аргініну гістонів відіграє важливу роль у складній регуляції структури та функціонування хроматину, у відповідності з чим певна позиція модифікованого залишку у гістоні та кількість приєднаних метальних груп

обумовлюють різні стани хроматину, які характерні для транскрипційно активних або сайленсованих локусів. Лізин може бути модифікованим до трьох метильних груп, тоді як аргінін може бути одно- або диметильованим. Для послідовностей, які транскрибуються RNAPII, зазвичай характерні мітки H3K4me3 у нуклеосомах, які розміщені поряд з TSS, і більш широкий розподіл H3K36me3 або H3K79me2 вздовж транскрипційно активної ділянки. Модифікації H3K9me3, H3K27me3 та H3K20me3 пов'язані з репресованим хроматином, тоді як монометилювання H3K9 та H3K20 у клітинах людини асоційоване з активною транскрипцією.

У дослідженні, сфокусованому на двох модифікаціях H3K4me3 (мітка активного хроматину) та H3K27me3 (мітка репресованого хроматину) було показано, що для деяких хворих на шизофренію характерне заміщення модифікації H3K4me3 на H3K27me3 у хроматині клітин префронтальної зони поблизу TSS гену *GAD1* (glutamic acid decarboxylase; також відомий як GAD67), який кодує GABA-синтезуючий білок. Важливо, що зниження рівня РНК GAD67 суттєво впливає на долю кори головного мозку, гіпокамп та інші відділи переднього мозку та навіть на кору мозочка. Дійсно, заміщення H3K4me3 на H3K27me3 у хроматині гена *GAD1* у шизофреників супроводжується дефіцитом РНК GAD1(GAD67) у порівнянні з контролем.

Важливим питанням є повторюваність результатів досліджень епігенетичних змін за шизофренії. Як вже зазначалося вище, на сьогодні не викликає сумнівів існування гетерогенності геномного метилювання ДНК у різних людей, при цьому більша різниця спостерігається у дизиготних близнюків, ніж у монозиготних. Більше того, різниця патернів метилювання ДНК та модифікацій гістонів збільшується з віком. Тому не дивно, що у дослідженнях на посмертних тканинах мозку отримано результати, які можуть протирічити один одному. Так, незалежні дослідження метилювання ДНК промотора гена *REELIN* показали як відсутність змін даного показника у корі головного мозку, так і наявність аберантного гіперметилювання у різних

частинах гену. Такі результати можуть спричинюватись впливом зовнішніх факторів, однак механізми таких впливів залишаються не з'ясованими.

Інша проблема досліджень такого типу пов'язана з наявністю у мозку великої кількості різних типів клітин. Більшість методів епігенетичних досліджень потребують 10^3 або 10^8 ядер для отримання результату, і така кількість залучених у експеримент клітин обумовлює деякі складності. Багато досліджень по вивченню епігенетичних механізмів порушення регуляції експресії генів за шизофренії використовують тканинний гомогенат (який являє собою високо гетерогенну суміш), в той час, коли досліджувані гени часто експресується лише у певній субпопуляції нейронів або інших клітин. Тому описані вище епігенетичні зміни у мозку шизофреників можуть стосуватися лише невеликої популяції інгібіторних нейронів.

За досліджень епігенетичних міток у посмертних тканинах мозку шизофреників зазвичай виявляють зв'язок між рівнями певних РНК та певними епігенетичними мітками. Вважається, що будь-які зміни рівнів РНК, метилювання ДНК та модифікацій гістонів, які спостерігаються у посмертних тканинах, відповідають таким у живих тканинах мозку хворих на шизофренію. Проте, дуже мало відомо про стабільність або динамічну рівновагу епігенетичних міток у мозку людини загалом. Дослідження на культурах клітин показали, що у відповідь на застосування інгібіторів ДНК-метилтрансфераз та деполяризації, патерни метилювання ДНК протягом хвилин або годин зазнають змін у протилежних напрямках. Крім того, на сьогоднішній день машинерія як деметилювання ДНК, так і деметилювання гістонів добре охарактеризована, що може свідчити про зворотність даних міток. Більше того, у дослідженнях на гіпокампі гризунів було показано, що нейрональна активність впливає на експресію *Gadd45b* (*Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta*) та інші регулятори метилювання ДНК. Показано також, що здатність до навчання та пам'ять пов'язані з високо динамічними змінами метилювання ДНК *PP1 (Protein phosphatase 1), REELIN* та промоторів генів, які регулюють синаптичну пластичність. Отже, принаймні частина епігенетичних змін, описаних у мозку

хворих на шизофренію, не є довготривалими стабільними модифікаціями та можуть потенційно відображати короткотривалі патофізіологічні зміни. Проте у іншому дослідженні на 50 генних локусах кори головного мозку людей різного віку були виявлені високо динамічні зміни метилювання ДНК деяких генів, які відбувалися лише протягом пізнього пре- та раннього постнатального періодів, тоді як протягом наступного розвитку та старіння метилювання ДНК цих генів залишалося практично незмінним. Інші гени характеризувалися майже лінійним підвищенням метилювання ДНК з віком. Беручи це до уваги, цілком імовірно, що точна динаміка змін метилювання ДНК протягом розвитку та старіння є локусоспецифічною.

Ремоделювання хроматину та психотропні препарати (нейролептики). Як зазначалося вище, зміни метилювання ДНК у певних генах пов'язані з широким різноманіттям препаратів, які застосовуються при нервових розладах. Цікаво, що у дослідженнях 1960 та 1970 рр було показано, що хворі на шизофренію, які приймали метіонін (донор метильних груп у низці біохімічних процесів), часто демонстрували ускладнення симптомів захворювання. Доклінічні дослідження промоторів GABAergic генів свідчать, що надмірний прийом метіоніну може призводити до аберантного метилювання ДНК та гістонів у певних локусах, що в свою чергу веде до порушення регуляції транскрипції генів і подальшого ускладнення стану хворого.

Якщо припустити, що точна регуляція метилювання ДНК та модифікації гістонів є важливою для нейробіології психозу, то можна передбачити, що на ці механізми будуть впливати антипсихотичні речовини. Були виявлені незначні зниження глобального метилювання ДНК у мозку тварин, які зазнавали впливу галоперідолу. Крім того, зміни дофамінової системи та інших рецепторів, які є мішенями антипсихотиків, пов'язані через різні сигнальні шляхи з процесами ремоделювання хроматину та механізмами метилювання ДНК та модифікації гістонів. Більше того, у дослідженні рівнів метилювання ДНК приблизно 8000 промоторів генів, тільки один - *mitogen-activated protein kinase I (MEK1)* –

демонстрував зворотній зв’язок з тривалістю впливу антипсихотичних препаратів. Фосфорилювання MEK1 також змінювалося у мозку тварин, які зазнали впливу нейролептику з іншим механізмом дії, клозапіну, що свідчить про різноманіття шляхів, за допомогою яких антипсихотичні ліки впливають на активність MEK1. Конкретна роль білка MEK1 у перебігу психозу залишається не визначеною, хоча відомо, що даний білок та інші компоненти сигнального шляху MAPK регулюють розвиток та дозрівання нервової системи. Більше того, було показано, що активність H3K4-специфічної гістонової метилтрансферази MLL1 (mixed-lineage leukemia 1) підвищується за впливу клозапіну у посмертних тканинах мозку тварин та людини. Вважається, що такий ефект обумовлений опосередкованою взаємодією клозапіну та гістонової метилтрансферази.

РОЗДІЛ 16. ЕПІГЕНЕТИКА ПОВЕДІНКИ

Нервова система людини анатомічно та функціонально дуже складно організована та складається з великої кількості типів нервових клітин, які об'єднуються у точні схеми, що проводять імпульси, забезпечуючи всю різноманітність поведінкових реакцій. Складність даній системі додають морфологічна спеціалізація аксонів, дендритів та синапсів кожного нейрона. Імовірно, що така надзвичайна складність будови та функціонування забезпечується часовою та просторовою різницею регуляції експресії генів протягом розвитку нервової системи. У мозку дорослих людей експресія генів перебуває під сталим контролем не тільки у певних ділянках мозку та типах клітин, а і таких умовах, як відпочинок або активний стан, або за зовнішніх стимулів. Така ситуація досягається за рахунок метилювання ДНК, модифікацій гістонів та експресії miRNA.

