

УДК 57.05

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ – ВАЖНЕЙШИЙ ЭЛЕМЕНТ СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

© 2020 г. Е. В. Семенова<sup>1, \*</sup>, Е. Ю. Варфоломеева<sup>1</sup>, М. В. Филатов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Отделение молекулярной и радиационной биофизики, ФГБУ “Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова” НИЦ “Курчатовский институт”, Гатчина, 188300 Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, 191036 Россия

\*E-mail: [semenova\\_el.spb@mail.ru](mailto:semenova_el.spb@mail.ru)

Поступила в редакцию 02.10.2019 г.

После доработки 28.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Экспрессия генов – стохастический (случайный) процесс, приводящий к значительным межклеточным вариациям в уровнях мРНК и белков в популяции генетически идентичных клеток. Экспрессионная гетерогенность проявляется у разнообразных организмов от микробов до млекопитающих; ее характеристики зависят от генетических, эпигенетических и биофизических параметров. Случайные колебания, возникающие при реализации генетического материала (экспрессионный шум) играют важную роль во многих биологических процессах, таких как переключение фенотипов и координация экспрессии генов при клеточной дифференцировке и клеточном цикле. Стохастическая экспрессия генов может иметь важные последствия как для каждой конкретной клетки, так и для клеточной популяции в целом, будучи полезным фактором в некоторых контекстах и вредным в других. Следовательно, в процессе эволюции должны были сформироваться механизмы контроля экспрессионного шума. В последние годы все больше экспериментальных и теоретических работ указывают на эпигенетическую регуляцию как на важнейший элемент системы контроля стохастической экспрессионной гетерогенности. В обзоре рассматриваются основные эпигенетические механизмы, участвующие в контроле экспрессионного шума, и приводятся конкретные примеры эпигенетической регуляции стохастической экспрессии генов у различных организмов возрастающей биологической сложности, начиная с вирусов и заканчивая млекопитающими. Отдельный раздел обзора посвящен функционированию эпигенетической системы контроля экспрессионной вариабельности генов в период развития многоклеточных организмов.

**Ключевые слова:** регуляция стохастических процессов, стохастическая клеточная гетерогенность, экспрессионный шум, эпигенетические механизмы

**DOI:** 10.31857/S0041377120020054

Жизнь – это проявление взаимодействия двух противоположных явлений – случайности и детерминизма. Живые организмы, развитие которых организовано с помощью программы пространственно-временной экспрессии генов, ответственной за точную передачу наследственных признаков, пролиферацию и миграцию на уровне отдельных клеток, способны разрешить эти два, казалось бы, противоречивых аспекта своей жизнедеятельности. Природа двух уровней регуляции – стохастичность на отдельных этапах регуляции генной экспрессии в отдельных клетках и высокоскоординированная динамика экспрессии генов в процессе эмбриогенеза – и пути их взаимодействия в конечном итоге определяют

судьбу клетки и организма в целом (Dong, Liu, 2017). Программы клеточного деления, размера клеток и генной экспрессии изменяются в ответ на внешние условия. Эти глобальные изменения влияют на средние концентрации биомолекул и их вариабельность. Случайные колебания – причина шума экспрессии генов (вариации количества генных продуктов) в популяции идентичных клеток. Т.е. экспрессия генов – стохастический процесс, обусловленный хаотичностью протекания транскрипции и трансляции, что в конечном итоге приводит к значительным межклеточным различиям уровней мРНК и белков. Эта вариабельность проявляется у разнообразных организмов от одноклеточных до млекопитающих, и ее характеристики зависят как от биофизических параметров, регулирующих экспрессию генов, так и от структуры генной регуляторной сети. Стохастическая экспрессия генов может иметь важные последствия для судьбы как каждой конкретной клетки, так

**Принятые сокращения:** ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, СА – фенетилвый эфир кофейной кислоты, ICR – контрольные области импринтинга, MES – клетки мезенхимы, NPC – предшественники нервных клеток человека, PYY – пириметамин.

и клеточной популяции в целом, будучи полезной функцией в некоторых контекстах и вредной в других (Raj, van Oudenaarden, 2008; Kim, Sauro, 2012; Mitosch et al., 2017). В основе вероятностного характера генной экспрессии могут лежать такие параметры, как реакция на стресс, патогенез, метаболизм, развитие, клеточный цикл, циркадные ритмы и старение (Raj, van Oudenaarden, 2008).

Оптимизация стратегии развития клетки вследствие стохастических процессов — последовательность событий, происходящих на молекулярном и (или) клеточном уровнях, в результате которых приобретаются функционально важные и наследуемые признаки. Конечно, конкретные экологические генетические и эпигенетические сигналы могут оказывать определенное влияние на процесс выбора клеткой стратегии развития, однако предсказать итог невозможно. В результате возникающего фенотипического разнообразия неизбежно появится функционально важное клеточное состояние, наследуемое через несколько клеточных циклов. Необходимость выживания в изменяющихся условиях и потребность в обеспечении оптимального использования ресурсов, определяющие пути дальнейшего клеточного развития, по-видимому, важные движущие силы эволюционного прогресса (Beaumont et al., 2009).

В каждый конкретный момент времени клетка организма любой сложности существует в условиях меняющихся параметров концентраций и находится под воздействием молекулярного шума — стохастических колебаний различной амплитуды и спектров (Balazsi et al., 2011). Экспрессионный шум состоит из собственных и внешних шумов (Elowitz et al., 2002). Внешний или глобальный шум вызван колебаниями концентраций, состояния или местоположения факторов, которые влияют на несколько генов или даже на функциональный потенциал клетки в целом; например, количество рибосом и доступность тРНК можно рассматривать в качестве ограничивающего фактора для общей продукции белка. Кроме того, на уровень внешнего шума могут влиять различия в ресурсах, в энергетическом компоненте или в стадии клеточного цикла, а также морфология клеток (Neves et al., 2010; Zopf et al., 2013; Xu et al., 2015). Внутренний шум вызывается стохастичностью биохимических реакций на каждом этапе экспрессии отдельного гена, включая транскрипцию (например, инициацию транскрипции), посттранскрипционные события (например, деградация мРНК), трансляцию (например, инициация трансляции) и посттрансляционные процессы (например, деградация белка) (Dong, Liu, 2017; Lin et al., 2018). Динамические перестройки хроматина и плотность упаковки ДНК не менее важны для экспрессионных процессов (Beisel, Paro, 2011; Orkin, Hochedlinger, 2011; van Steensel, 2011). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что причиной внутреннего транскрипционного шума служат два источника: 1) пуас-

соновские флуктуации количества мРНК, опосредованные вероятностным характером синтеза и деградации отдельных транскриптов (флуктуации появления/исчезновения мРНК) и 2) переключение промотора между различными состояниями транскрипции (флуктуации промотора) (Singh et al., 2012).

Резюмируя, внешний шум — это различия в уровнях белка между разными клетками; собственный шум — это изменения уровня белка в одной и той же клетке. Концентрация конкретного белка в клетке регулируется двумя реакциями синтеза — транскрипцией и трансляцией — и двумя процессами распада — деградацией мРНК и белков. Скорость транскрипции определяется факторами транскрипции и белками, участвующими в перестройке структур хроматина. Трансляция модулируется РНК-связывающими белками и некодирующими молекулами РНК (микроРНК) (Hausser et al., 2019). Различные комбинации скоростей транскрипции, трансляции, деградации мРНК и белков обеспечивают широкий спектр возможных вариантов количества генных продуктов. Гетерогенность (или шум) экспрессии генов хорошо изучена в последние годы. Многочисленные исследования отдельных клеток и отдельных молекул показали, что активация генов носит характер случайных, прерывистых транскрипционных всплесков (Golding et al., 2005; Cai et al., 2006). Неоднородность экспрессии, вызванная этими быстрыми колебаниями, способствует формированию различных фенотипов и улучшает способность приспосабливаться к изменяющимся условиям на уровне популяции. В последние годы появилось понимание того, что контроль фенотипического разнообразия так же важен, как и быстрое возникновение гетерогенности фенотипов. При этом все больше фактов свидетельствует в пользу важнейшей роли эпигенетических механизмов в регуляции экспрессионного шума (Octavio et al., 2009; Battich et al., 2015; Stoeger et al., 2016; Dong, Liu, 2017; SanMiguel et al., 2018). В обзоре рассматриваются основные эпигенетические механизмы, участвующие в контроле стохастической экспрессии генов, и приводятся конкретные примеры такой эпигенетической регуляции у различных организмов возрастной биологической сложности, начиная с вирусов и заканчивая млекопитающими. Отдельный раздел обзора посвящен функционированию эпигенетической системы контроля экспрессионной вариабельности генов в период развития многоклеточных организмов.

### ЭКСПРЕССИОННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ НАХОДИТСЯ ПОД ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИМ КОНТРОЛЕМ

Контроль шума обеспечивается петлями обратной связи, с помощью *trans*-регуляторов, ковалентными модификациями ДНК и (или) коровых гистонов, избыточностью и модульностью регуляторных последовательностей, а также архитектурой хрома-

тина и ядерной кластеризацией (Panzeri, Pospisilik, 2018). По-видимому, в регуляции стохастической экспрессии генов участвуют и небольшие молекулы некодирующей РНК – микроРНК (Del Giudice et al., 2018; Laurenti et al., 2018).

*Петли обратной связи и ковалентные модификации ДНК и коровых гистонов – важные эпигенетические факторы, регулирующие шум экспрессии генов*

Эпигенетические механизмы регулируют шум посредством прямой модуляции транскрипционных всплесков (Dong, Liu, 2017). В частности, метилирование ДНК и деацетилирование коровых гистонов действуют как репрессоры шума, тогда как ацетилирование гистонов приводит к противоположному эффекту (Battich et al., 2015; Stoeger et al., 2016; Panzeri, Pospisilik, 2018).

Многие эпигенетически регулируемые гены можно считать переключателями, поскольку они имеют два наследуемых состояния экспрессии: “включено/выключено”. Стабильный эпигенетический маркер определяет каждое состояние, поддерживая *cis*- или *trans*-модель эпигенетического регулирования (Octavio et al., 2009).

Молекулярная основа локальных *cis*-маркеров включает ковалентные модификации ДНК или ДНК-ассоциированных белков. К ним относится метилирование ДНК и различные модификации гистонов, определяющие состояние хроматина: молчаливый гетерохроматин или активный эухроматин (Семенова, Филатов, 2013). Глобальные *trans*-маркеры – транскрипционные факторы. Механизмом стабильного, медленного переключения этих уровней являются петли положительной или двойной отрицательной обратной связи, которые генерируют наследственные бистабильные состояния экспрессии генов, связанные с высоким или низким уровнями активности транскрипционных факторов (Gardner et al., 2000; Xiong, Ferrell, 2003; Kaufmann et al., 2007). Переключатели, использующие любую из этих схем, реагируют на факторы окружающей среды, но неоднородность наблюдается даже при постоянных условиях.

Две модели эпигенетического регулирования могут быть объединены. Например, экспрессия фимбрий кишечной палочки *E. coli* регулируется эпигенетическим переключателем, который поддерживает свое состояние как метилированием ДНК, так и петлей положительной обратной связи (Hernday et al., 2004).

Регуляция с помощью генетических механизмов обеспечивает быстрые колебания между неактивным и активным состояниями промотора (> одного раза на клеточный цикл). Состояние активного промотора можно рассматривать как состояние, при котором возможна повторная быстрая инициация транскрипции. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов осуществляется посредством медленных коле-

баний (< одного раза на клеточный цикл) между молчаливым и компетентным состоянием промотора. Кинетика этих флуктуаций в *trans*-кодируемых переключателях, включающих петли обратной связи, была подробно изучена (Mettetal et al., 2006; Kaufmann et al., 2007; Ingolia, Murray, 2007). Как теория, так и эксперимент предполагают, что флуктуации *trans*-фактора, вызванные внешними причинами, преодолевают стабильность двух эпигенетических состояний, приводя к переключению (Kaufmann et al., 2007). Гораздо меньше известно о точной роли регуляторов в модулировании флуктуаций *cis*-переключателей, которые должны учитывать локальные изменения в состоянии промотора.

