

УДК 577.21: 577.213: 576.32:576.36

## МЕХАНИЗМЫ ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕПЛИКАЦИИ

© 2013 г. Т. Д. Колесникова\*

*Институт молекулярной и клеточной биологии,  
Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск*

Поступила в редакцию 02.05.2012 г.

Принята к печати 13.06.2012 г.

Давно известно, что разные типы хроматина реплицируются в разное время в S-фазе, однако, лишь в последние годы наследование характера репликации начали рассматривать с позиций эпигенетики. Стало ясно, что в ходе дифференцировки программа репликации генома подвергается значительным изменениям, тесно связанным с изменениями в транскрипционной активности и организации ядра. Домены скоординированной во времени репликации представляют собой дискретные единицы хромосомной структуры и функции. И, хотя функциональное значение такой жесткой регуляции репликации известно еще не до конца, можно с уверенностью говорить, что программа репликации — еще одна эпигенетическая характеристика клеток каждого типа. В настоящем обзоре обсуждаются молекулярные механизмы пространственно-временной регуляции репликации как на уровне отдельных сайтов инициации репликации (ориджинов), так и на уровне протяженных хроматиновых доменов.

**Ключевые слова:** репликация, репликационный тайминг, инициация репликации, ориджины репликации, репликационные домены, фокусы репликации, поздняя репликация.

REGULATION OF DNA REPLICATION TIMING, by *T. D. Kolesnikova\** (Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; \*e-mail: trotsenko@mcb.nsc.ru). Although distinct chromatin types have been long known to replicate at different timepoints of S phase, fine replication control has only recently become considered as an epigenetic phenomenon. It is now clear that in course of differentiation significant changes in genome replication timing occur, and these changes are intimately linked with the changes in transcriptional activity and nuclear architecture. Temporally coordinate replication is organized spatially into discrete units having specific chromosomal organization and function. Even though the functional aspects of such tight control of replication timing remain to be explored, one can confidently consider the replication program as yet another fundamental feature characteristic of the given differentiation state. The present review touches upon the molecular mechanisms of spatial and temporal control of replication timing, involving individual replication origins as well as large chromatin domains.

**Keywords:** replication, replication timing, replication origin, replication initiation, replication domains, late replication, replication foci.

DOI: 10.7868/S0026898412060110

### ВВЕДЕНИЕ

В каждом клеточном цикле геномная ДНК должна удваиваться, чтобы обеспечить наследственным материалом дочерние клетки. Очень важно, чтобы каждая нуклеотидная последовательность копировалась при этом ровно 1 раз, поэтому процесс репликации должен жестко регулироваться.

У эукариот в каждом клеточном цикле репликация иницируется на множестве так называемых ориджинов. **Ориджин** репликации, с одной сторо-

ны, можно определить как участок генома, на котором начинается репликация. С другой стороны, ориджинами репликации часто называют участки ДНК, связывающие белки, вовлеченные в инициацию репликации.

Белки, участвующие в инициации репликации, достаточно консервативны. Однако консенсусные последовательности ДНК, маркирующие ориджины, обнаружены только у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Считается, что у многоклеточных сайты инициации репликации определяются эпигенетически, что позволяет осуществлять более гибкую регуляцию репликации

\* Эл. почта: trotsenko@mcb.nsc.ru

генома, оптимальную для разных типов клеток. Размер репликонов и расположение ориджинов в значительной степени определяется хроматиновым контекстом, регулируется в процессе онтогенеза и меняется в ходе дифференцировки клеток. Кроме того, распределение активных ориджинов изменяется в ответ на генотоксический стресс.

Время в S-фазе, когда включается каждый отдельный ориджин, — еще один важный параметр инициации репликации, находящийся под эпигенетическим контролем. Регуляция времени репликации осуществляется на уровне протяженных хроматиновых доменов. Районы генома, маркированные модификациями гистонов, характерными для активных генов, имеют, как правило, ранние ориджины, в то время как в районах с модификациями, характерными для молчащего хроматина, ориджины активируются обычно в поздней S-фазе. В то же время накапливаются данные о том, что само время репликации в S-фазе можно рассматривать как фактор, определяющий поддержание эпигенетического состояния хроматиновых доменов разного типа. Таким образом, эпигенетическое состояние хроматина и время его репликации тесно связаны между собой. В ходе дифференцировки клеток в программе репликации генома происходят значительные изменения, связанные с транскрипционной активностью генов и организацией ядра.