Під **епігенетикою поведінки** розуміють дослідження епігенетичої компоненти фізіологічних, генетичних, середовищних та онтогенетичних аспектів поведінки у людини та тварин. Експеримети зазвичай стосуються хімічних модифікацій білків та ДНК, змін експресії генів та інших біологічних процесів, які лежать в основі нормальної та патологічної поведінки. Даний напрям є міждисциплінарним та потребує залучення таких наук, як фізіологія та психологія, психофармакологія, генетика та біохімія. Хоча в останній час епігенетика як така дуже бурхливо розвивається, її дослідження в контексті поведінки тільки починаються. Проведені роботи стосуються різних поведінкових аспектів, з-поміж них, зокрема, вплив різних речовин на поведінку, психіатричні та нейродегенеративні захворювання, формування пам'яті та навчання, розвиток нервової системи та відповідь на стрес.

У дослідженнях пам'яті та здатності до навчання на тваринних моделях було виявлено важливість ацетилювання гістонів для ініціації експресії генів, які відповідають за збереження засвоєної інформації у довготривалій пам'яті. Наприклад, використовуючи трансгенних мишей, нокаутних за CBP-

асоційованою ацетилтрансферазною активністю, було показано, що довготривала пам’ять може бути відновлена за допомогою інгібіторів гістонових деацетилаз. Крім того, автори вказують, що незалежно від активності CBP, ацетилювання певних генів може подовжувати час їх експресії шляхом підтримки відкритого стану хроматина. Також було продемонстровано, що за певних умов існування хімічно індуковані порушення пам’яті у мишей здатні відновлюватися за рахунок підвищення загального рівня ацетилювання та метилювання лізину H3K4.

Було показано наявність епігенетичної регуляції таких генів як *Bdnf, Reln (Reelin), Ppp1ca (Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit)* та *Hes5 (Hairy/enhancer of split)* в умовах збереження в памяті страху. У щурів динамічне метилювання ДНК регулює експресію гена синаптичної пластичності *Reln* та гена-супресора пам'яті *Ppp1ca* в умовах страху. В умовах запам’ятовування страху підвищується рівень DNMT1 в гіпокампі, що пов’язано з гіперметилюванням гена *Ppp1ca,* яке знижує його експресію. Це також пов’язано зі гіпометилюванням промотора гена *Reln,* що узгоджується з фактом підвищення його експресії в умовах запам’ятовування страху. Цікаво, що такі зміни метилювання відновлюються до вихідного рівня через 24 години після дії фактора, який викликав страх, що свідчить про динамічність метилювання ДНК у мозку дорослих щурів.

Особливості відповіді на стрес у тварин часто використовуються у дослідженнях депресії та тривожності. Тому не дивно, що епігенетичні дослідження відповіді на стрес сфокусовані на генах та відповідно білках, які пов’язані з гіпоталамо-гіпофіз-наднирвовою (hypothalamus–pituitary–adrenal; HPA) віссю, наприклад, гени *Gr, Crf, Bdnf, Era1b (Estrogen receptor alpha 1b)* та NGFI-A (Nerve growth factor-induced protein A). Дослідження різних видів стресу, включаючи порушення материнського піклування та поведінку уникання умов формування страху у тварин, показали, що такі впливи обумовлюють епігенетичні зміни, які в свою чергу призводять до змін експресії генів. У випадку гена *Crf* було продемонстровано, що вплив стресу на дорослих

тварин призводить до зниження метилювання ДНК в сайтах зв'язування транскрипційного фактора CREB (cAMP response element-binding protein). Відсутність метилювання у таких сайтах робить можливим зв'язування з ними CREB, що супресує транскрипцію гена *Crf*. Таке деметилювання асоційоване з соціальною поведінкою уникнення умов стресу, проте і метилювання, і поведінка відновлюються внаслідок прийому антидепресантів. А отже, такі результати свідчать про існування зв'язку між навколишнім середовищем, певні фактори якого призводять до змін на молекулярному рівні, що пов'язані з поведінковими особливостями, та потенційною зворотністю цих змін та ефектів під впливом хімічних терапевтичних агентів.

Цікавими є дослідження по виявленню ефектів різних речовин, наприклад, наркотичних препаратів, на поведінку. Вважається, що кокаїнова залежність являє собою порушення нейропластичності. Непереборна тяга до наркотиків може бути результатом довготривалих структурних та функціональних змін синапсів, що в кінці кінців призводить до посилення адаптивної відповіді в результаті прийому кокаїну та може призвести до передозування останнім. Було показано, що довготривалий прийом мишами кокаїна обумовлює зниження глобального рівня модифікації гістонів H3K9me2 у прилеглому ядрі (nucleus accumbens), ключовій ділянці головного мозку, яка залучена у формування ефекту наркотичного стану. Таке зменшення рівня вказаної гістонової мітки у прилеглому ядрі відбувається за рахунок зниження експресії G9a гістонової метилтрансферази, специфічної до H3K9me2. В свою чергу, зниження експресії G9a опосередковане кокаїн-індукованим транскрипційним фактором ΔFosB. Крім того, було показано, що зниження експресії G9a підвищує пластичність дендритного хребта нейронів у прилеглому ядрі та підсилює наркотичний вплив кокаїну шляхом усунення мітки репресивного хроматина H3K9me2 у певних генах, підвищуючи рівень їх експресії. Індуковане впливом кокаїну зниження експресії G9a та відповідно мітки H3K9me2 сприяє індивідуальній вразливості до стресу та формуванню

депресивної поведінки. Такі результати узгоджуються з клінічними даними, за якими наркоманія та депресія часто співіснують.

Результати досліджень на тваринах самі по собі є вкрай важливими, але їх апроксимація на людину потребує перевірки. Для ідентифікації змін метилювання ДНК та структури хроматину зазвичай використовують лейкоцити периферійної крові людей або пуповинну кров. Так, було показано, що депресія матері у третьому триместрі вагітності супроводжується підвищенням рівня метилювання в аналогічних ділянках ДНК новонароджених немовлят. Це призводить до формування підвищених рівнів кортизолу у дітей трьохмісячного віку у відповідь на стрес. Припускають, що така посилена чутливість до стресу у немовлят, яка обумовлена стресами матері в третьому триместрі вагітності, опосередкована підвищенням метилювання промоторної ділянки гена *GR*. У іншому дослідженні було продемонстровано, що стан гіперметилювання *GR* внаслідок тривалого стресу протягом вагітності підтримується у нащадків до підліткового віку. Показано, що використання антидепресантів у пацієнтів з сильними депресивними розладами підвищує рівень експресії *BDNF* у периферійній крові. Це видається важливим, оскільки вважається, що саме зниження рівня експресії даного гена і призводить до депресивних станів. Цікаво, що у пацієнтів, які позитивно відповідають на лікування антидепресантами, спостерігаються зміни рівня гістонової модифікації H3K27me3. Зниження рівня цієї мітки (характерна для репресованого хроматина) пов’язане з підвищенням експресії гена *BDNF* тільки у тих людей, які позитивно відповідають на лікування. Більше того, наявна достовірна обернена кореляція між глибиною депресії у людини та рівнем експресії *BDNF*. Усе вищеописане свідчить, що поведінка може бути опосередкована епігенетично зовнішніми чинниками, проте необхідна наявність ефекторів, які сприяють запуску епігенетичної машинерії. Периферійну кров використовують для оцінки змін метилювання ДНК і при інших психічних розладах, таких як посттравматичний стрес, біполярні розлади та аутизм.

Як вже зазначалося, для вивчення змін метилювання ДНК окрім периферійної крові використовують тканини посмертного мозку. Так, встановлено наявність змін в метилюванні ДНК генів *RELN, SOX10* та *GAD1* за шизофренії. В дослідженнях прифронтальної кори посмертного мозку було виявлено зв'язок між епігенетичними змінами в генах *SSAT (Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase), GABAAR (Gamma-aminobutyric acid receptor), BDNF* та його рецептора *TRKB (Tropomyosin receptor kinase B)* та суїцидальною поведінкою. Підвищення метилювання промотора гена *BDNF* є сайт-специфічним, і його загальний рівень не відрізняється у самогубців та у контрольній популяції. Дослідження вкорочених форм TRKB засвідчило підвищення рівня метилювання у двох сайтах даного гена у фронтальній корі у людей, які здійснили суїцид. Підвищений рівень метилювання асоційований зі зниженням експресії *TRKB* у фронтальній корі, але не у мозочку, що свідчить, принаймні частково, про регіональну специфічність описаного явища.

Експресія *TRKB* за суїциду регулюється також через модифікації гістонів. Виявлено високі рівні метилювання H3K27 у промоторі вкороченої форми рецептора TRKB, TRKB.1. Це підвищення метилювання гістонів пов'язане зі зниженням експресії гена, а різниця метилювання ДНК даного промотора спостерігається не у всіх випадках. Крім того, подібно до описаних вище досліджень на периферійній крові, показано, що вживання антидепресантів супроводжується зниженням рівня H3K27me3 і підвищенням рівня експресії *BDNF* у посмертному мозку. Цей факт свідчить, що терапевтичні препарати впливають на гістонові модифікації як у тварин, так і у людини.