*Архитектура хроматина и ядерная кластеризация контролируют гетерогенность клеточной популяции*

Получены убедительные доказательства того, что реорганизация хроматина может активировать или подавлять определенные гены и контролировать профили экспрессии генов (Meshorer, Misteli, 2006; Ho, Stabtree, 2010). В частности, “шумные” промоторы (т.е. промоторы, обеспечивающие высоковариабельные экспрессионные профили генов), как правило, обладают особыми характеристиками: например, активность ТАТА-боксов зависит от интенсивности перепрофилирования структур хроматина (Raser, O’Shea, 2004; Newman et al., 2006). Однако, вопреки современной парадигме эпигенетической регуляции, описанной выше, роль хроматина выходит за рамки простого включения и выключения определенных генов. По-видимому, архитектура хроматина контролирует гетерогенность популяции в целом (Golkaram et al., 2017).

Хорошо известно, что компартиментализация клеточных элементов несет глубокий функциональный смысл. В рамках рассматриваемой нами проблемы, пространственное разделение соответствующих молекул внутри и вне ядра действует как фильтр транскрипционного шума (Battich et al., 2015; Stoeger et al., 2016). Высококомпартиментализованные ядра эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) млекопитающих обнаруживают гетерогенные функциональные домены. Например, в ЭСК мыши сайты связывания Sox2 образуют трехмерные кластеры, которые отделены от гетерохроматиновых областей (Liu et al., 2014). При этом кинетика связывания и диффузии Sox2 по-разному регулируется в этих кластерах. В частности, фракция связанных с Sox2 участков генома существенно увеличивается внутри кластеров, что согласуется с локальной повышенной концентрацией эухроматиновых (открытый хроматин) доменов и быстрыми фазами событий диссоциации Sox2, сменяющимися более продолжительными периодами состояния стабильного связывания. Укороченный временной период состояния диссоциации позволяет значительно увеличить число циклов связывание–диффузия предварительно собранных

комплексов транскрипционных факторов и использовать преимущество кооперативных взаимодействий между транскрипционными факторами и хроматином. Кроме того, даже незначительные изменения в положении генов-мишеней в отдельных кластерах могут привести к локальным изменениям поведенческих характеристик транскрипционных факторов при поиске цели. Например, стратегия поиска ДНК-мишени в центре кластера может существенно отличаться от таковой для регуляторных последовательностей на периферии кластеров, т.е. локальный режим поиска цели для транскрипционных факторов может модулироваться в зависимости от внутриядерного расположения. Следовательно, существуют молекулярные механизмы для точной настройки скоростей сборки транскрипционных факторов в определенных *cis*-регуляторных элементах.

В дополнение к этим выводам продемонстрировано, что РНК-полимераза II образует в ядре живой клетки короткоживущие кластеры (т.е. 3-х-мерные области высокой концентрации молекул РНК-полимеразы II) размером меньше дифракционного предела (<250 нм) (Cisse et al., 2013). Среднее время жизни таких кластеров около 5 с, что опровергает общепринятое представление о том, что это статические структуры. Появление кластеров РНК-полимеразы II связывают с транскрипционными всплесками в живых клетках (Cho et al., 2016). Установлено, что транскрипции ДНК с участием РНК-полимеразы II предшествует связывание специфического активатора Sox2 с *cis*-регуляторными элементами (Young, 2011). Основываясь на том факте, что стабильные кластеры сайтов связывания Sox2 локализованы совместно с кластерами РНК-полимеразы II, была выдвинута гипотеза, согласно которой кластеры энхансеров Sox2 служат поливалентными сайтами связывания нескольких факторов транскрипции. Такие комплексы будут действовать как индуктор, запускающий динамическую кластеризацию молекул РНК-полимеразы II, что в конечном итоге приведет к транскрипционному взрыву.

Ядерная компартиментализация способствует фильтрации шума, снижая влияние стохастичности на функционирование клеток. Термин “фильтрация шума” обозначает эффект, оказываемый системой контроля шума на стохастические колебания для снижения их интенсивности и частоты (Battich et al., 2015). Так, у высших эукариот клеточная и ядерная компартиментализация и большое количество внутриклеточных мембран затрудняют диффузию молекул за пределы одного компартмента, влияют на динамику молекулярных взаимодействий и, следовательно, препятствуют распространению флуктуаций в клеточных системах, уменьшая транскрипционный шум в 3–4 раза (Stoeger et al., 2016). Предположительно, этот механизм предоставил эволюционное преимущество сложным многоклеточным организмам, таким как высшие эукариоты.

### *Молекулы микроРНК индуцируют бимодальность в экспрессии их мишеней из-за стохастических эффектов*

МикроРНК – небольшие молекулы некодирующей РНК у эукариот, выступающие в качестве пост-транскрипционных регуляторов. Их роль жизненно важна для многоклеточных организмов. После связывания с молекулой мРНК они предотвращают ее трансляцию и могут усилить ее нестабильность. Предположительно, микроРНК регулируют более 60% генома человека: каждая микроРНК может регулировать несколько мишеней, а одна мишень может регулироваться различными микроРНК (Friedman et al., 2009).

Известно, что фенотипическая диверсификация часто основывается на бимодальном распределении уровней экспрессии генов (экспрессионный профиль конкретного гена приобретает вид двух пиков в ответ на определенный сигнал) (Del Giudice et al., 2018). Ранее как теоретические (Bose, Ghosh, 2012; Bosia et al., 2013), так и *in vitro* исследования (Bosia et al., 2017) указывали на то, что молекулы микроРНК могут индуцировать бимодальность в экспрессии их мишеней из-за стохастических эффектов. Характер взаимодействия между микроРНК и мРНК формирует специфическую зависимость между количеством двух видов молекул РНК в клетке. Число синтезируемых транскриптов в значительной степени зависит от таких параметров, как скорость транскрипции и стабильность молекул мРНК, скорость транскрипции и скорость деградации микроРНК, продолжительность состояния комплементарного спаривания между микроРНК и мРНК и числом сайтов связывания микроРНК на мишени. Если количество микроРНК значительно превосходит количество мРНК, практически все молекулы мРНК будут репрессированы. Если количество микроРНК меньше по сравнению с мРНК, будет дан сигнал к синтезу дополнительных молекул мРНК. Переход к состоянию активной экспрессии осуществляется при очень незначительном числе свободных микроРНК и мишеней (Del Giudice et al., 2018). Поэтому даже небольшие флуктуации количества двух видов РНК могут стимулировать скачкообразный переход системы из “связанного” в “несвязанное” состояние и наоборот. Таким образом, формируется бимодальное распределение (Bose, Ghosh, 2012; Bosia et al., 2013; Bosia et al., 2017).

Различные мишени могут перекрестно регулировать бимодальные распределения друг друга, и их взаимодействие играет ключевую роль в стабилизации отдельных фенотипов (Del Giudice et al., 2018).

Недавно была отмечена важная роль микроРНК в усилении шума в высокоэкспрессируемых генах (Schmiedel et al., 2015). Этот результат следует рассматривать вместе с данными о том, что сигнальные факторы и регуляторы развития в эмбриональных стволовых клетках демонстрируют бимодальные

паттерны экспрессии только в присутствии зрелых микроРНК (Kumar et al., 2014; Klein et al., 2015). В целом эти исследования указывают на участие микроРНК в генерации вариабельности экспрессии генов (Garg, Sharp, 2016). В соответствии с межклеточной изменчивостью микроРНК (Schmiedel et al., 2015) предполагается, что флуктуации в экспрессии микроРНК могут влиять на вариабельность белковых факторов, иницируя переходы между клеточными состояниями.

Возможно, бимодальность, связанная с микроРНК, предоставляет ряд эволюционных преимуществ, обеспечивая высокую межклеточную изменчивость.

Существует и другая точка зрения относительно участия молекул микроРНК в контроле стохастических эффектов. Предполагается, что молекулярные фильтры широко распространены в регуляции генной экспрессии. Молекулы микроРНК могут служить в качестве таких “шумовых фильтров” (Laugenti et al., 2018). В частности, помимо контролирующей транскрипцию петель обратной связи обнаружена петля прямой связи, опосредованная микроРНК, обладающая способностью эффективно уменьшать шум одновременно с регулированием уровня белка (Osella et al., 2011).

Очевидно, что сегодня наших знаний о роли молекул микроРНК в регуляции экспрессионной гетерогенности явно недостаточно. Необходима разработка новых количественных моделей, сфокусированных на взаимодействии между стохастической экспрессией генов и регуляцией с помощью микроРНК и создание специальных синтетических цепей, включающих меченные флуоресцентными метками мишени микроРНК.

#### *Модульность регуляторных последовательностей и принцип избыточности.*

#### *Их влияние на стохастический характер экспрессии с участием транс-регуляторов*

У высших многоклеточных организмов активное состояние гена контролируется не несколькими отдельными белками, как у простых организмов с меньшими геномами, а крупными макромолекулярными комплексами факторов транскрипции. Сборка этих комплексов опосредуется многочисленными сайтами связывания регуляторной последовательности ДНК, зависит от концентрации *trans*-регуляторов, организации сайта связывания и его аффинности с транскрипционными факторами, а также взаимодействиями самих транскрипционных факторов (Spitz, Furlong, 2012; Levine, 2010).

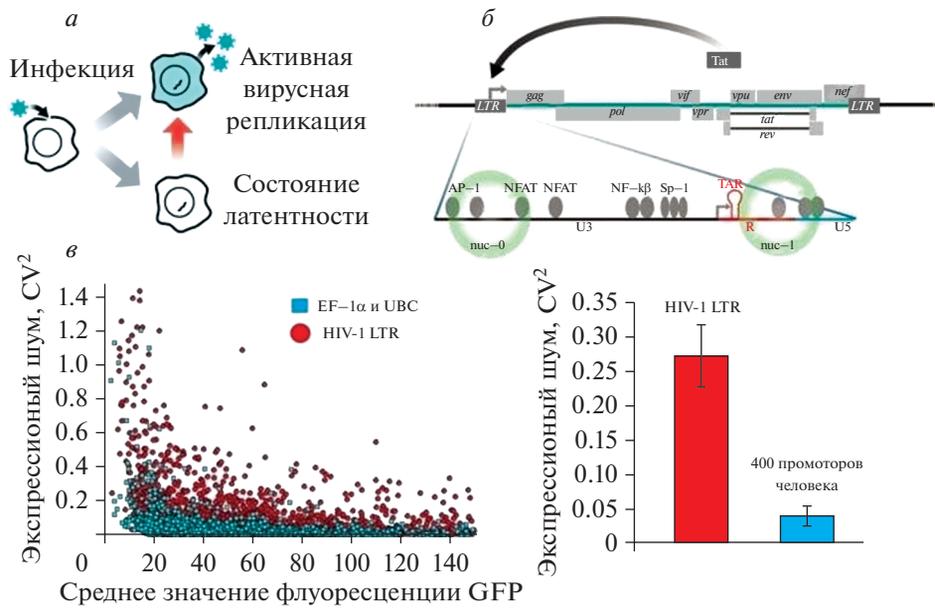
Идентифицированы эндогенные регуляторные последовательности, которые, по-видимому, улучшают способность к выживанию, контролируя определенным образом внутренний стохастический экспрессионный шум. Эпигенетическое регулирование

состояния хроматина обеспечивает надлежащее расположение и координированное взаимодействие всех структурных элементов генома (Boettiger, 2013). Например, изменение пространственного расположения регуляторных последовательностей вблизи сайта инициации транскрипции у мух *Drosophila* может изменить степень синхронизации активации генов (Lagha et al., 2013).

Регуляторные последовательности обычно используют принцип избыточности для снижения экспрессионной вариабельности. Примером могут служить *cis*-регуляторные последовательности – энхансеры (Levine, 2010; Barolo, 2012; Spitz, Furlong, 2012). Экспрессионный уровень гена *snail* у дрозофилы может управляться одной из двух вышерасположенных некодирующих последовательностей. Экспериментально доказано, что любой из этих двух последовательностей достаточно для инициации эндогенной экспрессии *snail*, но вариабельность количества активно транскрибирующихся клеток увеличивается в условиях теплового стресса или при генетическом стрессе, если удаляется любой из энхансеров (Perry et al., 2010). В этом случае доля эмбрионов с аномальной инвагинацией мезодермальных клеток также увеличивается. При изучении регуляторных механизмов формирования щетинок у личинок мухи зафиксирована аналогичная повышенная вариабельность фенотипов в условиях термического или генетического стресса при удалении избыточных энхансеров *shavenbaby* (Frankel et al., 2010).