В настоящем обзоре обсуждаются механизмы пространственно-временной регуляции репликации. При этом мы не будем останавливаться на молекулярных механизмах действия отдельных белков, а обратим основное внимание на общие принципы регуляции репликации как на уровне отдельных ориджинов, так и на уровне протяженных хроматиновых доменов.

### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СОБЫТИЙ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИХ ИНИЦИАЦИИ РЕПЛИКАЦИИ

Инициация репликации на отдельном ориджине представляет собой сложный процесс, проходящий в несколько этапов и требующий связывания с ориджином множества белков. Несмотря на то, что консервативной последовательности, необходимой для инициации репликации ДНК, у высших эукариот не обнаружено, этапы инициации этого процесса и связанные с ним белки в большой степени консервативны [1].

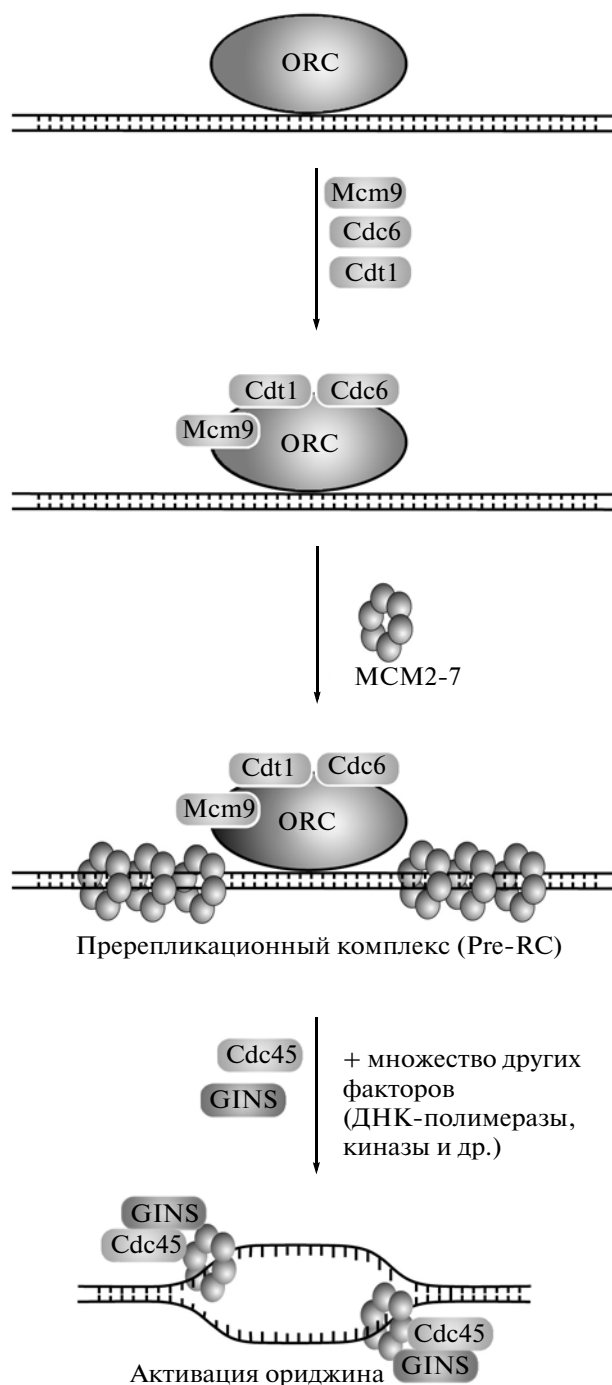
На первом этапе на ориджине происходит сборка шестисубъединичного комплекса ORC (origin recognition complex). ORC остается связанным с ориджином в течение почти всего клеточного цикла, и, следовательно, одной из его функций может быть маркирование сайтов инициации репликации. У позвоночных и *Drosophila melano-*

*gaster* синтез и связывание ORC с хромосомами регулируется в клеточном цикле. У *S. cerevisiae* ORC связан с хроматином постоянно [2].

На втором этапе ORC запускает сборку на ориджине мультибелкового комплекса, называемого пререпликационным (Pre-RC). Для формирования pre-RC необходимы, как минимум, ORC, Cdc6, Cdt1, MCM9 и гетерогексамерный комплекс MCM2-7 (рис. 1). Cdc6 взаимодействует непосредственно с ORC, эти белки вместе с Cdt1 необходимы для посадки MCM [3]. Сборка pre-RC происходит в фазе G1 [4].