Стосовно miRNAs, хоча відома їх роль у розвитку нервової системи, наявний дуже обмежений об'єм інформації у контексті формування поведінки та психічних розладів. Зокрема відомо, що вони залучені у процеси нейрональної пластичності у мозку дорослих організмів, а саме регулюють синтез синаптичних білків, морфогенез дендритних відростків та пов'язані з захворюваннями порушення нейрональної пластичності. Більшість miRNAs експресується тканиноспецифічно, і більше половини відомих miRNAs

експресується у мозку. Крім того, частина miRNAs демонструє часові відмінності експресії у головному мозку. Тому передбачається, що вони відіграють важливу роль у формуванні поведінки.

Цікаво, що різні miRNAs локалізуються у різних компартментах нейронів. Так, було виявлено, що концентрація miR-26a значно вища у дендритах, ніж у сомі. Низка miRNA наявна у дистальних аксонах симпатичних нейронів, а саме miR-15bm miR-16, miR204, and miR-221. Загалом же більшість miRNAs детектуються у синаптичній фракції. Прикладами таких РНК, які наявні у синапсах, є miR-200c, miR-339, and miR-322, miR-318, miR-29a, miR-7, та miR-137. Крім того, у синаптичній фракції також виявлені незрілі miRNA, тоді як зрілі молекули здебільшого спостерігаються у розчинному компоненті синаптичної фракції, що свідчить про локальний процесинг даних РНК у синапсисах. У синопсисах також присутні білки, необхідні для процесингу попередників miRNA, а саме Dicer, eIF2C (або AGO1), Fragile X Mental Retardation protein (FMRP), компонент комплексу RISC *Drosophila* білок Armitage та його гомолог у ссавців MOV10 (Moloney leukemia virus 10).

Безсумнівну участь miRNA у процесах пам’яті та здатності до навчання демонструють роботи по вимкненню активності Dicer, який бере участь у процесингу даного типу РНК. Специфічна делеція у *Dicer*, яка призводить до нокауту експресії гена, у CaMKII (Calcium/calmodulindependent kinase II)-позитивних нейронах у гіпокампі та корі головного мозку під час розвитку організму у мишей, обумовлює появу низки фенотипічних проявів, зокрема, мікроцефалії. У іншому дослідженні була вимкнена експресія гена *Dicer1* у передньому мозку мутантних мишей, що призводило до зниження рівня характерних для головного мозку miRNA. Цікаво, що такі миші демонстрували кращі показники у деяких поведінкових тестах на формування пам’яті та здатності до навчання. Крім того, У *Drosophila,* де формування довготривалої пом’яті контролюється сайленсинговим комплексом RISC, у звичайному стані основний компонент даного комплексу, Armitage, локалізується у синапсах, але

деградує під час нейтральної активності або за формування довготривалої пом'яті, що вказує на участь RISC у регуляції синаптичних білків.

Варто зазначити, що у процесі формування пам'яті приймають участь не лише miRNAs як такі, важлива також їх взаємодія з регуляцією активності генів на рівнях метилювання ДНК та модифікацій гістонів. Так, відомо, що для нормального запам'ятовування умов стресу необхідна NAD-залежна деацетилаза Sirt1, але для проходження цього процесу потребується miR-134, яка безпосередньо впливає на CREB-залежний сигнальний шлях. Надекспресія miR-132 у трансгенних мишей призводить до збільшення щільності дендритних відростків, але погіршує здатність таких мишей до розпізнавання нових об'єктів. Крім того, такі трансгенні миші характеризуються зниженням експресії білка, який розпізнає метильовану ДНК, MeCP2.

Показано, що miR-128b бере участь у формуванні пам'яті щодо зникнення страху (fear-extinction memory), а miR-128 залучена у формування сенсомоторної пам'яті. Отже, miRNAs беруть участь у формуванні різних типів пам'яті, що може вказувати на еволюційну консервативність механізмів запам'ятовування.

Оскільки роль miRNAs у синаптичній пластичності не викликає сумнівів, а кокаїнова залежність пов'язана з процесами, які відбуваються у синапсах, то не дивно, що встановлена участь даного типу РНК у формуванні залежності від наркотичних речовин. Тривалий вплив кокаїну призводить до підвищення експресії маркерної miR-212 у ділянці головного мозку щурів (dorsal striatum), яка відповідає за потяг до кокаїну. Таке підвищення експресії miRNA супроводжується підвищенням рівня як загального, так і фосфорильованого CREB та активує CREB-опосередкований сигнальний шлях. Крім того, встановлено взаємну регуляцію експресії miR-212 та MeCP2 за принципом оберненої петлі, що в свою чергу впливає на опосередковану прийомом кокаїну експресію BDNF. Крім того, було показано, що за хронічного вживання кокаїна спостерігається зниження експресії let-7d і miR-124 та підвищення експресії miR-181a у мезолімбічній дофаміновій системі (mesolimbic dopaminergic

system). Делеція у гені білка, який бере участь у процесингу miRNAs, Ago2 у мишиних нейронах, які експресують дофаміновий рецептор D2, призводить до порушення регуляції різних груп miRNAs та пом’якшення кокаїнової залежності у таких мишей.

miRNAs також залучені у зміни фізіології головного мозку, які лежать в основі алкоголізму. У мозку ссавців вплив алкоголю швидко підвищує рівень експресії miR-9 у стріатумі і супраоптичному ядрі. Це в свою чергу призводить до порушення експресії альтернативного сплайс-варіанту потенціал-залежного калієвого каналу (voltage-activated potassium channel) через зв’язування miR-9 з 3’UTR даної мРНК. Такий результат свідчить про потенційну роль miRNAs у регуляції альтернативного сплайсингу певних мРНК за формування наркотичної залежності.

Було продемонстровано роль miRNAs у реорганізації експресії генів за формування депресивної та суїциідальної поведінки. Так, відбується глобальне зниження експресії miRNAs у префронтальній корі людей з суїцидальною поведінкою, які знаходилися у стані депресії та не приймали антидепресанти. Такі зміни експресії miRNAs можуть тягнути за собою зміни транскрипції багатьох генів, включаючи ті, для яких уже відомий зв’язок з депресіями та суїциїдальною поведінкою. Крім того, було показано роль miR-185 у регуляції вкороченого транскрипту рецептору тропоміозин-залежної кінази B (TrkB)-T1, зниження експресії якого пов’язане з суїцидальною поведінкою. Нещодавно на тканинах посмертного мозку було виявлено, що рівень експресії miR-1202 також є суттєво зміненим у людей з депресією.

РОЗДІЛ 17. ЕПІГЕНЕТИКА ТА СТАРІННЯ

Старіння можна розглядати як процес старіння клітин в тканинах дорослого організму, що призводить до порушення реакції на стрес, гомеостатичного дисбалансу та супроводжується підвищеним ризиком захворювання. Молекулярні основи старіння вивчаються в багатьох експериментальних контекстах, а саме щодо вкорочення теломер, пошкодження ДНК, дегенерації клітин або структур органів, а також зміни експресії генів. Вважається, що епігенетичні фактори можуть мати ключове значення у регуляції змін експресії генів та дестабілізації генома в процесі старіння. Хоча внесок епігенетичних чинників у розвиток низки захворювань людини, таких як рак, діабет та нейродегенеративні розлади і був доведений, епігенетичні зміни, які відбуваються в нормальних тканинах внаслідок старіння, все ще залишаються недостатньо вивченими. Дані, отримані на безхребетних модельних організмах, які ретельно вивчені в контексті довголіття, свідчать, що основні механізми старіння регулюються за допомогою епігенетичних факторів. В той же час у ссавців відповідні процеси вивчені недостатньо. Монозиготні близнюки слугують інформативною моделлю для вивчення епігенетичних змін, пов'язаних зі старінням: такі дослідження свідчать про те, що ці зміни можуть накопичуватися протягом довгого періоду та характеризуватися індивідуальними особливостями. Синдроми передчасного старіння, такі як прогерія Хатчінсона-Гілфорда та синдром Вернера, також використовуються для вивчення молекулярних механізмів старіння, хоча варто наголосити, що ці моделі не можуть повною мірою дати уявлення про процеси старіння в нормі. Сьогодні відомо лише кілька епігенетичні дефектів, пов'язаних з цими розладами.