Эти результаты в совокупности позволяют предположить наличие структурных особенностей генома, которые могли развиваться и сохраняться специально для смягчения шума экспрессии генов. Образование специфических локусов в результате глобальных эпигенетических изменений хроматина способствует максимальной концентрации активных регуляторных элементов (в данном случае энхансеров) в определенном месте в определенное время. Каждый отдельный регуляторный механизм предназначен для защиты от редкой вероятности возникновения того или иного дефекта. Очевидно, что у организмов, не обладающих всей совокупностью таких механизмов контроля вариабельности, шансы на выживание в изменяющихся условиях ничтожны (Boettiger, 2013).

Таким образом, из всего вышесказанного становится очевидным, что эпигенетические факторы влияют на стохастичность экспрессии генов на нескольких уровнях, играя важную роль в возникновении или, напротив, подавлении, как в случае процесса развития, фенотипического разнообразия отдельных клеток или всего организма.



**Рис. 1.** Структура генома ВИЧ и особенности функционирования LTR-промотора. *а* – Функциональные состояния ВИЧ в инфицированной клетке. После заражения CD4+ Т-лимфоцитов ВИЧ входит либо в литическое состояние (активная репликация), ведущее к гибели клеток и продукции вирусного потомства, либо в латентное состояние (ингибирование транскрипции), которое может быть очень длительным (годы), но впоследствии ВИЧ может реактивироваться в литическое состояние (красная стрелка). *б* – Схема организации генома ВИЧ-1 и промотора ВИЧ – LTR. *в* – LTR-промотор ВИЧ генерирует большие стохастические колебания уровня экспрессии. Слева: уровни экспрессии ~ 8000 индивидуальных клеток (по данным количественной кадровой микроскопии), несущих либо промотор LTR ВИЧ, либо промотор генов домашнего хозяйства (фактор элонгации 1 $\alpha$ ), либо промотор убиквитина. По вертикали: измеренный экспрессионный шум (коэффициент вариации уровней экспрессии в квадрате) для каждой проанализированной клетки за 12-часовой период; по горизонтали – показатели среднего уровня экспрессии клетки за 12-часовой период. Справа: экспрессионный шум промотора LTR ВИЧ (красный столбец) по сравнению со средним шумом экспрессии 400 различных промоторов человека (синий столбец). Измерения методом mRNA smFISH подтверждают эти результаты для LTR ВИЧ на уровне мРНК (из Pai, Weinberger, 2017; open access).

## ПРИМЕРЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

В этом разделе мы более подробно остановимся на конкретных примерах эпигенетической регуляции стохастической экспрессии генов у различных организмов возрастающей биологической сложности, начиная с вирусов и заканчивая млекопитающими.

### Вирусы

Вирусы являются одними из самых простых организмов, воспроизводящиеся посредством репликации нуклеиновых кислот и способные размножаться только внутри клеток, в которых они паразитируют.

Многочисленные исследования LTR-промотора вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) показывают, что факторы, участвующие в реорганизации хроматина, экспрессионный шум и реактивация латентного вирусного состояния тесно взаимосвязаны (Boehm et al., 2013; Spina et al., 2013; Dar et al., 2014). При инфицировании CD4+ Т-клеток ВИЧ интегрируется в геном хозяина произвольным образом, но обнаруживает сильное тяготение к активно транскрибируемым локусам (к областям «открытого» хро-

матина) (Schroder et al., 2002; Craigie, Bushman, 2012). Интегрированный провирус ВИЧ может затем перейти в состояние активной репликации (транскрипция с LTR-промотора, экспрессия вирусных белков, сборка вирионов и созревание инфекционной вирусной частицы), что в конечном итоге приводит к гибели клеток. Альтернативный путь – провирус входит в долгоживущее латентное состояние, при котором вирусная транскрипция практически полностью ингибируется (рис. 1а). В дальнейшем в зависимости от условий окружающей среды ВИЧ может самопроизвольно активироваться из латентного состояния, перейдя к активной репликации (Finzi et al., 1997). При этом латентность может модулироваться независимо от состояния клетки-хозяина путем изменения относительных уровней вирусного *trans*-активатора транскрипции Tat (trans-activator of transcription) (Pai, Weinberger, 2017).

*Cis*-регуляторные элементы (сайты связывания) LTR (рис. 1б) и наличие транскрипционных факторов (NF- $\kappa$ B p65/p50, NFAT, STAT5 и AP-1) влияют на вероятность вирусной латентности (Mbonye, Karn, 2014). Молекулы РНК-полимеразы II обычно останавливаются вблизи области TAR после инициации транскрипции в LTR, в результате чего синте-

зируются короткие транскрипты длиной 59 п. о. В случае с ВИЧ считается, что остановка РНК-полимеразы II вызвана связыванием отрицательного фактора элонгации (NELF) с TAR. Этот фактор индуцирует репрессивное расположение нуклеосом вдоль LTR (Rafati et al., 2011), и такое расположение нуклеосом сопряжено с пуассоновскими стохастическими флуктуациями транскрипции (Brown, Voeger, 2014). Т.е. экспрессия локуса носит характер нечастых эпизодических всплесков из-за переключений LTR-промотора (режим переключения двух состояний включено/выключено), опосредованных эпигенетическими механизмами регуляции.

При этом задержка РНК-полимеразы II представляет состояние “выключено”, элонгация – состояние “включено”, кроме того, несколько молекул РНК-полимеразы II могут одновременно продолжать элонгацию, пока LTR находится в состоянии “включено”, прежде чем оно перейдет в состояние “выключено”. Это переключение сопровождается выбросом транскриптов (каждый комплекс РНК-полимеразы II участвует в синтезе молекулы мРНК), что приводит к высоким уровням зависящей от времени экспрессионной варибельности: длительные периоды “выключено” сменяются краткосрочными интенсивными транскрипционными всплесками. Скорость переключения промотора определяет частоту и амплитуду каждого транскрипционного всплеска (то есть количества молекул мРНК, продуцируемых за один период). Доказано, что экспрессионный шум ВИЧ в первую очередь (>90%) обусловлен эпигенетически регулируемым флуктуациями LTR-промотора (Singh et al., 2012).

По сравнению с промоторами человека LTR ВИЧ является исключительно «шумным» промотором (рис. 1б) (Singh et al., 2012). Учитывая эволюционную пластичность ВИЧ, этот высокий уровень шума весьма примечателен: при прочих равных условиях вирус предпочтительно должен выбирать такой механизм функционирования LTR промотора, который обеспечивает максимальную степень репликации, но тогда это должен быть промотор с низким уровнем шума. Однако высокий экспрессионный шум, по-видимому, отражает вирусную адаптацию, позволяющую ВИЧ, находящемуся в латентном состоянии, использовать стохастические колебательные процессы для оптимизации стратегии дальнейшего развития, что обеспечивает его максимальное распространение (Pai, Weinberger, 2017).

После инициации транскрипции в LTR и остановки РНК-полимеразы II белок Tat распознает и связывается с TAR, привлекает pTEFb (the positive transcription elongation factor complex), что в конечном итоге иницирует дальнейшее продвижение РНК-полимеразы II и увеличивает эффективность элонгации транскрипции в 50–100 раз. Активность Tat также связана с привлечением комплексов модификации и ремоделирования хроматина в LTR, что

приводит к масштабным посттрансляционным модификациям хроматина (Pai, Weinberger, 2017).

В частности, члены семейства комплексов SWI/SNF (SWItching/Sucrose Non-Fermenting), такие как BAF и Polybromo-ассоциированный BAF (PBAF), регулирующие загруженность ДНК нуклеосомами, являются обязательными участниками процесса ремоделирования хроматина (Ho, Crabtree, 2010). Известно, что они также вовлечены в процесс инфицирования ВИЧ (Rafati et al., 2011; Mbonye, Karn, 2014). Ингибирование BAF изменяет нагрузку нуклеосомами LTR-промотора ВИЧ и активизирует транскрипцию (Rafati et al., 2011).

Поскольку эпигенетическая регуляция в значительной степени влияет на экспрессионный шум ВИЧ, эпигенетические механизмы могут быть использованы при создании новых лекарственных антивирусных препаратов. Экспериментальные данные свидетельствуют о восприимчивости ВИЧ к методам лечения, направленным на нарушение опосредованной Tat-положительной обратной связи, либо путем прямого воздействия на Tat, либо посредством нарушения взаимодействия Tat-TAR (Pai, Weinberger, 2017). В частности, нарушение ацетилирования—деацетилирования Tat может блокировать опосредованную Tat активацию транскрипции LTR (Pagans et al., 2005). Обработка TNF $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа) приводит к увеличению частоты и амплитуды транскрипционного взрыва, и это связано с различиями в ацетилировании гистонов и накоплением молекул приостановленной РНК полимеразы II (Dar et al., 2012).

Ремоделирование хроматина и BAF-опосредованный контроль шума экспрессии генов расширяют набор инструментов для разработки медикаментозной терапии и для лучшего понимания последствий стохастичности в живых системах. Например, коктейли ингибиторов BAF – фенетиловый эфир кофейной кислоты (CA, Caffeic acid phenethyl ester) и пириметамин (PYR, Pyrimethamine) (ингибиторы BAF250a – субъединицы транскрипционного фактора Brahma (BAF), ассоциированного с АТР-зависимым комплексом ремоделирования хроматина) совместно с активаторами транскрипции продемонстрировали синергизм при реактивации ВИЧ из латентного состояния (Spina et al., 2013; Dar et al., 2014). Недавно с помощью математического моделирования показано, что ингибиторы BAF – CA и PYR – могут независимо модулировать скорость инициации транскрипции (частоту возникновения взрывов) и амплитуду транскрипционного взрыва (Megaridis et al., 2018). В частности, увеличение концентрации CA сохраняет уровни шума при одновременном увеличении среднего уровня экспрессии, что позволяет настраивать определенную интенсивность транскрипционного взрыва, в то время как PYR увеличивает частоту событий инициации тран-

скрипции при сохранении постоянной амплитуды транскрипционного взрыва.

В заключение подчеркнем, что такие терапевтические агенты, вероятно, будут в меньшей степени подвержены воздействию быстро эволюционирующей резистентности вирусов, т. к. восстановление саморегулирующейся цепи потребует от вируса одновременной реорганизации как *cis*-регуляторного элемента (сайт связывания ДНК), так и *trans*-элементов (факторы транскрипции).

### Бактерии

В изменяющихся условиях популяции микробов с разнообразными фенотипами имеют преимущество по сравнению с фенотипически однообразными популяциями. Широко используемой стратегией, которая генерирует фенотипическую гетерогенность в популяциях клональных микробных клеток, является эпигенетическая регуляция (Octavio et al., 2009). В этом случае различные состояния экспрессии генов не связаны с изменением последовательности ДНК и наследуются эпигенетически.

Путем измерения скорости роста и морфологических характеристик отдельных клеток *Bacillus subtilis* были идентифицированы три возможные стратегии клеточного развития: образование спор, образование вегетативных (делящихся) клеток и лизис клеток. Эта фенотипическая бифуркация не зависела от возраста клетки, но повторялась в “клеточных семействах”, включающих саму клетку и всех ее потомков, подразаумевая эпигенетическую наследственность, предопределяющую принятие такого решения (Jablonka, Raz, 2009). Эти наследуемые свойства коррелировали с активностью *SpoIIA* промотора и исчезали при нарушении петли обратной связи с участием *Sad67*, демонстрируя важность посттрансляционной (а не транскрипционной) положительной обратной связи в наследовании определенного пути клеточного развития.

Паразит *Plasmodium falciparum*, вызывающий малярию у людей, и кишечная палочка *E. coli* используют эпигенетические механизмы для контроля экспрессии антигенов клеточной поверхности (Avegu, 2006) и, возможно, благодаря этому эпигенетическому механизму, избегают иммунного надзора и (или) выживают в непредсказуемо меняющейся среде.