На третьем этапе, непосредственно перед инициацией репликации на данном ориджине, происходит активация pre-RC. Pre-RC последовательно присоединяет дополнительные белки и превращается в преинициаторный комплекс (pre-IC). К таким белкам относятся Cdc45, RPA и ДНК-полимеразы, участвующие в репликации. Этот этап, в отличие от предыдущих, на разных ориджинах происходит не одновременно и находится под контролем регуляторных киназ. Позитивный контроль осуществляют киназы группы CDK (CDK1 и CDK2, циклин-зависимые киназы, работающие в комплексе с циклинами) и киназа Cdc7 в комплексе с регуляторной субъединицей Dbf4, а негативный контроль — киназы, участвующие в клеточном ответе на повреждение ДНК (intra-S-phase checkpoint) [3]. Считается, что гетерогексамерный комплекс MCM2-7 вместе с Cdc45 и комплексом GINS — это основная геликаза в процессе репликации [5]. Связывание Cdc45 и GINS приводит к активации геликазы. Cdc45 необходим как для инициации репликации, так и для дальнейшего движения репликационной вилки. Предполагается, что Cdc45 привлекает CDK2, что приводит к фосфорилированию гистона H1 и деконденсации хроматина. Это делает возможным инициацию и облегчает продвижение репликационной вилки [6].

Лицензирование ориджинов репликации. Cdc6, Cdt1, MCM9, и MCM2-7 относятся к так называемым лицензионным факторам репликации, а механизм, обеспечивающий однократную активацию ориджинов в каждом клеточном цикле, называется лицензированием. Этот механизм основан на том, что сборка pre-RC возможна только на определенном этапе клеточного цикла — на этапе отсутствия или низкой концентрации циклин-зависимых киназ, который соответствует фазе G1, т.е. непосредственно предшествует репликации. Перед началом S-фазы активируются циклин-зависимые киназы, что делает возможной инициацию репликации. После инициации репликации данный ориджин переходит в нелицензированное состояние, а CDK-зависимое фосфорилирование лицензионных факторов предотвращает новое лицензирование. В результате такого фос-



**Рис. 1.** Последовательность событий при формировании пререпликационного комплекса и активации ориджина репликации у млекопитающих (по [1] с изменениями).

форилирования подавляется хроматин-связывающая активность лицензионных факторов, начинается их протеолиз или транспортировка из ядра в цитоплазму. Кроме того, в клетках метазоа от начала S-фазы до конца митоза присутствует белок Geminin, который связывается с Cdt1 и тем самым предотвращает лицензирование. Когда репликация ДНК и сегрегация хромосом успешно

завершены, CDK инактивируются и Geminin деградирует [7].

### ПЛАСТИЧНОСТЬ ИНИЦИИИ РЕПЛИКАЦИИ

Доля клеточных циклов, в которой данный ориджин активируется, называется *эффективностью* ориджина. Каждый ориджин имеет определенную эффективность и время активации: оба эти параметра программируются в каждом клеточном цикле и, в то же время, являются стабильной характеристикой ориджина, наследуемой эпигенетически. Время активации ориджина и его эффективность напрямую не связаны — одни поздние ориджины эффективны, другие — нет. Некоторые неэффективны из-за соседства с более ранними ориджинами, другие неэффективны сами по себе. Эффективность ориджинов у дрожжей варьирует в широких пределах и может достигать 90% [8, 9]. У метазоа эффективность ориджинов значительно ниже. Среди достаточно хорошо охарактеризованных ориджинов она колеблется в пределах 5–20% [10, 11]. Подобная низкая эффективность означает, что в каждом конкретном районе события инициации репликации носят вероятностный характер, а их распределение может отличаться в клетках одного типа и в последующих клеточных циклах одной клетки.

Ориджины репликации организованы, как правило, в кластеры, образующие так называемые *зоны инициации репликации* [1, 12]. В каждой зоне присутствует множество ориджинов, но поскольку эффективность каждого из них очень низкая, локализация отдельных событий инициации будет различаться в разных клетках. Когда в пределах кластера активируется первый ориджин, соседние инактивируются вследствие “интерференции” [10].

У эукариот выделяют также “спящие” (dormant) ориджины, которые в нормальном клеточном цикле никогда не иницируют репликацию, но активируются только в определенных условиях, в частности, в ответ на репликационный стресс [1].

Локализация ориджинов репликации, их эффективность и последовательность активации подвержены эпигенетической регуляции и в большой степени определяют пространственно-временные закономерности репликации генома. На самых ранних этапах эмбрионального развития репликация осуществляется на ориджинах, распределенных относительно случайно и активирующихся достаточно синхронно. Переход от случайной к сайт-специфической инициации репликации происходит одновременно с началом зиготической транскрипции [13].