Експериментальні моделі для дослідження процесів старіння. Епігенетичні зміни, пов'язані зі старінням, виявлені у багатьох організмів, від дріжджів до людини. Тим не менше, для більшості з цих моделей конкретні

процеси, в які залучені епігенетичні фактори, та їх вплив на старіння все ще залишаються недостатньо дослідженими. Виключення складають дріжджі. Відомо, що інактивація гістондеацетилази Sir2 супроводжується скороченням реплікативної тривалості життя у *S. cerevisiae*, тоді як її активація має протилежний ефект. Як відомо, при старінні у деяких ліній дріжджів спостерігається накопичення екстра-хромосомних самореплікуючіх кільцевих рибосомальних ДНК (extrachromosomal rDNA circles, ERCs). Переміщення білкового комплексу, в який входить Sir2, з теломерного району в ділянку повторів генів рибосомальних РНК запобігає цьому процесу. Крім того, за зниження експресії Sir2 протягом процесу хронологічного старіння у дріжджів спостерігається підвищення рівня ацетилювання H4K16 в субтеломерних ділянках. Цікаво, що рівень ацетилювання H4K16 в субтеломерних районах регулюється активністю Sas2 (Something about silencing 2), основної ацетилтрансферази H4K16 дріжджів, що дозволило припустити антагоністичну дію Sas2 і Sir2 на тривалість життя шляхом регуляції рівня ацетилювання H4K16. Крім того, модуляція ацетилювання амінокислоти в іншому положенні, H3K56, має подібний ефект на процеси старіння. Також відомо, що Sir2-асоційовані білки, Hst3 і Hst4, здатні деацетилювати H3K56, що призводить до гетерохроматизації ERCs.

У інших безхребетних продовження терміну життя спостерігається за підвищення рівня експресії ортологів Sir2. Механізми збільшення тривалості життя у черв'яків і мух відрізняються від таких у дріжджів. Так, у *C. elegans*, підвищення рівня Sir2 збільшує тривалість життя через insulin/IGF-1 сигнальний шлях (а саме через фактори транскрипції FOXO; Forkhead box O). Insulin/IGF шлях - це каскад реакцій фосфорилювання, які інактивують транспорт транскрипційних факторів FOXO (DAF-16) до ядра і сайленсують внаслідок цього гени анти-старіння, зокрема, гени оксидативного стресу та репарації ДНК. Відомо і про участь метилювання гістонів в основних процесах регуляції старіння у *C. elegans*. Рівень експресії декількох компонентів insulin/IGF шляху у *C. elegans* регулюється активністю H3K27 гістондеметилази

UTX-1 (Ubiquitously transcribed TPR on X). Інгібування гена *utx-1* призводить до збільшення триметилювання H3K27 (мітка неактивного хроматину) в ділянці хроматину, де розташовується ген *Daf-2* (кодує інсуліноподбний фактор росту IGF-1 у черв'яків) , що обумовлює зниження активності insulin/IGF шляху. Показано, що це призводить до збільшення тривалості життя *C. elegans* приблизно на 30%. В той же час високий рівень триметилювання H3K4 (мітка активного хроматину) негативно впливає на тривалість життя *C. elegans*. Генетичні дефекти комплексу триторакс Ash-2 (Absent, small, or homeotic), в тому числі H3K4 гістонметилтрансферази Set2 (SET domain containing 2), призводять до підвищення тривалості життя даного організму. Одночасно продемонстровано, що експресія деметилази Rbr-2 (Retinoblastoma-related protein 2), яка відповідає за деметилювання H3K4, також важлива для нормальної тривалості життя *C. elegans*, що свідчить про важливу роль метилювання H3K4 в процесі старіння. Важливо зазначити, що Ash-2 і Rbr-2 активно функціонують в зародковій лінії *C. elegans,* а їх ефекти важливі для регуляції старіння соматичних клітин.

Нещодавньо продемонстровано можливість трансгенераційної епігенетичної спадковості тривалості життя *C. elegans*. Було виявлено, що порушення компонентів комплексу метилювання H3K4 (у тому числі Ash-2, Wdr-5, і Set-2) у батьків можуть впливати на тривалість життя нащадків протягом кількох поколінь Rbr-2-залежним чином. Для встановлення можливості використання маніпуляцій з комплексом метилювання H3K4 з метою збільшення тривалості життя потребуються подальші дослідження.

Дослідження епігенетичних змін у процесі старіння безхребетних модельних організмів дозволило з'ясувати ключові аспекти фундаментальних механізмів старіння. Проте, хоча деякі аспекти механізмів старіння у еукаріот є еволюційно консервативними, особливості цих процесів у ссавців залишаються нез'ясованими. Так, у ссавців описано сім гомологів Sir2 (Sirt1-7). Sirt1, який найбільш подібний до Sir2 *S. cerevisae*, задіяний в процесі передчасного старіння мишей. На відміну від Sir2 дріжджів, який специфічно деацетилює

гістони, Sirt1 виступає в якості деацетилази інших білків, наприклад, відповідає за ацетилювання p53. У експериментах з вбудованими репортерними генами було показано, що Sirt1, як і Sir2 дріжджів, здатний модифікувати хроматин і пригнічувати транскрипцію за допомогою гістон-ацетилазної активності. Крім того, порушення Sirt6 у мишей призводить до дегенеративного фенотипу з ознаками передчасного старіння (у тому числі, кахексією, кіфозом і остеопенією), пов'язаних з дефектами у механізмах роботи репараційних систем. Припускають, що такі ефекти Sirt6 забезпечуються його H3K9 та/або H3K56 деацетилазною активністю в теломерних ділянках. Крім того, нещодавно продемонстровано, що деякі гени-мішені Sirt6 пов'язані з процесами старіння через взаємодію з транскрипційним фактором NF-κB. Також і інші епігенетичні зміни, описані до цього на безхребетних, спостерігалися у мишей з фенотипом передчасного старіння. Наприклад, миші, дефектні за геном металопротеази Zmpste24 (Zinc metalloproteinase STE24 homolog, yeast), яка бере участь в дозріванні білка ядерної ламіни A (модель синдрому прогерії Хатчінсона-Гілфорда), показали зміни в ацетилюванні H4K16 внаслідок порушення асоціації гістонацетилтрансферази Mof (Males absent on the first) з ядерним матриксом. Крім того, миші цієї ж лінії характеризуються передчасним старінням, пов’язаним з гіперметилюванням рДНК, що призводить до зниження транскрипційної активності рибосомних генів і глобального гіпоацетилювання гістонів H2B і H4.

Подібно до *C. elegans*, у людини втрата триметилювання H3K27 за рахунок зниження експресії гістонової метилтрансферази EzH2 може бути пов'язана зі старінням та такими фенотипами, як синдром Хатчінсона-Гілфорда. Продемонстровано загальне зниження рівня експресії мікроРНК, пов'язане з віком, а підвищення експресії специфічних miRNA (lin-4) здатне призводити до подовження тривалості життя. В цілому, вплив епігенетичної регуляції хроматину при старінні, ймовірно, є комплексним, і хоча безхребетні організми разом з мишами надають нам багато інформації про основні механізми старіння еукаріот загалом, соматичне довголіття у ссавців залишається погано вивченим.

Епігенетика людини, старіння і стовбурові клітини. У відповідності до іще однієї гіпотези старіння, цей процес може бути наслідком зниження мультипотентної здатності ствовбурових клітин дорослих організмів. Було встановлено, що стовбурові клітини дорослих особин різних тканин забезпечують гомеостаз та поліпшення пластичності останніх, а також репарацію пошкоджених клітин. Деякі види тканин мають високу швидкість оновлення, наприклад, клітини крові або кишківника; тут численні стовбурові клітини відповідають за регенерацію та утворення нових соматичних клітин (наприклад, синтез еритроцитів у крові або формування нових епітеліальних клітин в криптах кишківника). В тканинах з низьким рівнем регенерації стовбурові клітини здатні формувати адекватну відповідь організму на фактори навколишнього середовища, поліпшуючи пластичність тканин. Зниження функціональності стовбурових клітин дорослих особин призводить до порушення гомеостазу тканин, а отже, до втрати певних фенотипів клітинами, які старіють. Старіння також пов'язують зі зменшенням кількості стовбурових клітин, хоча цей ефект, мабуть, залежить від типу тканини та організму. Крім того, функціонування стовбурових клітин також знижується з віком у всіх типах тканин. Дисфункція стовбурових клітин з віком може бути спричинена накопиченням незворотніх змін, у тому числі генетичних, мітохондріальних ушкоджень, вкорочення теломер. Варто зазначити, що старіння стовбурових клітин дорослих особин може регулюватися епігенетичними модифікаціями.