У различных бактерий участки суперскрученной ДНК способствуют экспрессионному взрыву высокоэкспрессирующихся генов, топологически ограниченных короткими петлями. Более того, *cis*-регуляторные элементы с низким сродством и нестабильные белковые комплексы могут играть ключевую роль в регуляции транскрипции бактерий (Wang et al., 2018). Известно, что механизмы регуляции семейств генов в субтеломерных областях хромосом, регулируются эпигенетически (Octavio et al., 2009). К ним относится семейство генов *EPA* у патогена *Candida glabrata* (De Las Penas et al., 2003). Вариабельность в

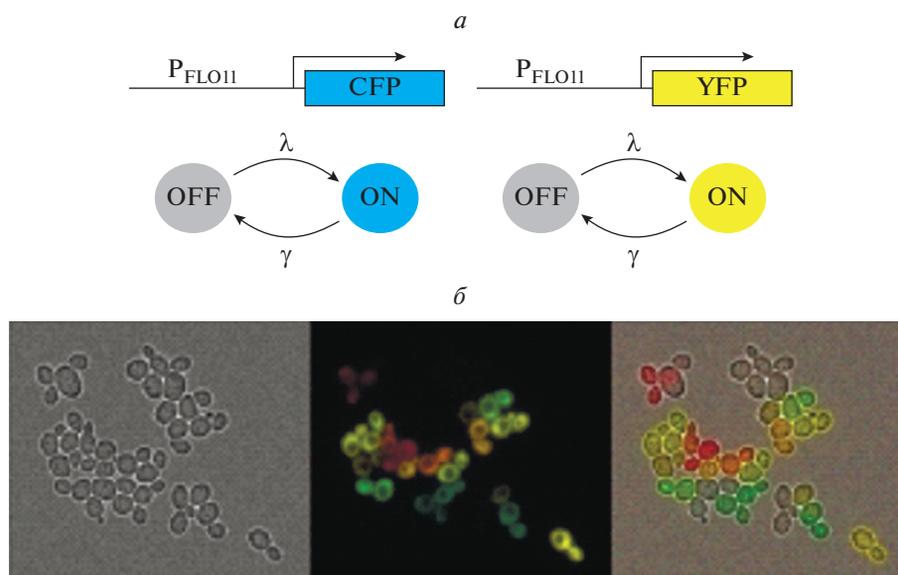
экспрессии гена *EPA* позволяет *C. glabrata* быстро колонизировать новые ткани хозяина и избегать иммунного надзора. Взаимосвязаны или нет сигналы включения/выключения таких генов? Зависит ли это от механизмов их молчания (SIR-зависимых и т.д.), их относительного расположения или наличия граничных элементов? Какие *trans*-факторы регулируют промоторные переходы? На все эти вопросы еще предстоит ответить.

### Дрожжи

У диплоидных дрожжей locus каждого гена переключается медленно, случайным и независимым образом, причем скорость переключения зависит от условий окружающей среды (Octavio et al., 2009).

В диплоидном организме эпигенетически регулируемый ген может демонстрировать четыре различных состояния экспрессии, если каждая копия переключается независимо. При универсальном кодировании с участием *trans*-регуляторов обе копии реагируют на один и тот же фактор и должны переключаться координированно. Однако при локальном кодировании каждая копия может реагировать независимо, если флуктуация, которая вызывает переключение, является молекулярным событием, которое происходит локально в одной копии. Продемонстрировано случайное и независимое переключение двух копий репортерного гена, встроенного в молчащие локусы *HMR* и *HML*, ответственные за типы спаривания у дрожжей *S. cerevisiae*. Наблюдались четыре отчетливых экспрессионных профиля при нарушении состояния молчания этих локусов, зависящего от белков *SIR*, функцией которых является образование компактной структуры хроматина, которая мешает взаимодействию теломерных областей хромосомы с теломеразой и другими ферментами (Xu et al., 2006).

Многочисленные эпигенетические *cis*-переключатели, переключающиеся случайным образом, могут привести к объединенному взрыву состояний экспрессии и представляют собой мощную стратегию создания фенотипического разнообразия. *Flo11p* *S. cerevisiae* является белком адгезии, кодирующий его ген – член генов семейства *FLO*, которые играют важную роль в обеспечении межклеточных и гидрофобных взаимодействий на клеточной поверхности (Verstrepen, Klis, 2006). В дополнение к традиционной регуляции посредством сигнальных путей *MAPK* и *PKA*, по меньшей мере еще три механизма контролируют активность адгезинов клеточной поверхности: регуляция ploидности, частая рекомбинация tandemных повторов в генах адгезина и эпигенетическое молчание (Halme et al., 2004; Octavio et al., 2009). При этом выключенное состояние гена *FLO11* поддерживается независимо от белка *SIR* (Halme et al., 2004). Учитывая важность фенотипического разнообразия адгезинов и эпигенетического молчания гена *FLO11*, независимое переключение



**Рис. 2.** Смешанные состояния экспрессии и независимое переключение в локусе *FLO11*. *a* – Двойной репортерный анализ. Каждый аллель *FLO11* включается и выключается медленно с одинаковыми скоростями  $\lambda$  и  $\gamma$ , поскольку два репортера эквивалентны. *б* – Смешанные состояния экспрессии. Двойной репортерный штамм, выращенный в богатой среде (без глюкозы), дополненной 1%-ным этанолом и 2%-ным глицерином. Видны все четыре возможных состояния экспрессии (из Octavio et al., 2009; open access).

может представлять четвертый механизм генерации экспрессионных вариаций.

Промотор *FLO11* (3.5 т. п. н.) является одним из самых крупных у *S. cerevisiae* и регулируется многими факторами. Полагают, что подавление активности *FLO11* обеспечивается посредством рекрутирования гистондеацетилазы Hda1p с участием репрессора Sfl1p (Halme et al., 2004). Сайт связывания репрессора Sfl1p перекрывает сайт связывания активатора Flo8p. Активация *FLO11* с помощью сигнального пути протеинкиназы А (PKA) приводит к фосфорилированию как Sfl1p, так и Flo8p. Фосфорилирование отключает связывание Sfl1p, но индуцирует присоединение Flo8p. Дополнительные факторы транскрипции, включая Ste12p/Tec1p и Phd1p, связываются с этим промотором (Rupp et al., 1999; Pan, Heitman, 2002). Этим белкам-активаторам для активации необходим Flo8p. Два других активатора, Msn1p и Mss11p, не требуют Flo8p для активации и функционируют с помощью не изученных пока механизмов, которые, по-видимому, не требуют связывания с ДНК (Gagiano et al., 1999). Msn1p действует на больших расстояниях, дестабилизируя хроматин (Lorenz, Heitman, 1998). Все эти активаторы играют различные кинетические и функциональные роли в эпигенетической регуляции *FLO11* (Octavio et al., 2009).

Промотор *FLO11* (рис. 2) способен к обратимым переходам между состояниями “выключено” (молчание) и “включено” (компетентное) (Halme et al., 2004). Чтобы определить, были ли переходы вызваны *cis*- или *trans*-флуктуацией, использовали анализ

двойного репортера: две копии промотора *FLO11* диплоидных дрожжей запускали транскрипцию различных по цвету вариантов флуоресцентного белка (Venus YFP и Cerulean CFP) (рис. 2*a*). При культивировании в средах, обедненных углеродом, включая этанол, глицерин, галактозу и рафинозу, наблюдались все четыре возможных состояния экспрессии (рис. 2*б*) (Octavio et al., 2009).

Убедительно показано, что каждый аллель *FLO11* переключается независимо. При этом переключение из одного состояния в другое не коррелировало со стадиями клеточного цикла, а эпигенетическая регуляция переключения промотора *FLO11* не зависела от белка SIR. Приводятся доказательства того, что ген *FLO11* является *cis*-кодированным эпигенетическим переключателем, анализируются кинетические роли *trans*-факторов в эпигенетической и традиционной регуляции *FLO11*. Определены три класса *trans*-регуляторов *FLO11* в контроле как медленных, так и высоких скоростей перехода: 1) контролирующие стабильность компетентного состояния промотора, влияя на его медленные колебания; 2) регулирующие частоту всплесков транскрипции из-за быстрых колебаний промотора; 3) осуществляющие обе функции. По-видимому, контроль перехода между состояниями промотора распределяется между различными классами регуляторов (Octavio et al., 2009). Такой механизм позволяет клетке формировать гетерогенную экспрессию *FLO11* в изогенной популяции, используя различные комбинации регуляторов. Поскольку *FLO11* кодирует белок клеточной мембраны, отвечающий за межклеточные взаи-

модействия, этот механизм позволяет клеточным популяциям иметь контролируемую фракцию находящихся в непосредственной близости клеток.

Таким образом, механизмы контроля эпигенетического молчания и традиционной активации генов и их взаимодействие обеспечивают пластичность при формировании фенотипа в популяции клеток дрожжей.

### *Млекопитающие*

Очевидно, что выявление и описание структуры регуляторных сетей, управляющих выбором того или иного пути развития у клеток млекопитающих, а также анализ контролирующей функции эпигенетических механизмов в экспрессионной гетерогенности требует больших усилий, нежели у низших организмов. Тем не менее, в последнее время появляются экспериментальные и теоретические работы, указывающие на участие эпигенетической регуляции экспрессионного шума в клетках млекопитающих.

Немногочисленные пока примеры показывают, что, по-видимому, большинство важнейших клеточных процессов у млекопитающих обусловлены стохастической экспрессией генов (Balazsi et al., 2011). Выбор клеткой дальнейшего пути развития происходит посредством переключений экспрессии специфических генов. Как правило, события активации этих генов тесно связаны с флуктуациями уровней вышестоящих по сигнальной цепи транскрипционных факторов, но также они могут регулироваться *cis*-эпигенетическими механизмами в отдельных генных локусах. В недавней экспериментальной работе анализировались особенности активации гена *Bcl11b*, определяющего специализацию Т-клеток (Ng et al., 2018). Для отслеживания *cis* и *trans* эффектов использовали мышинные Т-лимфоциты, у которых две копии *Bcl11b* были помечены различными флуоресцентными белками. Микроскопический анализ клеток предшественников (претимоцитов) показал, что активация *Bcl11b* наступала после стохастической задержки, составляющей в среднем несколько дней, при этом продолжительность задержки варьировала не только между клетками, но и между аллелями *Bcl11b* в одной и той же клетке. Обнаружено, что дистальный энхансер контролирует скорость эпигенетической *cis*-активации, в то время как параллельная Notch-зависимая *trans*-активация стимулируется предварительно активированными локусами. Эти результаты показывают, что переключения с одного на другой путь развития могут контролироваться стохастическими событиями *cis*-активации в отдельных хроматиновых локусах.

Один из потенциальных источников стохастичности может относиться к уникальным свойствам отдельных локусов, связанных с геномным импринтингом. Импринтированные гены экспрессируются из одного родительского аллеля и регулируются

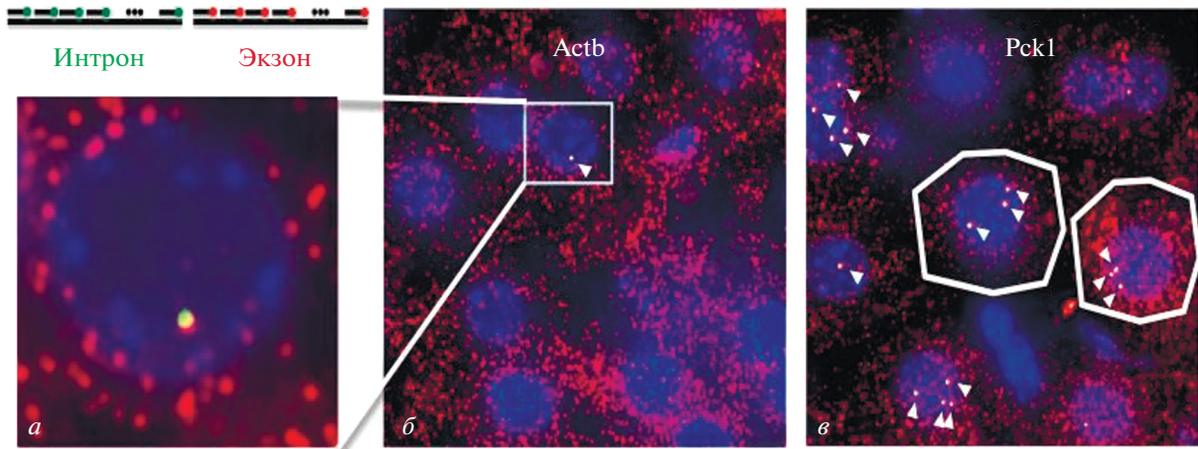
дифференциальным метилированием ДНК в контрольных областях импринтинга (imprinting control regions, ICR). ICR могут различаться по размеру, контексту генома и структуре хроматина, составу последовательности, количеству и идентичности сайтов связывания *trans*-факторов, а также эпигенетическими механизмами геномного импринтинга (SanMiguel et al., 2018).