Для аналізу здатності до диференціювання стовбурових клітин дорослих особин в процесі старіння в залежності від метилювання ДНК порівнювали патерни метилювання CpG гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), отриманих з пуповинної крові, з ГСК, отриманими від дорослих донорів (з середнім віком: 35 років). У зразках крові дорослих людей спостерігалося гіпометилювання в 350 сайтах CpG та гіперметилювання в 192 CpGs у порівнянні зі зразками пуповинної крові. Цікаво, що було виявлено перекриття патернів гіпометилювання в ГСК, отриманих від дорослих донорів, та в

мієлоїдних клітинах. Крім того, було показано, що пов'язане з віком гіперметилювання спостерігається в цільових генах репресорного комплексу PRC2, який бере участь у метилюванні *de novo*, як під час старіння, так і онкогенезу. Так, наприклад, негативний регулятор цитокінового сигнального шляху SOCS1 (Suppressor of cytokine signaling 1), який відіграє роль у лімфоїдному диференціюванні, стає гіперметильованним як в процесі старіння, так і при розвитку множинної мієломи. Отже, цей фактор відіграє важливу роль у підтримці плюрипотентності молодих ГКС. Аналогічний зв’язок між гіперметилюванням ДНК та розташуванням комплексу PRC2 раніше був описаний як основний механізм вікових змін патернів метилювання в зразках периферійної крові людини. Тим не менше, слід зазначити, що гіперметилювання локусів-мішеней PRC2 є характерним не тільки для стовбурових клітин. В соматичних клітинах певна частина таких послідовностей характеризуються чіткою тенденцією до гіперметилювання з віком, незалежно від захворювання, статі або типу клітин (при порівнянні крові, раку яєчників, раку шийки матки і легеневих тканин). Крім того, було продемонстровано, що метилювання ДНК відіграє певну роль у процесах реплікативного старіння і старіння експериментальних систем *in vitro*. Довготривале культивування мезенхімальних стовбурових клітин супроводжується гіперметилюванням специфічних CpG-острівців, більшість з яких пов'язані з гомеобокс-вмісними генами.

Крім того, роль групи білків PcG була ретельно вивчена в регуляції старіння стовбурових клітин. BMI1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1; компонент комплексу PRC1) - найвідоміший регуляторний білок групи Polycomb, який функціонує у дорослих стовбурових клітинах, та задіяний у самооновленні стовбурових клітин крові і мозку. Припускають, що BMI1 контролює старіння стовбурових клітин за допомогою регуляції генів, таких як локуси $p16^{INK4a}$ / $p19^{ARF}$, викликаючи збільшення кількості репресорних гістонових міток (наприклад, H3K27me3). Крім того,

білки BMI1 і Ezh2 регулюються ДНК-метилтрансферазами та miRNA, що додає додаткового рівня складності епігенетичній мережі.

Ацетилювання гістонів також відіграє роль в старінні стовбурових клітин дорослих людей. Втрата Sirt1 (клас III гістондеацетілаз) посилює ріст ГСК за певних експериментальних умов. Можливо, експресія залежних від віку мікроРНК, включаючи родину let-7, miR-23a, miR-26a та miR-30a регулюється активністю HDACs. Ці дані свідчать про зв’язок епігенетичних механізмів з процесами старіння дорослих стовбурових клітин.

Епігенетика соматичних клітин та довголіття. Окрім асоціації певних епігенетичних змін з клінічними проявами окремих захворювань, показано, що епігенетичні патерни різняться і в здорових соматичних клітинах залежно від типу тканини та статусу диференціювання.

Описано глобальне зниження рівня метилювання ДНК в різних тканинах людини в процесі старіння. Такі ефекти пояснювались прогресуючою втратою метилювання ДНК в послідовностях, що повторюються (особливо в *Alu* елементах). Необхідно відмітити деякий паралелізм і при онкологічних захворюваннях. Крім того, було описано специфічне вікове гіперметилювання в генах, які регулюють розвиток, таких як *Myod1 (Myogenic differentiation 1)* в мозку, *Pcdh10* та *P2rx7 (Purinergic Receptor P2X)* в кишківнику і *Ddah2 (Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2)* та *Tet2* в шкірі. Показано, що метилювання *de novo* при старінні в шкірі спостерігається у <1% генів. Було виявлено гіперметилювання CpG ДНК-зв'язуючих та транскрипційних факторів. Припускають, що дерегуляція *майстер-генів* здатна впливати на широкий спектр біологічних процесів, що могло б пояснити широкі фенотипові зміни при старінні. Багато з досліджених генів, які гіперметилюються при старінні, є компонентами апоптозного сигнального шляху. Цікаво, що деякі класичні гени-супресори пухлин, які зазвичай є гіперметильованими в онкогенезі також зазнають *de novo* метилювання при старінні в нормальних тканинах. Виявлено зв'язок між специфічним гіперметилюванням генів-

супресорів пухлин, наприклад, LOX (Lysyl oxidase), $p16^{INK4a}$, RUNX3 (Runt-related transcription factor 3) і TIG1 (Tazarotene induced gene 1) у епітелії кишківника, і віком. Три загальновідомі епігенетично регульовані гени-супресори пухлин, RARb2 (Retinoic acid receptor beta 2), RASSF1A (Ras association domain-containing protein 1) і GSTP1 (Glutathione S-transferase P 1) також гіперметилюються у передракових тканинах передміхурової залози з віком. Крім того, ген-супресор пухлин TET2 зазвичай є гіперметильованим у мієлопроліферативних пухлин і у старіючій шкірі.

Епігенетична регуляціїя може бути наслідком не однієї чи двох модифікацій (наприклад, метилювання CpG), а продуктом кількох епігенетичних факторів, які працюють узгоджено. Відомо, що глобальні рівні K20H4me3 підвищені в деяких органах щурів, вік яких перевищує 30 місяців. Прикладом епігенетичної зміни, пов'язаної зі старінням у ссавців, є зниження експресії SIRT1, яке призводить до реорганізації хроматину, індукованої пошкодженнями ДНК. Цікавими є кілька досліджень з фармакологічної активації сіртуїнів (наприклад, за допомогою ресвератролу), що показали, антиапоптозний ефект. Вищезгадані факти свідчать про потенціал сиртуїнів в якості мішеней антивікової терапії.

Показано, що експресія miRNA збільшується з віком в печінці мишей у віковому діапаазоні 4-33 місяці. Активність кожної з чотирьох miRNA (miR-93, miR-669c, miR-214, та miR-709) корелює з експресією відповідного цільового гена, асоційованого з мітохондріальною функцією, оксидативним стресом та проліферацією. Інформація щодо кількості мікроРНК, пов'язаних зі старінням у ссавців, стрімко зростає. Так, при старінні відбувається підвищення експресії родини let-7 в скелетних м'язах, а також miR-143, пов'язане з зупинкою росту фібробластів, miR-27 відіграє роль у затримці старіння за моделі Ames мишей. Моделі передчасного старіння, такі як лінії миші Zmpste24 (модель синдрома Хатчинсона-Гілфорда) характеризуються підвищенням експресії родини miR-29. Цікаво, що підвищення експресії miR-29 було описано також у соматичних тканинах старих мишей протягом процесу фізіологічного старіння. Підвищена

експресія запускається наявністю пошкоджень ДНК та залежить від активності шляху p53.

РОЗДІЛ 18. ТРАНСГЕНЕРАЦІЙНЕ ЕПІГЕНЕТИЧНЕ СПАДКУВАННЯ

Фактори навколишнього середовища та епігенетичні процеси в мейозі та мітозі. Клітинний поділ вимагає передачу епігенетичних патернів дочірнім клітинам. Вплив факторів навколишнього середовища на поділ як соматичних, так і зародкових клітин, може реалізуватися через формування нових або підтримку вже існуючих епігенетичних патернів. Так, дотримання певної дієти здатне модулювати модифікації гістонів, а зміна складу мікроелементів у середовищі протягом раннього розвитку може змінити патерни метилювання ДНК. Метилювання ДНК і гістонів є ферментативними реакціями, які потребують донорів метильних груп, а фактори зовнішнього середовища можуть впливати на активність метилтрансфераз або доступність метильних груп, які є субстратом реакції метилювання гістонів та динуклеотидів CpG. Як вже зазначалося, існує два різних класи ДНК метилтрансфераз: підтримуючі та метилтрансферази *de novo*. Однією з важливих особливостей епігенетичних патернів є те, що вони здатні зберігатись в процесі мітотичного поділу клітин. Механізм, за допомогою якого підтримується статус метилювання ДНК в процесі мітозу, полягає у активації DNMT1, яка має спорідненість до напівметильованої ДНК. Після кожного поділу активність DNMT1 забезпечує метилювання нових ниток ДНК відповідно до патерну метилювання батьківського ланцюга ДНК. Інші метилтрансферази, такі як DNMT3A або DNMT3B взаємодіють з неметильованою ДНК, тому їх називають *de novo* метилтрансферази. Кожна з ДНК-метилтрансфераз активна під час розвитку в певний проміжок часу, проте метилтрансферази *de novo* мають винятково важливе значення, оскільки відповідають за встановлення патернів метилювання ДНК. Після цього дія DNMT1 має вирішальне значення для підтримки патернів метилювання до зрілого віку. Таким чином, враховуючи чутливість епігенетичних механізмів до зміни факторів навколишнього середовища, вплив останніх може модифікувати процес диференціювання

шляхом змін в епігеномі. Такі впливи зазвичай реалізовуються в проміжках часу, які є критичними для розвитку певного типу клітин. Описаний вище механізм може пояснити, принаймні частково, вплив умов раннього розвитку на формування захворювання та певних фенотипів у дорослого організму Однак, ефекти, які виникли в соматичних клітинах, не передаються наступному поколінню. Тому епігенетичні зміни в соматичних клітинах, індуковані навколишнім середовищем, не можуть розглядатися у якості трансгенераційного явища. На відміну від соматичних клітин, епігенетичні зміни зародкової лінії можуть передаватися у поколіннях. Розвиток зародкової лінії має відносно вузький вразливий проміжок часу, коли епігеном дійсно може бути змінений під впливом навколишнього середовища. У тому ж випадку, якщо епігеном зародкової лінії зазнав змін, це може призводити до трансгенераційних ефектів.

Приклади епігенетичної трансгенераційної спадковості. Період первинного визначення статі плода, під час якого зародкова лінія проходить процес епігенетичного репрограмування геному, є одним з найбільш чутливих до впливу навколишнього середовища. Епігенетичні зміни, які виникли в цей період, можуть передаватися трансгенераційно. Як було показано у експериментах з фунгіцидом вінклозоліном (має антиандрогенну активність), викликані ним порушення розвитку сім’яників ембріона, з подальшим збільшенням кількості апоптичних клітин при сперматогенезі у дорослих, передаються трансгенераційно. Ефекти спостерігаються протягом F1-F4 поколінь, що дозволяє припустити наявність стабільно зміненого статусу метилювання ДНК чоловічої зародкової лінії. Показано, що протягом цих поколінь у сім’яниках можуть зберігатися змінені патерни експресії генів. Крім того, трансгенераційні зміни транскриптому були також ідентифіковані в простаті і мозку, хоча кожна тканина мала свій унікальний набір генів, які диференційно експресувались. Було виявлено, що індуковані вінклозоліном зміни метилювання ДНК сперми щурів, імовірно, обумовлюють

трансгенераційні зміни в транскриптомі дорослих соматичних клітин в різних тканинах. Окрім дефектів сперматогенезу було виявлено і інші трансгенераційні ефекти, такі як розвиток захворювань у дорослому віці, (рак простати і нирок, імунні порушення). Показано також поведінкові трансгенераційні ефекти у випадках статевого добору та тривожності.

Процес передачі трансгенераційних змін може виглядати наступним чином. Вагітна самка (F0) піддається впливу чинника навколишнього середовища. Наслідки такого впливу проявляються у її нащадка, F1, як у зародкових, так і у соматичних клітинах. Покоління F2 матиме ефекти у зародкових клітинах, оскільки вони розвивалися в організму F1, коли він був плодом у самки F0. Таким чином, справжній трансгенераційний ефект виявляється тільки у поколінні F3, оскільки воно не підлягає безпосередньому впливу чинника оточення, який індукує певні епігенетичні зміни. Хоча такі епігенетичні трансгенераційні ефекти на рівні зародкових ліній можуть бути обмежені в часі впливу або активності конкретних сполук, вони здатні впливати на етіологію і патогенез захворювань.

Ідентифіковано низку речовин, які призводять до ефектів, подібних до вищеперерахованих. Так бісфенол А (bisphenol A; BPA) викликає порушення сім’яників, а діоксин спричиняє аномалії матки, які спостерігаються у поколіннях F1-F3. Фармацевтичні препарати, такі як тироксин і морфін сприяють поведінковим відхиленням, які проявляються у поколіннях F1-F3. Хіміотерапевтичні препарати також здатні викликати трансгенераційні ефекти, такі як порушення поведінки, депресивні стани, ускладнення при пологах, зниження пулу примордіальних фолікул і рання втрата репродуктивного потенціалу. Крім того, зміни харчового раціону здатні викликати епігенетичні зміни з трансгенераційним спадкуванням. До таких чинників можна віднести обмежену калорійность харчування, яка впливає на метаболізм, спричиняючи хвороби, які спостерігаються в F3; споживання продуктів з високим вмістом жирів, що сприяє порушенням обміну речовин і ожирінню у дорослому віці з

трансгенераційними ефектами. Було також показано, що деякі мутації здатні призводити до епігенетичних змін, які можуть передаватися трансгенераційно.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Епігенетика – це напрям, який надає нове розуміння процесам реалізації генетичного матеріалу протягом розвитку та життя організмів. Останніми роками спостерігається значний прогрес у дослідженні епігенетичних механізмів. Визначені функції метилювання ДНК, більш детально описані модифікації гістонів та зміни структури хроматину, а також більш зрозумілою стала роль регуляторних РНК у різних організмів. Крім того, були виявлені значні взаємні впливи та перекриття епігенетичних механізмів, що вказує на комплексний характер функціонування цих систем.

Зростають докази того, що епігенетичні механізми відіграють визначальну роль у багатьох процесах, а їх порушення призводять до захворювань людини. Їх визначальний внесок у різні апспекти життєдіяльності виявлено у всіх організмів, включаючи прокаріот. Крім того, значного прогресу було досягнуто у напрямку, який називають середовищна епігенетика. Оскільки конкретні епігенетичні патерни є специфічними не тільки для певного типу клітин, але і для певного сигнального шляху, наступні дослідження мають бути спрямовані саме на визначення епігенетичної лабільності сигнальних шляхів у відповідь на дію чинників середовища. До цього часу основним підходом є визначення епігенетичних змін у певних генах-кандидатах. Характеристика сигнальних шляхів, які є епігенетично лабільними і можуть змінюватися внаслідок дії певних факторів середовища, може пролити світло на механізми, за допомогою яких епігеном може обумовлювати розвиток та прогресію патологічних станів. Хоча у даному напрямку було досягнуто значного прогресу, потребуються подальші дослідження, у яких будуть інтегровані дані щодо впливу певних чинників оточення на епігенетичні мітки та пов’язані з цим наслідки для здоров’я. Дуже перспективним є застосування цих підходів для попередження та лікування патологічних станів. У багатьох випадках епігенетичні зміни є зворотніми, а отже, можуть потенційно бути мішенню для

ліків нового типу, таких, наприклад, як інгібітори HDAC, які уже застосовують у терапії онкологічних захворювань.

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

5mC - 5-methylcytosine; 5-метилцитозин
ABCA1 - ATP-binding cassette transporter
ACSL3 - Long-chain-fatty-acid—CoA ligase 3
AGO –Argonaute; білок, залучений у процес РНК-інтерференції
Aid - Activation induced deaminase; деамінує 5mC з утворенням тиміну
ALS - amyotrophic lateral sclerosis; бічний аміотрофічний склероз
AMPA - α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANRIL - antisense noncoding RNA in the *INK4* locus
APC - antigen-presenting cells; антиген-презентуючих клітин
AR - androgen receptor; андрогенний рецептор
ATR - ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATR-X - α thalassemia X-linked mental retardation syndrome; Х-зчеплена розумова відсталість з альфа-таласемією
AUB – Aubergine
AVP - arginine vasopressin; ген вазопресину
AXL – від грецького «anexelekto» - неконтрольований; один з рецепторів тирознкінази
BDNF - brain derived neurotrophic factor; нейротрофічний фактор мозку
BDNF - brain-derived neurotrophic factor ; білок нейротрофічний фактор з мозку
BER- base excision repair; ексцизійна репарація основ
BIM - Bcl-2 interacting mediator of cell death
BMAL1 - brain and muscle aryl 1-hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1; мозковий і мускульний аналог рецептора ARNT-1
BMI1 - B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
BRCA1- breast cancer 1, early onset
CaMKII - Calcium/calmodulindependent kinase II
CBBP - CXC domain b1-repeat binding protein;
CBP/p300 - CREB-binding protein; родина гістонових ацетилтрансфераз типу А
CBX2 - Chromobox homolog 2; гомологом Polycomb у мишей
CcrM - cell-cycle regulated methyltransferase; бактеріальна метилтрансфераза
Cdh13 - Cadherin 13 F
CDKN1A (2A)- Cyclin-dependent kinase Inhibitor 1A (2A)
CGIs - CpG islands; CpG-острівці
CHD7 - chromodomain helicase DNA-binding protein seven
ChIP - chromatin immunoprecipitation; метод імунопреципітації хроматину
Chp1 - Chromodomain protein 1
CIITA - class II transactivator
CIMP - CpG island methylator phenotype
CLOCK - circadian locomotor output cycle kaput; циркадний переривач циклів рухової активності
Clr4 - Cryptic loci regulator 4 – одна з гістонових метилтрансфераз дріжджів
CLRC - cryptic loci regulator complex
CLS - Coffin-Lowry syndrome; синдром Коффіна-Лоурі
CLTA4 - Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