Еще в одном исследовании предоставлены прямые доказательства пульсирующего характера экспрессии генов в интактных тканях млекопитающих (Bahar et al., 2015). Обнаружено, что промоторы генов клеток печени мыши стохастически переключаются между двумя эпигенетическими состояниями: транскрипционно активных и транскрипционно неактивных, создавая внутреннюю вариабельность между клетками, которые считаются идентичными с точки зрения плоидности и расположения (рис. 3). Промоторы генов с короткими временами жизни мРНК активны более длительное время, способствуя быстрой реакции на экспрессионные взрывы. При этом печень, по-видимому, может уменьшать вариабельность посредством усреднения во времени и полиплоидии.

Если снижение уровня шума давало клеткам печени определенное эволюционное преимущество, в чем состоит функциональная выгода взрывообразной транскрипции? Транскрипционно активный хроматин, непрерывно транскрибирующий мРНК, был бы более эффективным механизмом в снижении вариабельности, нежели эпигенетические модификации, поддерживающие пульсирующий характер транскрипции. Одним из возможных преимуществ пульсирующей транскрипции, по мнению авторов статьи, может быть защита “закрытой” ДНК от повреждений. Ранее эта функция приписывалась нуклеосомной структуре (Chen et al., 2012). Такая защита с помощью метилирования ДНК и модификаций коровых гистонов может быть особенно важной в свете дезинтоксикационной роли печени.

### ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИОННОГО ШУМА В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

Развитие животных является строго регулируемым пространственно-временным процессом, приводящим к образованию разнообразных тканей и органов. Хотя межклеточные различия, вызванные стохастическими колебаниями биомолекул, могут быть полезны для одноклеточных организмов (Raj, van Oudenaarden, 2008) или для оптимизации стратегии развития клеток при определенных условиях (Magklara, Lomvardas, 2013), по-видимому, они невыгодны во время развития, когда клетки должны вести себя согласованно (Raj, van Oudenaarden, 2008; Lagha et al., 2013; Stapel et al., 2017). Однородная экспрессия генов, определяемая как наличие сходных уровней транскриптов в конкретной группе клеток,

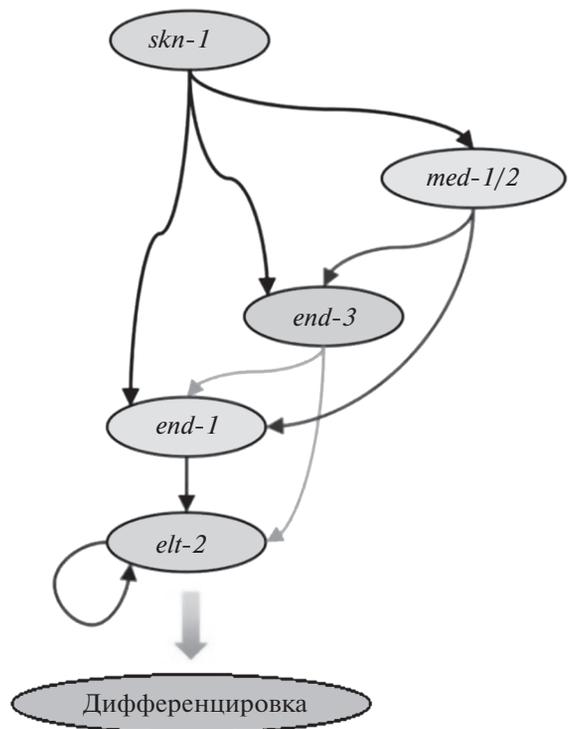


**Рис. 3.** Демонстрация взрывного характера активации промоторов в клетках интактной печени мыши. *а* – Двухцветная маркировка интронов и экзонов показывает активные сайты транскрипции. Красные точки – визуализация молекул мРНК бета-актина (*Actb*) с использованием наборов флуоресцентно меченых зондов, нацеленных на экзоны. Зеленые точки – визуализация предшественников молекул мРНК бета-актина с использованием наборов флуоресцентно меченых зондов, нацеленных на интроны. *б* – Демонстрация единичных сайтов синтеза мРНК бета-актина с низкой скоростью транскрипции и стабильными транскриптами. *в* – Демонстрация многочисленных сайтов активного синтеза мРНК фосфоенолпируваткарбоксикиназы 1 (*Pck1*) с высокими скоростями деградации транскриптов. Выделены два соседних гепатоцита, существенно различающиеся по количеству транскриптов (из Bahar et al., 2015; open access).

важна для эмбрионального развития. Таким образом, в процессе эволюции должны были сформироваться механизмы контроля экспрессионного шума, которые, с одной стороны, позволяют клетке изменять свою транскрипционную программу и, таким образом, дифференцироваться во многие уникальные типы клеток, которые в конечном итоге составляют целый организм, а с другой стороны, не позволяющие стохастическим процессам выходить за определенные рамки. Действительно, функция значительной части генома нацелена на уменьшение вероятности возникновения редких молекулярных событий, нарушающих программу дифференцировки (Voettiger, 2013). Более того, многочисленные исследования последних лет позволяют предположить, что основополагающая роль в регуляции стохастической изменчивости в период клеточной дифференцировки принадлежит эпигенетическим механизмам (концентрация факторов транскрипции, архитектура энхансер-промотор, эпигенетическое окружение, позиционирование генов и ремоделирование хроматина) (Voettiger, 2013; Dong, Liu, 2017; Golkaram et al., 2017; Lin et al., 2018; SanMiguel et al., 2018).

В частности, доказательства важности эпигенетического контроля варибельности экспрессии были получены при анализе экспрессионного паттерна клеток-предшественников кишечника в эмбрионах *Caenorhabditis elegans* (нематода) (Raj et al., 2010). В эмбриональных клетках нематоды был проведен мониторинг уровня транскрипции мРНК в регуляторном каскаде, состоящем из нескольких петель обратной связи, контролирующем экспрессию важного для развития клеток-предшественников кишечника

гена *elt-2*, активатором которого является ген *end-1* (рис. 4). Мониторинг мРНК в клетках сотен эмбрионов позволил нарисовать следующую картину по-



**Рис. 4.** Генная регуляторная сеть, контролирующая клеточную специализацию во время развития *Caenorhabditis elegans* (из Balazsi et al., 2011; open access).

следовательной активации генов в процессе развития нематоды: ранний всплеск экспрессии *med-1/2* сменяется более широким пиком экспрессии *end-3* и длительным периодом высокой экспрессии *end-1*. В результате этих событий, наблюдалась высокая и стабильная экспрессия *elt-2*. Т.е., начиная с некоторого порогового уровня экспрессии *end-1*, происходит переключение петли положительной обратной связи в состояние высокой экспрессии *elt-2*, способствуя формированию клеток кишечника. У эмбрионов, мутантных по транскрипционному фактору *skn-1*, активирующему *end-1*, экспрессия всех вышеперечисленных генов предварительной стадии была снижена или отсутствовала вовсе, и, как следствие, большинство эмбрионов практически не экспрессировало *elt-2*. Сильная вариабельность уровня экспрессии *end-1* свидетельствует о том, что мутации *skn-1* ослабляют запрограммированную изначально супрессию молекулярных шумов (Raj et al., 2010). Снижение уровня экспрессии гистоновый деацетилазы *hda-1* частично исправляет *skn-1* мутантный фенотип, указывая на участие эпигенетических механизмов (ремоделирование хроматина с помощью измененного гистонового кода) в подавлении стохастического шума и обеспечении правильной спецификации клеток при дифференцировке (Balazsi et al., 2011).

Недифференцированные клетки характеризуются открытым хроматином, генерирующим в глобальном масштабе высокие уровни стохастической экспрессии генов, т.е. экспрессионный шум является отличительной чертой плюрипотентности, в то время как дифференциация связана с постепенным переходом хроматина в закрытое состояние и снижением шума. Межклеточные взаимодействия стабилизируют фенотипы и поддерживают относительную однородность экспрессионных паттернов близлежащих клеток во время развития, в то время как нарушение этих взаимодействий ответственно за повышенный шум экспрессии, который может быть причиной нарушения процесса дифференцировки, обеспечивая клеткам фенотипическую пластичность (Capp, 2017). Например, у эмбрионов *C. elegans* отсутствие некоторых *trans*-регулируемых рецепторов Frizzled, активирующих путь сигнальных белков Wnt, увеличивает вариабельность экспрессии *mab-5* в нейробластах (Ji et al., 2013). Этот повышенный экспрессионный шум *mab-5* нарушает дифференцировку и приводит к неправильному расположению некоторых дочерних клеток. Таким образом, для поддержания низкой вариабельности экспрессии *mab-5* и обеспечения надлежащего развития нейробластов необходим контроль, связанный с соответствующей архитектурой хроматина и межклеточными взаимодействиями. В дальнейшем структурирование ткани уменьшает шум экспрессии генов благодаря установлению стабильных межклеточных взаимодействий и внутриклеточным сигнальным путям. Эта коммуникация способствует постепенному переходу

хроматина из открытого состояния в конденсированный гетерохроматин по окончании процесса дифференцировки (MacArthur, Lemischka, 2013).

У мух *Drosophila* экспрессионный шум транскрипционного фактора Yan, ответственного за поддержание клеток глаза в мультипотентном состоянии, временно увеличивается в период, предшествующий дифференцировке (Pelaez et al., 2015). Затем с помощью эпигенетических механизмов обеспечивается снижение шума Yan, способствующее переходу к дифференцировке и стабилизации дифференцированных клеток. По-видимому, динамическая гетерогенность Yan является необходимым элементом переходного процесса. Усиление вариабельности периодов активности промотора *snail* у *Drosophila*, приводит к дефектам нижестоящих сигнальных путей, необходимых для правильной дифференцировки, что также иллюстрирует важность контроля стабильных экспрессионных уровней для нормального развития (Boettiger, 2013).

Эти примеры показывают, что в процессе развития Eumetazoa эпигенетическое регулирование состояния хроматина поддерживает правильную дифференцировку, обеспечивая надлежащее расположение и координированное взаимодействие всех структурных элементов этой цепи, минимизируя последствия стохастических шумов.

Перейдем к более сложным организмам. Здесь мы наблюдаем сходную картину. Анализ экспрессии генов с широким спектром функций от метаболических ферментов до факторов транскрипции: *sox19a*, *tbx16*, *slc25a22*, *irwd1*, *apoeb*, *aldob*, *zic2b*, *mex3b* в эмбрионах рыбок данио во время перехода от средней бластулы к началу гаструляции показал, что стохастическая активация генов первоначально приводит к большим межклеточным различиям в уровнях транскриптов. Обнаружены значительные различия в скорости активации, как между генами, так и для отдельных генов между клетками эмбрионального глубокого слоя и клетками эмбрионального внешнего слоя.

Однако эта вариабельность уменьшается по мере приближения эмбрионов к стадии гаструляции (Stapel et al., 2017). Учитывая, что драматические изменения в структуре хроматина происходят во время активации генома зиготы у рыбок данио, эпигенетические механизмы (в частности, ремоделирование хроматина вблизи промоторов) могут играть важную роль в этих процессах (Vastenhouw et al., 2010; Zhang et al., 2014).