COMT - catechyl-O-methyltransferase
CREBP-або CBP - cAMP response element-binding protein
CRF - corticotrophin releasing factor
CRF - Corticotropin-releasing factor
CRISPRs - clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cry1, Cry2 – Cryptochrome; гени циркадних ритмів
CTCF – CCCTC-binding factor; транскрипційний фактор, який залучений у проходження багатьох процесів, таких як регуляція транскрипції та регуляція інсуляторів
Cxcl10 - C-X-C motif chemokine 10
Dam - Deoxyadenosine methylase; бактеріальна ДНК метилтрансфераза
DAPK - Death-associated protein kinase
Dat - Dopamine active transporter; транспортер дофаміну
Dbp - D-site binding protein; D-сайт-зв'язуючий білок
DCL3 - DICER-LIKE 3
DCR2- Dicer2
Ddah2 - Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
DDM1- DNA methylation 1; метилтрансфераза рослин
DMD - differentially methylated domain -диференційно метильований домен
DMR - differentially methylated region; диференційно етильований регіон
DNMT - DNA-methyltransferase; ДНК-метилтрансфераза
DPPA3 - Developmental pluripotency-associated protein 3; також відомий як PGC7 або STELLA у мишей та є материнським фактором, який функціонує на передімплантаційній стадії розвитку
DRM2 - DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2; одна з рослинних метилтрансфераз
dsRNA - double-stranded RNAs; дволанцюгові РНК
EBF1 - Early-B-cell factor
EGFR - Epidermal growth factor receptor; репептор епідермального фактору роста
ERA - estrogen receptor α; рецептор естрогену α
ERCC1 - Excision repair cross-complementation group 1
ERα - Estrogen receptor alpha; рецептор естрогена, альтернативна назва *ESR1*
ESD - environmental sex determination; “середовищне” визначення статі
ESR1, ESR2 - Estrogen receptor; гени рецепторів естрогену, альтернативна назва *ERα*
EZH2 - Enhancer of zeste homolog 2; H3K27-метилтрансфераза
F2RL3 - Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3
FLC - FLOWERING LOCUS C – реп ресор цвітіння *A. Thaliana*
FMRP - Fragile X Mental Retardation protein
FOXP3 - forkhead box P3
FSHD - facioscapulohumeral muscular dystrophy; фаціо-плечелопаткова м’язова дистрофія
FXS - fragile X syndrome;синдром ламкої Х-хромосоми
GABA - gamma-aminobutyric acid

GABAAR - Gamma-aminobutyric acid receptor
GABRA1 - gamma-aminobutyric acid A receptor alpha 1 subunit
GAD1 - glutamic acid decarboxylase gene
gDMRs - germline differentially methylated regions; диференційно метильовані ділянки зародкової лінії
GNASAS - GNAS antisense RNA
GNAT - Gcn5-related N-acetyltransferases; родина гістонових ацетилтрансфераз типу А
GNMT- glycine-*N*-methyltransferase; гліцин-N-метилтрансфераза
Gpt2 - glutamic pyruvate transaminase 2; глутамінової піруват-трансамінази 2
GR - glucocorticoid receptor; глюкокортикоїдний репецтор
GSD - genotypic sex determination; генотипічне визначення статі
GSTM1 - Glutathione S-transferase Mu 1
GWAS - Genome-wide association study; пошук асоціацій нуклеотидних поліморфізмів на рівні геному з певними фенотиповими проявами
HAT - histone acetyltransferase; гістон-ацетилтрансфераза
HCC - hepatocellular carcinoma; гепатоцелюлярної карциноми
HD - Huntington disease; хорея Гентінгтона
HDAC - histone deacetylases; гістон-деацетилаза
Hes5 - Hairy/enhancer of split
HKMT - histone lysine methyltransferase; гістон-лізин-метилтрансфераза
HLA - human leukocyte antigen
HMG - high-mobility group – один з білкових ДНК-зв'язувальних доменів
IAPs - intracisternal A particles; активні ретротранспозони мишей
ICF - immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies syndrome; синдром імунодефіциту, центромерної нестабільності та лицьових аномалій.
ICM - inner cell mass; клітини внутрішньої маси
ICRs - imprinting control regions; регіони контролю імпринтінга
Idb4 - Inhibitor of DNA binding
Ifng - Interferon gamma
Ifngr2 - Interferon gamma receptor 2
Igf2 - Insulin-like growth factor 2; інсуліноподібний фактор росту 2
*Igf2*r – *Insulin-like growth factor 2 receptor;* рецептор інсуліноподібного фактору росту 2
IL – Interleukin; інтерлейкін
IL10 - Interleukin-10; інтерлейкін 10
iPS - induced pluripotent stems; індуковані плюрипотентні клітини
iTreg - inducible regulatory T cells; індуковані регуляторні Т-клітини
JMJD2 - Jumonji Domain Containing 2; одна з триметил-лізин-деметилаз, також відома як KDM4
JNK - c-Jun NH2-terminal kinase; родина білків
KAP1 - KRAB (Krüppel-associated box)-associated protein 1
KDM1B - Lysine (K)-specific demethylase 1B; H3K4-специфічна деметилаза
KDM4C - Lysine-specific demethylase 4; одна з триметил-лізин-деметилаз, також відома як JMJD2C

KIR - Killer-cell immunoglobulin-like receptor
KTF1 - KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1
LDLRAP1- low density lipoprotein receptor adaptor protein 1
LEP – leptin; лептин
LG - licking/grooming; поведінка вилизування та догляду у щурів
LINE - long interspersed nuclear element; короткі інтерсперсні елементи
lmiRNAs - long miRNAs; довгі мікроРНК
LMNA - Lamin A/C; ген ламіну
LMR - low-methylated region; регіон з незначним метилюванням ДНК
lncRNAs - long ncRNAs; довгі некодуючі РНК
LSD1 - lysine-specific demethylase 1; лізин-специфічна деметилаза I
LXR - Liver X receptor
MAPK1 - Mitogen-activated protein kinase 1 – одна з протеїнових кіназ людини
MATs - methionine adenosyl-transferases; метіонін аденозил-трансферази
MBD - methyl-CpG binding domain; метил-CpG-зв'язуючий домен
MeCP2 - methyl-CpG binding protein 2; метил-CpG-зв'язуючий білок
MEG3 - maternally expressed 3
MEK1 - mitogen-activated protein kinase I
MET1 - methyltransferase 1; метилтрансфераза рослин
MetS – metabolic syndrome; метаболічний синдром
MGMT - O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase
MILI - Mouse PIWI; також відомий як PIWIL2; гомолог білків PIWI у мишей
miRNAs – microRNAs; мікро-РНК
MIWI2 - MIWI-like; також відомий як PIWIL4; гомолог білків PIWI у мишей
MLH1 - MutL homolog 1E.coli
MLL - mixed-lineage leukemia
MLL1 - mixed-lineage leukemia 1
Mof - Males absent on the first
Mor - Mu opioid receptor; опіоїдний рецептор
MOV10 - Moloney leukemia virus 10
MOZ - monocytic leukemia zinc finger; гістонова ацетилтрансфераза родини MYST
MRG15 - MORF4-related gene on chromosome 15; транскрипційний фактор, який відіграє значну роль у процесах розвитку, диференціації клітин та клітинного старіння
MSH2 - MutS protein homolog 2
MSI-H tumor - Microsatellite instability high tumor
MSUS - a mouse model of unpredictable maternal separation combined with unpredictable maternal stress; модель «непередбачуваного відлучення матері разом з непередбачуваним материнським стресом»
MTA2 - metastasis tumour antigen 2
MTHFR - methylenetetrahydrofolate reductase; метилентетрагідрофолат редуктаза
MuDR – Mutator DR; мобільний елемент кукурудзи з родини *Mu*
Myb – **my**elo**b**lastosis; протоонкоген
MYC – Myelocytomatosis