В последние годы пристальное внимание исследователей направлено на изучение плюрипотентных ЭСК млекопитающих из-за их способности к самообновлению и дифференцировке во все основные клеточные линии. Приверженность типу клеток контролируется регуляторными сетями плюрипотентности, структура которых исключительно сложна и состоит из генетического, эпигенетического и

сигнального слоев (Dunn et al., 2014; Martello, Smith, 2014; Lin et al., 2018). В ряде исследований, посвященных транскрипции генов, регулирующих плюрипотентность, обнаружена высокая вариабельность уровней транскрипционных факторов в клетках (Cahan et al., 2010; Kumar et al., 2014; Singer et al., 2014). Было выдвинуто несколько гипотез о функциональной роли высокогетерогенной экспрессии транскрипционных факторов плюрипотентности. В основном ученые сходятся во мнении, что стохастические отклонения в уровнях транскрипционных факторов (транскрипционный шум) играют положительную роль, поддерживая оптимальное для восприятия сигналов дифференцировки состояние субпопуляции плюрипотентных клеток (Masui, 2007; Kalmar et al., 2009). Интересно отметить, что поиск мишени транскрипционным фактором происходит методом проб и ошибок (Chen et al., 2014). В частности, связывание факторов плюрипотентности *Oct4* и *Sox2* с энхансером перемешалось многочисленными раундами случайных столкновений с хроматином. Хотя отдельные события взаимодействия транскрипционных факторов с ДНК являются стохастическими, динамические параметры связывания (частота выбора сайта связывания и среднее время пребывания в связанном состоянии) очень чувствительны к концентрациям транскрипционных факторов в ядре, биофизическим показателям взаимодействия транскрипционный фактор-ДНК и эпигенетическим характеристикам локусов взаимодействия (Dong, Liu, 2017).

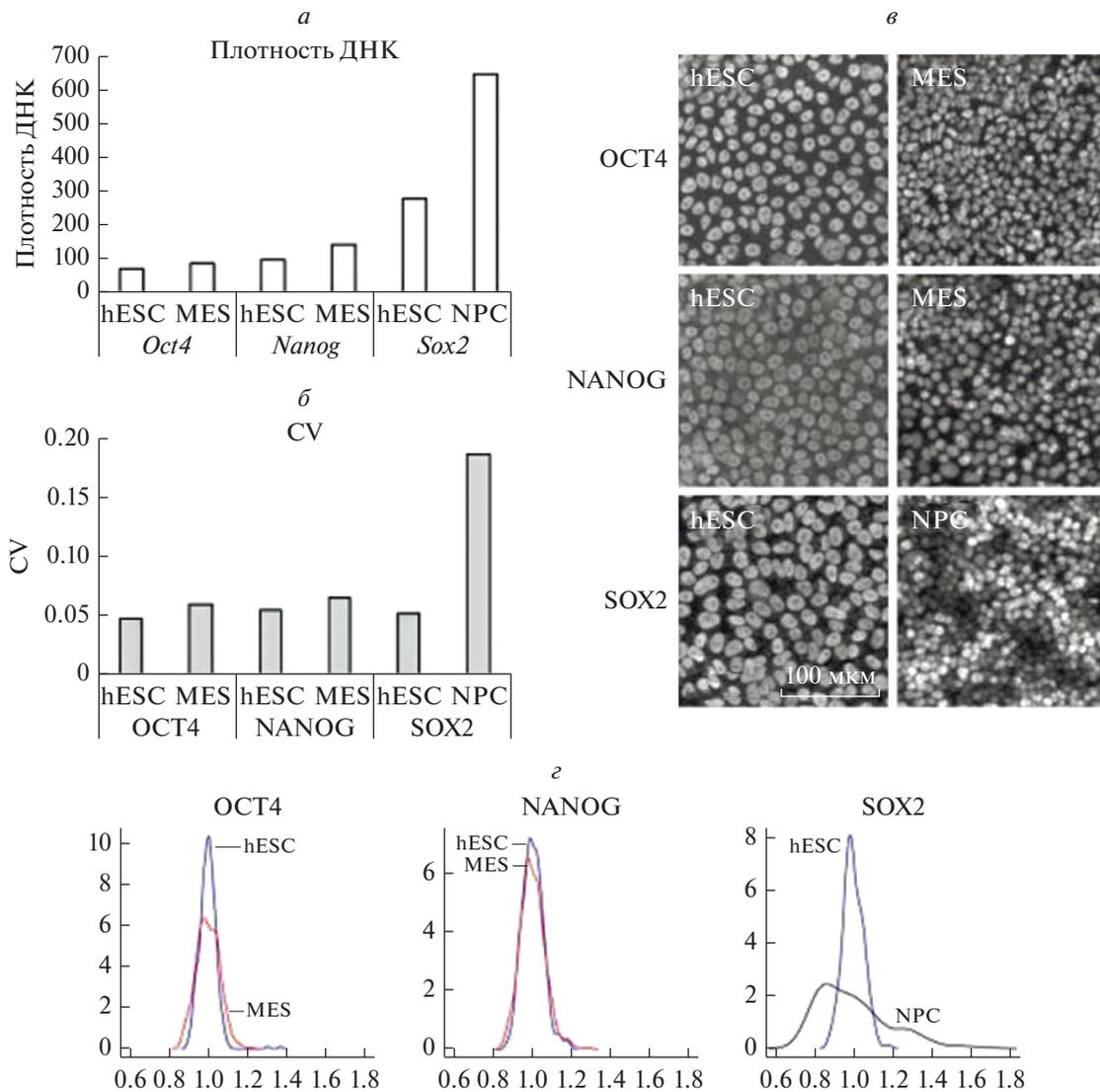
Переключение генов (из-за стохастического связывания транскрипционных факторов с регуляторными последовательностями генома), вероятно, является доминирующим источником гетерогенности в популяциях транскрипционных факторов регуляторных сетей ЭСК (Lin et al., 2018), а изменения в скоростях переключения генов – важным идентификатором глобальных эпигенетических модификаций, которые могут изменять скорости доступа факторов транскрипции к сайтам, заблокированным структурами хроматина (Di Piergo et al., 2017). При этом более медленное переключение генов генерирует в большей степени гетерогенные распределения факторов транскрипции, что, в свою очередь, делает сеть более чувствительной к изменениям внеклеточных сигналов. Например, ген фактора плюрипотентности *Nanog* демонстрирует ярко выраженный взрывообразный характер транскрипционной активности в ЭСК мыши. Однако частоту и продолжительность транскрипционных взрывов *Nanog* можно изменить, переведя клетки из сыворотки в культуральную среду 2i (two small-molecule inhibitors) (Dong, Liu, 2017). Более того, сигналы цитокина LIF (лейкемия-ингибирующий фактор) и 2i исключительно важны для поддержания стабильности плюрипотентных состояний. Изъятие какого-либо из этих сигналов приводит к устойчивому снижению уровня экспрессии факторов плюрипотентности

*Nanog/Oct4/Sox2* и инициирует формирование специализированного фенотипа клеток (Dong, Liu, 2017; Lin et al., 2018). Таким образом, плюрипотентное состояние поддерживается с помощью внеклеточных сигналов и молекулярного шума переключения генов, регулируемого посредством глобальных эпигенетических изменений (Lin et al., 2018).

Переход плюрипотентных ЭСК к дифференцировке сопровождается образованием областей конденсированного гетерохроматина и накоплением эпигенетических меток молчащего состояния хроматина (Golkaram et al., 2017). В частности, обнаружено изменение конформации хроматина в высокоэкспрессирующихся генах *Sox2* и в генах, чьи средние уровни экспрессии в ЭСК остаются неизменными, что указывает на контролируемую гетерогенность экспрессии генов функцию эпигенетических факторов во время дифференцировки ЭСК. По-видимому, реорганизация хроматина изменяет кинетику повторного связывания транскрипционных факторов в определенных локусах генома, влияя на экспрессионные профили генов (Golkaram et al., 2017).

Чтобы проверить, как изменения плотности хроматина связаны с изменением экспрессии генов во время дифференцировки ЭСК, исследовали процессы формирования предшественников нервных клеток человека (neural progenitor cell, NPC). Для оценки зависимости вариабельности экспрессии многочисленных генов (*rnf182*, *col4a6*, *znf44*, *ctnnd2*, *znf607*, *lig4*, *fbxw5*, *klhl13*, *pan2* и др.) от плотности ДНК исследовали клетки H1hESC (H1 human embryonic stem cell) и H1NPC. Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что основная роль здесь принадлежит белкам ремоделирования хроматина (Golkaram et al., 2017). По-видимому, функциональная роль хроматиновых петель, регулируемых СССТС-связывающим фактором (СТСФ), заключается в модуляции гетерогенности экспрессии генов плюрипотентности (*Sox2*, *Oct4* и *Nanog*) при дифференцировке. Еще одной специфической функцией петли хроматина является ее влияние на соседние гены (Li et al., 2012; Golkaram et al., 2017). Подтверждение участия фактора реорганизации хроматина СТСФ в регуляции экспрессионных флуктуаций в процессе дифференцировки ЭСК мыши получено при исследовании кластера протокадгерина (*Pcdh*), ключевого компонента нейронного разнообразия (Wada et al., 2018).

Известно, что факторы плюрипотентности *Oct4* и *Nanog* значительно подавляют дифференцировку NPC, в то же время способствуя дифференцировке клеток мезендоходермы (MES). В противоположность этому, *Sox2* необходим для развития NPC, но подавляет дифференцировку MES (Jang et al., 2016). Учитывая важность этих генов для дифференцировки ЭСК, анализировали, как изменения плотности упаковки ДНК влияют на паттерны экспрессии отдельных клеток NPC или MES во время дифферен-



**Рис. 5.** Связь между изменением плотности хроматина и изменением уровня экспрессии генов плюрипотентности. *а* – Изменение плотности ДНК локусов *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* во время дифференцировки стволовых клеток. *б–г* – Дифференцировка эмбриональных стволовых клеток человека (hESC) в клетки-предшественники нервной ткани (NPC) и клетки мезендермы (MES) с последующим иммуноокрашиванием *Oct4*, *Nanog* и *Sox2*. Коэффициент вариации (CV) (*б*) и распределение интенсивности экспрессии генов (*г*), которое рассчитывали по интенсивности флуоресценции, измеренной для отдельных клеток. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, отн. ед., по оси ординат – количество клеток *n*. *в* – Иммунофлуоресцентное выявление *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* в hESC, NPC и MES (из: Golkaram et al., 2017; open access).

цировки. Не обнаружено никаких существенных изменений в плотностях хроматина вблизи локусов *Oct4* и *Nanog* во время дифференцировки MES. Напротив, плотность хроматина вблизи локусов *sox2* резко увеличивалась в NPC по сравнению с hESC (рис. 5а). Это изменение соответствовало увеличению CV (коэффициент вариации) и расширению распределения экспрессии генов во время дифференцировки NPC (рис. 5б–г).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что индуцированная процессами дифференцировки локальная конденсация хроматина контроли-

рует гетерогенную экспрессию генов плюрипотентности.

Еще один интересный пример участия эпигенетических механизмов в регуляции экспрессионного шума – динамическое метилирование ДНК во время раннего развития млекопитающих. После оплодотворения мужской и женский пронуклеусы, паттерны метилирования ДНК которых определяют идентичность сперматозоидов и яйцеклеток, должны быть деметилированы. Это эпигенетическое перепрограммирование приводит к почти полностью гипометилированному состоянию в бластоцисте и создает условия для повторного метилирования в про-

цессе дифференцировки (Smith et al., 2012). В первичных половых клетках эмбрионов мыши глобальное деметилирование ДНК происходит в две фазы. Первая фаза, начинающаяся на 7.5 сут эмбрионального развития, связана с подавлением генов *Dnmt3a/b* и блокировкой взаимодействия DNMT1 на вилке репликации (Kurimoto et al., 2008). Эти события «разбавляют» метилирование ДНК с каждым раундом клеточного деления. Вторая фаза деметилирования происходит несколько позже, между 11.5 и 13.5 сут эмбрионального развития, в *cis*-регуляторных областях, называемых ICR (Seisenberge et al., 2012). Открытие семейства ферментов Ten-Eleven Translocation (TET), которое включает в себя TET1, TET2 и TET3 (также известные как тет-метилцитозин-диоксигеназы 1–3), выявило их потенциальную значимость для «стирания» метилирования ДНК в ICR (Hill et al., 2014). Недавно было показано, что ферменты TET1–3 инициируют деметилирование ДНК, при этом у мышей с генотипом *Tet1*<sup>-/-</sup> наблюдаются aberrантные уровни экспрессии импринтируемых генов и аномальное метилирование ICR. Дефицит *Tet1* связан с гиперметилированием ICR в половых клетках. Более того, ICR с дефектным репрограммированием зародышевой линии обнаруживают aberrантное метилирование ДНК и биалельную экспрессию связанных импринтируемых генов в соматических тканях (SanMiguel et al., 2018). Как у самцов, так и у самок изменчивость уровней импринтированных генов на исследованных эмбриональных стадиях не может быть объяснена изменениями уровней мРНК *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Dnmt3l*, *Uhrf1*, *Tet2* или *Tet3*. Утверждается, что эпигенетическое перепрограммирование ICR в зародышевой линии имеет решающее значение для надлежащей регуляции стохастической экспрессии импринтированных генов у потомства (SanMiguel et al., 2018).

Исходя из всего вышеизложенного, очевидно, что эпигенетический контроль является важнейшим элементом системы контроля экспрессионного шума в процессе развития многоклеточных организмов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, мы можем констатировать, что эпигенетическая регуляция стохастической экспрессионной гетерогенности, сформировавшаяся в процессе эволюции, в том или ином виде необходима для нормальной жизнедеятельности организмов различной сложности (от вирусов до млекопитающих). Общность этого явления на различных уровнях биологической организации позволяет предположить, что мы имеем дело с фундаментальным биологическим свойством, присущим всему живому. Однако без ответа пока остается важнейший вопрос: как эпигенетические системы контроля экспрессионного шума работают в живых системах (а не на клеточном уровне).

Совершенствование аналитических инструментов в стохастическом эпигенетическом моделировании транскрипции поможет выдвинуть новые гипотезы и будет способствовать разработке новых экспериментальных инструментов, измеряющих вариации экспрессионных шумов в отдельных клетках. Вместе эти улучшения обеспечат более глубокое понимание регуляторной роли эпигенетических механизмов, благодаря которым точность и согласованность действий поддерживаются в многоклеточных организмах.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Семенова Е.В., Филатов М.В. 2013. Генетические и эпигенетические маркеры глиом. Цитология. Т. 55. № 5. С. 290. (Semenova E.V., Filatov M.V. 2013. Genetic and epigenetic markers of gliomas. Tsitologiya. V. 55. № 5. P. 290.)
- Avery S.V. 2006. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. Nat. Rev. Microbiol. V. 4. P. 577.
- Bahar H.K., Tanami S., Landen S., Chapal M., Szlak L., Hutzler A., Nizhberg A., Itzkovitz S. 2015. Bursty gene expression in the intact mammalian liver. Mol. Cell. V. 58. P. 147.
- Beisel C., Paro R. 2011. Silencing chromatin: Comparing modes and mechanisms. Nat. Rev. Genet. V. 12. P. 123. <https://doi.org/10.1038/nrg2932>
- Balazsi G., van Oudenaarden A., Collins J.J. 2011. Cellular decision-making and biological noise: From microbes to mammals. Cell. V. 144. P. 910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.030>
- Barolo S. 2012. Shadow enhancers: Frequently asked questions about distributed *cis*-regulatory information and enhancer redundancy. Bioessays. V. 34. P. 135.
- Battich N., Stoeger T., Pelkmans L. 2015. Control of transcript variability in single mammalian cells. Cell. V. 163. P. 1596.
- Beaumont H.J., Gallie J., Kost C., Ferguson G.C., Rainey P.B. 2009. Experimental evolution of bet hedging. Nature. V. 462. P. 90.
- Boehm D., Calvanese V., Dar R. D., Xing S., Schroeder S., Martins L., Aull K., Li P.C., Planelles V., Bradner J.E., Zhou M.M., Siliciano R.F., Weinberger L., Verdin E., Ott M. 2013. BET bromodomain-targeting compounds reactivate HIV from latency via a Tat-independent mechanism. Cell Cycle. V. 12. P. 452. <https://doi.org/10.4161/cc.23309>
- Boettiger A.N. 2013. Analytic approaches to stochastic gene expression in multicellular systems. Biophys J. V. 105. P. 2629. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.10.033>
- Bose I., Ghosh S. 2012. Origins of binary gene expression in post-transcriptional regulation by microRNAs. Eur. Phys. J. E. Soft Matter. V. 35. P. 102. <https://doi.org/10.1140/epje/i2012-12102-2>
- Bosia C., Pagnani A., Zecchina R. 2013. Modelling competing endogenous RNA networks. PLoS One. V. 8: e66609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066609>
- Bosia C., Sgro F., Conti L., Baldassi C., Brusa D., Cavallo F., Cunto F.D., Turco E., Pagnani A., Zecchina R. 2017. RNAs competing for microRNAs mutually influence their fluctuations in a highly non-linear microRNA-dependent manner in single cells. Gen. Biol. V. 18 : 37. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1162-x>

- Brown C.R., Boeger H.* 2014. Nucleosomal promoter variation generates gene expression noise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V. 111. P. 17893.
- Cai L., Friedman N., Xie X.S.* 2006. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature.* V. 440. P. 358.
- Canham M.A., Sharov A.A., Ko M.S., Brickman J.M.* 2010. Functional heterogeneity of embryonic stem cells revealed through translational amplification of an early endodermal transcript. *PLoS Biol.* V. 8 : e1000379. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000379>
- Capp J.P.* 2017. Tissue disruption increases stochastic gene expression thus producing tumors: Cancer initiation without driver mutation. *Int. J. Cancer.* V. 140. P. 2408. <https://doi.org/10.1002/ijc.30596>
- Chen X., Chen Z., Chen H., Su Z., Yang J., Lin F., Shi S., He X.* 2012. Nucleosomes suppress spontaneous mutations base-specifically in eukaryotes. *Science.* V. 335. P. 1235.
- Chen J., Zhang Z., Li L., Chen B.C., Revyakin A., Hajj B., Legant W., Dahan M., Lionnet T., Betzig E., Tjian R., Liu Z.* 2014. Single-molecule dynamics of enhanceosome assembly in embryonic stem cells. *Cell.* V. 156. P. 1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.062>
- Cho W.K., Jayanth N., English B.P., Inoue T., Andrews J.O., Conway W., Grimm J.B., Spille J.H., Lavis L.D., Lionnet T. Cisse I.I.* 2016. RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells. *Elife.* V. 5. pii:e13617. <https://doi.org/10.7554/eLife.13617>
- Cisse I.I., Izeddin I., Causse S.Z., Boudarene L., Senecal A., Muresan L., Dugast-Darzacq C., Hajj B., Dahan M., Darzacq X.* 2013. Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells. *Science.* V. 341. P. 664. <https://doi.org/10.1126/science.1239053>
- Craigie R., Bushman F.D.* 2012. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* V. 2: a006890. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006890>
- Dar R.D., Hosmane N.N., Arkin M.R., Siliciano R.F., Weinberger L.S.* 2014. Screening for noise in gene expression identifies drug synergies. *Science.* V. 344. P. 1392. <https://doi.org/10.1126/science.1250220>
- Dar R.D., Razooky B.S., Singh A., Trimeloni T.V., McCollum J.M., Cox C.D., Simpson M.L., Weinberger L.S.* 2012. Transcriptional burst frequency and burst size are equally modulated across the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V. 109. P. 17454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213530109>
- De Las Penas A., Pan S.J., Castano I., Alder J., Cregg R., Cormack B.P.* 2003. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev.* V. 17. P. 2245.
- Del Giudice M., Bo S., Grigolon S., Bosia C.* 2018. On the role of extrinsic noise in microRNA-mediated bimodal gene expression. *PLoS Comput Biol.* V. 14: e1006063. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006063>
- Di Pierro M., Cheng R.R., Lieberman A.E., Wolynes P.G., Onuchic J.N.* 2017. De novo prediction of human chromosome structures: Epigenetic marking patterns encode genome architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 114. P. 12126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714980114>
- Dong P., Liu Z.* 2017. Shaping development by stochasticity and dynamics in gene regulation. *Open Biol.* V. 7 : 170030. <https://doi.org/10.1098/rsob.170030>
- Dunn S.J., Martello G., Yordanov B., Emmott S., Smith A.* 2014). Defining an essential transcription factor program for naive pluripotency. *Science.* V. 344. P. 1156. <https://doi.org/10.1126/science.1248882>
- Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S.* 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science.* V. 297. P. 1183.
- Finzi D., Hermankova M., Pierson T., Carruth L.M., Buck C., Chaisson R.E., Quinn T.C., Chadwick K., Margolick J., Brookmeyer R., Gallant J., Markowitz M., Ho D.D., Richman D.D., Siliciano R.F.* 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science.* V. 278. P. 1295.
- Frankel N., Davis G., Stern D.L.* 2010. Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature.* V. 466. P. 490.
- Friedman R., Farh K.H., Burge C., Bartel D.P.* 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* V. 19. P. 92. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Gagiano M., van Dyk D., Bauer F.F., Lambrechts M.G., Pretorius I.S.* 1999. Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* V. 31. P. 103.
- Gardner T.S., Cantor C.R., Collins J.J.* 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature.* V. 403. P. 339.
- Garg S., Sharp P.* 2016. Single-cell variability guided by microRNAs. *Science.* V. 352. P. 1390. <https://doi.org/10.1126/science.aag1097>
- Golding I., Paulsson J., Zawilski S.M., Cox E.C.* 2005. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell.* V. 123. P. 1025.
- Golkaram M., Jang J., Hellander S. Kosik K.S., Petzold L.R.* 2017. The role of chromatin density in cell population heterogeneity during stem cell differentiation. *Sci. Rep.* V. 7. P. 13307. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13731-3>
- Halme A., Bumgarner S., Styles C., Fink G.R.* 2004. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell.* V. 116. P. 405.
- Hausser J., Mayo A., Keren L., Alon U.* 2019. Central dogma rates and the trade-off between precision and economy in gene expression. *Nat. Commun.* V. 10 : 68. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07391-8>
- Hernday A.D., Braaten B.A., Broitman-Maduro G., Engelberts P., Low D.A.* 2004. Regulation of the pap epigenetic switch by CpxAR: Phosphorylated CpxR inhibits transition to the phase ON state by competition with Irp. *Mol. Cell.* V. 16. P. 537.
- Hill P.W.S., Amouroux R., Hajkova P.* 2014. DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: An emerging complex story. *Genomics.* V. 104. P. 324. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.012>
- Ho L., Crabtree G.R.* 2010. Chromatin remodelling during development. *Nature.* V. 463. P. 474. <https://doi.org/10.1038/nature08911>