Myod1 - Myogenic differentiation 1
MYST - назва походить від перших літер членів родини MOZ, YBF2, SAS2 та TIP60; родина гістонових ацетилтрансфераз А типу
NAFLD - nonalcoholic fatty liver disease; неалкогольну жирову хворобу печінки
ncRNA - non-coding RNA; некодуючі РНК
NDR - nucleosome-depleted regions, збіднений на нуклеосоми регіон
NFκB - nuclear factor-kB
ngf1a - nerve growth factor
NK-клітини - Natural killer; так звані природні кілери
NOS2A - Nitric oxide synthase 2a
Npas2 - neuronal PAS domain protein 2; ген периферійного регулятора циркадного ритму
NR3C1 - nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1; ген глюкокортикоїдного рецептора, також відомий як *GR*
NRDE - Nuclear RNAi defective; сигнальний шлях у *C. elegans*, який відповідає за РНК інтерференцію у ядрі
NRDE-3 - Nuclear RNAi defective-3
Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NRPE1- NUCLEAR RNA POLYMERASE E1
NSD3 - Nuclear SET domain-containing protein 3; одна з гістонових лізинових метилтрансфераз
NuRD - nucleosome remodeling and histone deacetylase – хроматин-ремодулюючий комплекс
OGG1 - 8-Oxoguanine glycosylase 1
O-GlcNAc - β-N-acetylglucosamine; β-N-ацетилглюкозамін
P2rx7 - Purinergic Receptor P2X
Pai-1 - plasminogen activator inhibitor 1; інгібітор 1 активатора плазміногену *Ldh-a* - lactate dehydrogenase A; лактат-дегідрогеназа А
PAR1 - pseudo-autosomal region 1; псевдо-аутосомний регіон 1
PARP - poly-ADPribose- polymerase; полі-ADP-рибоз-полімераза
PASRs - promoter-associated short RNAs; малі РНК, асоційовані з промоторами
Pax5 - Paired box protein 5
Pcdh - PROTOCADHERIN α, -β та –γ
PcG - Polycomb group; Polycomb
PCGTs - PolyComb Group Targets; цільові послідовності білків групи Polycomb
PD - Parkinson’s disease; хвороба Паркінсона
Pdx1 - homeobox 1 transcription factor ; фактор транскрипції гомеобокс 1
Penk - Proenkephalin; препроенкефалін
Per1, Per2, Per3 – Period; гени циркадних ритмів
PGCs - primordial germ cells; попередники статевих клітин
PHF7- PHD Finger Protein 7
piRNAs - PIWI-interacting RNAs; РНК, які взаємодіють з білками PIWI
PPARα - Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
Ppp1ca - Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit
PRCs - Polycomb repressor complexes; репресорнкомплекси Polycomb

PREs - PcG response elements - PcG-відповідаючі елементи
PRMT - protein arginine methyltransferase; білкова аргінін-метилтрансфераза
PROMPTS - promoter upstream та transcripts; транскрипти, які синтезуються вище промотора
PRSS3 - Protease, serine, 3
PTEN - Phosphatase and tensin homolog
PTPRO - Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta
PWWP - від Pro-Trp-Trp-Pro; білковий домен, який залучений у білок-білкові взаємодії
RA - rheumatoid arthritis; ревматоїдний артрит
Rasgrf1 - RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1- один імпринтованих генів
RASSF1A - Ras association domain-containing protein 1
RB1- Retinoblastoma 1; ген ратинобластоми людини
Rbl2 - Retinoblastoma-Like 2
RdDM - RNA-directed DNA methylation; РНК-залежне метилювання ДНК
RDM1 - RNA-DIRECTED DNA METHYLATION1
Rdp1 - RNA-dependent RNA polymerase; РНК-залежна РНК-полімераза дріжджів
RDR2 - RNA-dependent polymerase 2; РНК-залежна полімераза 2
RdRC - RNA-dependent RNA polymerase complex; РНК-залежний РНК-полімеразний комплекс
RdRP - RNA-dependent RNA polymerase; РНК-залежна РНК полімераза
RISC - RNA-induced silencing complex; комплекс сайленсингу, який індукує РНК
RITSC - RNA-induced transcriptional silencing complex
RNAP - RNA polymerase, РНК-полімераза
RSK2 - ribosomal protein S6 kinase 2
RSTS - Rubinstein-Taybi syndrome; синдром Рубінштейна-Тайбі
runX1 - Runt-related transcription factor 1
SAGA - Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase
SAH - *S*-adenosylhomocysteine; S-аденозилгомоцистеїн
SAM - S-adenosylmethionine; S-аденозилметіонін
Sas2 - Something about silencing 2; основної ацетилтрансферази H4K16 дріжджів
Sat2 - satellite 2
scnRNAs - scan RNAs
SERT або *5-HTT* - serotonin transporter; транспортер серотоніну
SET домен від Su[VAR]3-9, enhancer-of-zeste, thritorax
SF-1 - Splicing factor 1; кодує білок, який залучений у формування сплайсосоми
SINE - short interspersed nuclear element; короткі інтерсперсні елементи
siRNAs - small interfering RNAs; малі інтерферуючі РНК
SLE - Systemic lupus erythematosus*;* системний червоний вовчак
SNCA - Synuclein alpha
sncRNA - small non-coding RNA; малі некодуючі РНК
SNF2 - sucrose non-fermenting 2
SNP - single-nucleotide polymorphism; однонуклеотидний поліморфізм

SNRPN - Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N;
SOCS1 - Suppressor of cytokine signaling 1
SOX - Sex determining region Y-box; транскрипційний фактор
spliRNAs - splice site RNAs; РНК сплайс-сайтів
SRA - SET and RING associated; білки, які впізнають метильовану ДНК
Sry - Sex-determining Region Y; ген визначення статі у ссавців
SSAT - Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase
SSRE - shear stress response element; специфічна ділянка у промоторі гена *NOS3*
STAT3 - Signal transducer and activator of transcription 3
SUV39 - suppressor of variegation 3-9; H3K9- метилтрансфераза
SWI2/SNF2 - switching/sucrose non-fermenting chromatin remodeling complex; комплекс ремоделювання хроматину
TCRβ - T cell receptor β
Tdg - thymine-DNA-glycosylase; вирізає тимін, деамінований з 5mC
TE - extra-embryonic trophectoderm; позаембріональна трофектодерма
Tef - thyrotroph embryonic factor; тиреотропний ембріональний фактор
TERRA - telomeric repeat-containing RNA; РНК, транскрибовані з теломерних повторів
TET - ten-eleven translocation, фермент деметилювання
Th2 - T helper 2 type; локус, експресія якого обумовлює перетворення наївних Th у Th2
tiRNAs- transcription initiation RNAs ; РНК ініціації транскрипції
TLR - toll-like receptor
TNF-α, - *β* - tumor necrosis factor-α, - *β*
TRKB - Tropomyosin receptor kinase B
TRKB - tropomyosinrelated kinase B
TrxG - Trithorax group; білки групи Trithorax
TSD - temperature-dependent sex determination; температурно-залежне визначення статі
TSS - transcriptional start site, сайт початку транскрипції
TSSa-RNAs - transcription start site-associated RNAs; РНК, асоційовані з точками старту транскрипції
UTF1 - Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
UTR - untranslated region; частина мРНК, що не транслюється
VEGF - Vascular endothelial growth factor; фактор роста ендотелія судин
Wnt - комбінація Wg (*wingless*) та Int; один з сигнальних шляхів, який контролює ембріогенез, диференціацію клітин, а його порушення призводять до онкологічних перетворень
WRN - Werner syndrome ATP-dependent helicase
XIST - X-inactive specific transcript; специфічний транскрипт інактивованої X-хромосоми, регуляторна РНК
Xp - paternal X chromosome; батьківська X-хромосома
XRCC1 - X-ray repair cross-complementing protein 1
YY1 -Yin Yang 1; транскрипційний репресор
ZFP57 - Kruppel associated box (KRAB)-containing zinc finger

Zfp57 - Zinc Finger Protein 57; білок з цинковим пальцем 57
Білки MECP - methyl-CpG-binding protein), білки, які зв'язуються з метильованими динуклеотидами CpG
ГМКС - гладкі м'язові клітини судин
ГСК - гемопоетичні стовбурові клітини
ДК - дендритні клітини
ЕСК- ембріональні стовбурові клітини
IXX - інактивація Х-хромосоми
МГЕ - мобільні генетичні елементи
MHC - major histocompatibility complex; головний комплекс гістосумісності
МСК - мезенхімальні стовбурові клітини
HP1 - heterochromatin protein 1; гетерохроматиновий білок 1
ПГК - попередники гемопоетичних клітин
ПТМ – пост трансляційні модифікації гістонів
p38MAPK - p38 mitogen-activated protein kinase
РНКі - РНК-інтерференція
PC - Polycomb protein; білок Polycomb
РС - розсіяний склероз
CS - Cockayne syndrome; синдром Кокейна
ССЗ - серцево-судинні захворювання
Xa - активна Х-хромосома
Xi - inactive X; інактивована Х-хромосома
XIC - X-inactivation center; центр інактивації Х–хромосоми