- Ingolia N.T., Murray A.W.* 2007. Positive-feedback loops as a flexible biological module. *Curr. Biol.* V. 17. P. 668.
- Jablonka E., Raz G.* 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: Prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* V. 84. P. 131.
- Jang J., Wang Y., Lalli M.A., Guzman E., Godshalk S.E., Zhou H., Kosik K.S.* 2016. Primary cilium-autophagy-Nrf2 (PAN) axis activation commits human embryonic stem cells to a neuroectoderm fate. *Cell.* V. 165. P. 410. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.014>
- Ji N., Middelkoop T.C., Mentink R.A., Betist M.C., Tonegawa S., Mooijman D., Korswagen H.C., van Oudenaarden A.* 2013. Feedback control of gene expression variability in the *Caenorhabditis elegans* Wnt pathway. *Cell.* V. 155. P. 869.
- Kalmar T., Lim C., Hayward P., Muñoz-Descalzo S., Nichols J., Garcia-Ojalvo J., Martinez A.A.* 2009. Regulated fluctuations in nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol.* V. 7 : e1000149. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000149>
- Kaufmann B.B., Yang Q., Mettetal J.T., van Oudenaarden A.* 2007. Heritable stochastic switching revealed by single-cell genealogy. *PLoS Biol.* V. 5 : e239. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050239>
- Kim K.H., Sauro H.M.* 2012. Adjusting phenotypes by noise control. *PLoS Comput. Biol.* V. 8 : e1002344.
- Klein A., Mazutis L., Akartuna I., Tallapragada N., Veres A., Li V., Peshkin L., Weitz D.A., Kirschner M.W.* 2015. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell.* V. 161. P. 1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.044>
- Kumar R., Cahan P., Shalek A., Satija R., Daley Keyser A., Li H., Zhang J., Pardee K., Gennert D., Trombetta J.J., Ferrante T.C., Regev A., Daley G. Q., Collins J.J.* 2014. Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells. *Nature.* V. 516. P. 56. <https://doi.org/10.1038/nature13920>
- Kurimoto K., Yabuta Y., Ohinata Y., Shigeta M., Yamanaka K., Saitou M.* 2008. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Gen. Dev.* V. 22. P. 1617. <https://doi.org/10.1101/gad.1649908>
- Lagha M., Bothma J.P., Levine M.S.* 2013. Paused Pol II coordinates tissue morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Cell.* V. 153. P. 976.
- Laurenti L., Csikasz-Nagy A., Kwiatkowska M., Cardelli L.* 2018. Molecular filters for noise reduction. *Biophys J.* V. 114. P. 3000. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.05.009>
- Levine M.* 2010. Transcriptional enhancers in animal development and evolution. *Curr. Biol.* V. 20. P. R754.
- Li M., Liu G-H., Belmonte J.C.I.* 2012. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* V. 13. P. 524. <https://doi.org/10.1038/nrm3393>
- Lin Y.T., Hufton P.G., Lee E.J., Potoyan D.A.* 2018. A stochastic and dynamical view of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *PLoS Comput. Biol.* V. 14 : e1006000. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006000>
- Liu Z., Legant W.R., Chen B.C., Li L., Grimm J.B., Lavis L.D., Betzig E., Tjian R.* 2014. 3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells. *Elife.* V. 3 : e04236.
- Lorenz M.C., Heitman J.* 1998. Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics.* V. 150. P. 1443.
- MacArthur B.D., Lemischka I.R.* 2013. Statistical mechanics of pluripotency. *Cell.* V. 154. P. 484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.024>
- Magklara A., Lomvardas S.* 2013. Stochastic gene expression in mammals: lessons from olfaction. *Trends Cell Biol.* V. 23. P. 449.
- Martello G., Smith A.* 2014. The nature of embryonic stem cells. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* V. 30. P. 647. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-0131164>
- Masui S., Nakatake Y., Toyooka Y., Shimosato D., Yagi R., Takahashi K., Okochi H., Okuda A., Matoba R., Sharov A.A., Ko M.S., Niwa H.* 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biol.* V. 9. P. 625. <https://doi.org/10.1038/ncb1589>
- Mbonye U., Karn J.* 2014. Transcriptional control of HIV latency: Cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology.* V. 454–455. P. 328.
- Megaridis M.R., Lu Y., Tevonian E.N., Junger K.M., Moy J.M., Bohn-Wippert K., Dar R.D.* 2018. Fine-tuning of noise in gene expression with nucleosome remodeling. *APL Bioeng.* V. 2 : 026106. <https://doi.org/10.1063/1.5021183>
- Meshorer E., Misteli T.* 2006. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 7. P. 540. <https://doi.org/10.1038/nrm1938>
- Mettetal J.T., Muzzey D., Pedraza J.M., Ozbudak E.M., van Oudenaarden A.* 2006. Predicting stochastic gene expression dynamics in single cells. *PNAS.* V. 103. P. 7304.
- Mitosch K., Rieckh G., Bollenbach T.* 2017. Noisy response to antibiotic stress predicts subsequent single-cell survival in an acidic environment. *Cell Syst.* V. 4. P. 393.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.03.001>
- Neves das R.P., Jones N.S., Andreu L. Gupta R., Enver T., Iborra F.J.* 2010. Connecting variability in global transcription rate to mitochondrial variability. *PLoS Biol.* V. 8 : e1000560.
- Newman J.R., Ghaemmaghami S., Ihmels J., Breslow D.K., Noble M., DeRisi J.L., Weissman J.S.* 2006. Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature.* V. 441. P. 840.
- Ng K.K. Yui M.A., Mehta A. Siu S., Irwin B., Pease S., Hirose S., Elowitz M.B., Rothenberg E.V., Kueh H.Y.* 2018. A stochastic epigenetic switch controls the dynamics of T-cell lineage commitment. *Elife.* V. 7 : e37851. <https://doi.org/10.7554/eLife.37851>
- Octavio M., Gedeon K., Maheshri N.* 2009. Epigenetic and conventional regulation is distributed among activators of *FLO11* allowing tuning of population-level heterogeneity in its expression. *PLoS Genet.* V. 5 : e1000673. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000673>
- Orkin S.H., Hochedlinger K.* 2011. Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell.* V. 145. P. 835.
- Osella M., Bosia C., Cora D., Caselle M.* 2011. The role of incoherent microRNA-mediated feedforward loops in noise buffering. *PLoS Comput. Biol.* V. 7 : e1001101. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001101>

- Pagans S., Pedal A. North B.J., Kaehlcke K., Marshall B.L., Dorr A., Hetzer-Egger C., Henklein P., Frye R., McBurney M.W., Hruby H., Jung M., Verdin E., Ott M. 2005. SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol.* V. 3 : e41.
- Pai A., Weinberger L.S. 2017. Fate-regulating circuits in viruses: From discovery to new therapy targets. *Annu. Rev. Virol.* V. 4. P. 469.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-035606>
- Pan X., Heitman J. 2002. Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell Biol.* V. 22. P. 3981.
- Panzeri I., Pospisilik J.A. 2018. Epigenetic control of variation and stochasticity in metabolic disease. *Mol. Metab.* V. 14. P. 26.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.010>
- Pelaez N., Gavalda-Mirallas A., Wang B., Navarro H.T., Gudjonson H., Rebay I., Dinner A.R., Katsaggelos A.K., Amaral L.A., Carthew R.W. 2015. Dynamics and heterogeneity of a fate determinant during transition towards cell differentiation. *Elife.* V. 4 : e08924.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.08924>
- Perry M.W., Boettiger A.N., Levine M. 2010. Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Curr. Biol.* V. 20. P. 1562.
- Rafati H., Parra M., Hakre S., Moshkin Y., Verdin E., Mahmoudi T. 2011. Repressive LTR nucleosome positioning by the BAF complex is required for HIV latency. *PLoS Biol.* V. 9 : e1001206.
- Raj A., van Oudenaarden A. 2008. Stochastic gene expression and its consequences. *Cell.* V. 135. P. 216.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.050>
- Raj A., Rifkin S.A., Andersen E., van Oudenaarden A. 2010. Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature.* V. 463. P. 913.
- Raser J.M., O'Shea E.K. 2004. Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science.* V. 304. P. 1811.
- Rupp S., Summers E., Lo H.J., Madhani H., Fink G. 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J.* V. 18. P. 1257.
- SanMiguel J.M., Abramowitz L.K., Bartolomei M.S. 2018. Imprinted gene dysregulation in a *Tet1* null mouse model is stochastic and variable in the germline and offspring. *Development.* V. 145 : dev160622.  
<https://doi.org/10.1242/dev.160622>
- Schmiedel J., Klemm S., Zheng Y., Sahay A., Bluthgen N., Marks D., van Oudenaarden A. 2015. MicroRNA control of protein expression noise. *Science.* V. 348. P. 128.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaa1738>
- Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J.R., Bushman F. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* V. 110. P. 521.
- Seisenberge, S., Andrews S., Krueger F., Arand J., Walter J., Santos F., Popp C., Thienpont B., Dean W., Reik W. 2012. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell.* V. 48. P. 849.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.001>
- Singer Z.S., Yong J., Tischler J., Hackett J.A., Altinok A., Surani M.A., Cai L., Elowitz M.B. 2014. Dynamic heterogeneity and DNA methylation in embryonic stem cells. *Mol. Cell.* V. 55. P. 319.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.029>
- Singh A., Razooky B.S., Dar R.D., Weinberger L.S. 2012. Dynamics of protein noise can distinguish between alternate sources of gene-expression variability. *Mol. Syst. Biol.* V. 8 : 607.  
<https://doi.org/10.1038/msb.2012.38>
- Smith Z.D., Chan M.M., Mikkelsen T.S., Gu H., Gnirke A., Regev A., Meissner A. 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature.* V. 484. P. 339.  
<https://doi.org/10.1038/nature10960>
- Spina C.A., Anderson J., Archin N.M., Bosque A., Chan J., Familietti M., Greene W.C., Kashuba A., Lewin S.R., Margolis D.M., Mau M., Ruelas D., Saleh S., Shirakawa K., Siliciano R.F. et al. 2013. An in-depth comparison of latent HIV-1 reactivation in multiple cell model systems and resting CD4+ T cells from aviremic patients. *PLoS Pathogens.* V. 9 : e1003834.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003834>
- Spitz F., Furlong E.E.M. 2012. Transcription factors: From enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* V. 13. P. 613.
- Stapel L.C., Zechner C., Vastenhouw N.L. 2017. Uniform gene expression in embryos is achieved by temporal averaging of transcription noise. *Gen. Dev.* V. 31. P. 1635.  
<https://doi.org/10.1101/gad.302935.117>
- van Steensel B. 2011. Chromatin: Constructing the big picture. *EMBO J.* V. 30. P. 1885.
- Stoeger T., Battich N., Pelkmans L. 2016. Passive noise filtering by cellular compartmentalization. *Cell.* V. 164. P. 1151.
- Vastenhouw N.L., Zhang Y., Woods I.G., Imam F., Regev A., Liu X.S., Rinn J., Schier A.F. 2010. Chromatin signature of embryonic pluripotency is established during genome activation. *Nature.* V. 464. P. 922.
- Verstrepen K.J., Klis F.M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* V. 60. P. 5.
- Wada T., Wallerich S., Becskei A. 2018. Stochastic gene choice during cellular differentiation. *Cell Rep.* V. 24. P. 3503.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.074>
- Wang Y., Ni T., Wang W., Liu F. 2018. Gene transcription in bursting: A unified mode for realizing accuracy and stochasticity. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*  
<https://doi.org/10.1111/brv.12452>
- Xiong W., Ferrell J.E.Jr. 2003. A positive-feedback-based bistable 'memory module' that governs a cell fate decision. *Nature.* V. 426. P. 460.
- Xu E.Y., Zawadzki K.A., Broach J.R. 2006. Single-cell observations reveal intermediate transcriptional silencing states. *Mol. Cell.* V. 23. P. 219.
- Xu H., Sepulveda L.A., Figard L., Sokac A.M., Golding I. 2015. Combining protein and mRNA quantification to decipher transcriptional regulation. *Nat. Methods.* V. 12. P. 739.
- Young R.A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell.* V. 144. P. 940.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.032>
- Zhang Y., Vastenhouw N.L., Feng J., Fu K., Wang C., Ge Y., Pauli A., van Hummelen P., Schier A.F., Liu X.S. 2014. Canonical nucleosome organization at promoters forms during genome activation. *Genome Res.* V. 24. P. 260.
- Zopf C.J., Quinn K., Zeidman J., Maheshri N. 2013. Cell-cycle dependence of transcription dominates noise in gene expression. *PLoS Comput. Biol.* V. 9 : e1003161.

## EPIGENETIC REGULATION IS PRIME ELEMENT IN THE CONTROL OVER STOCHASTIC GENE EXPRESSION

E. V. Semenova<sup>a, \*</sup>, E. Yu. Varfolomeeva<sup>a</sup>, and M. V. Filatov<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre “Kurchatov Institute”,  
Gatchina, 188300 Russia*

<sup>b</sup>*Saint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,  
St. Petersburg, 191036 Russia*

*\*e-mail: semenova\_el.spb@mail.ru*

Gene expression is the process stochastic (random) by its nature. As a result, there are significant variations in the levels of both mRNA and proteins among genetically identical cells which belong to the same population. Expression heterogeneity has been revealed across a wide range of organisms, from bacteria to mammals. Its characteristics depend on genetic, epigenetic and biophysical parameters. Random fluctuations occurring during the use of genetic material (expression noise) play an important role in many biological processes, such as phenotype switching and coordination of gene expression during cell differentiation and cell cycle. Stochasticity of the gene expression may have crucial consequences both for a particular cell and for the cell population as a whole, being helpful in some contexts and harmful in others. Hence, some mechanisms ensuring resistance to the noise and control over it should have been developed in the course of the evolution. Over recent years there have been a growing number of experimental and theoretical studies which point to epigenetic regulation as the prime element in the control over stochastic heterogeneity of gene expression. In the review, we analyze main epigenetic mechanisms involved in the expression noise control. There are also particular examples of epigenetic regulation of stochastic gene expression in different organisms chosen in accordance with the increasing biological complexity: from viruses to mammals. There is a separate chapter devoted to the functioning of the epigenetic system controlling expression variability of the genes during Metazoa development.

**Keywords:** epigenetic mechanisms, expression noise, regulation of stochastic processes, stochastic cellular heterogeneity