### КЛАСТЕРЫ СОВМЕСТНО РЕГУЛИРУЕМЫХ РЕПЛИКОНОВ

**Фокусы репликации.** Репликация групп репликонов осуществляется в составе “фабрик”, которые выявляются как точечные пятна (так называемые “фокусы”) при импульсном включении в ДНК предшественников нуклеотидов (например, BrdU) или при иммуноокрашивании на белки репликации. Расположение в ядре и размер фокусов репликации формируют специфический паттерн на разных этапах S-фазы. В ходе S-фазы количество активных фокусов, соответствующих эухроматиновым районам, в нуклеоплазме постепенно падает до нуля, а количество активных фокусов, ассоциированных с гетерохроматиновыми районами, в нуклеоплазме, вокруг ядрышек и около ядерной мембраны возрастает. Количество фокусов, наблюдаемых в средней и поздней S-фазах, значительно меньше, чем в ранней S-фазе, при том, что средний размер этих фокусов больше. Вероятно, эти дискретные репликационные домены соответствуют так называемым “репликационным дискам” метафазных хромосом млекопитающих, совпадающим с Гимза-положительными (G, реплицируются поздно) и Гимза-отрицательными (R, реплицируются рано) дисками метафазных хромосом [14, 15].

Фокусы репликации считаются универсальным свойством репликации ДНК эукариот и характерным признаком архитектуры их ядра [16, 17]. Фокусы репликации отражают скоординированную активацию репликации ДНК на соседних ориджинах. Считается, что фокусы репликации — это дискретные сайты интерфазных ядер, в которых собираются ферменты репликации ДНК для одновременной элонгации репликационных вилок на соседних репликациях. Размеры фокусов варьируют в широких пределах. Принято считать, что в среднем один фокус соответствует около 1000 т.п.н. [16], однако анализ реплицирующихся ядер при помощи нового поколения микроскопов высокого разрешения 3D-SIM (super-resolution 3D-structured illumination microscopy) показывает, что структуры, которые ранее считались индивидуальными фокусами, имеют более сложную пространственную организацию и, вероятно, состоят из нескольких более мелких фокусов [18]. Таким образом, вопрос о точном соответствии фокусов репликации, цитологически видимых в целых ядрах, кластерам синхронно активирующихся ориджинов, выявляемых на распластанных нитях ДНК, и репликационным доменам в геноме остается открытым.

Фокусы репликации — это стабильные структуры, хромосомная локализация которых сохраняется в течение клеточного цикла и в клеточных поколениях. Полагают, что они представляют со-

бой фундаментальные единицы хромосомной организации [17, 19].

Пространственная организация ориджинов в репликационные фабрики позволяет координировать не только события инициации на соседних ориджинах, но и весь дальнейший процесс репликации в локусе. Показано, что скорость движения репликационных вилок, инициированных от одного ориджина в разных направлениях, а также скорость движения вилок, инициированных ориджинами из одного кластера, регулируются координировано [20]. Остановка или торможение вилки приводит к активации дополнительных ориджинов в пределах кластера. Получается, что в пределах репликационной фабрики соседние репликоны “владеют информацией” о расстоянии до соседних ориджинов и о скорости репликации на них.

**Последовательная инициация репликации в соседних фокусах.** В каждом новом фокусе сборка на ДНК всей репликационной машинерии для инициации репликации происходит *de novo*. В то же время обнаружена интересная тенденция — окончание репликации в одном фокусе стимулирует инициацию в расположенном рядом [17, 21]. Так, в клетках HeLa после того, как начался процесс синтеза ДНК (активировались первые наиболее ранние ориджины репликации), лишь 10% событий инициации репликации *de novo* происходят в сайтах, не соседствующих с тем сайтом, где только что закончилась репликация. Этот регуляторный механизм действует на уровне репликационных фабрик [22].

Предполагается, что именно приближение вилки репликации к кластеру пространственно-сближенных ориджинов может запускать их активацию. Так, изучение репликации в локусе генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (IgH) в лимфоцитах мыши показало, что единственная вилка репликации отвечает за репликацию около 400 т.п.н. [23]. Эта вилка берет начало в кластере ранних ориджинов и доходит до кластера поздних ориджинов. Можно предположить, что именно входящая репликационная вилка активирует репликацию в кластере поздних ориджинов. У дрожжей *S. cerevisiae* ориджины не организованы в кластеры. Тем не менее, изучение последовательности инициации репликации на всех (девяти) ориджинах хромосомы VI у *S. cerevisiae* показало, что на каждом ориджине (за исключением самого первого) инициация происходит только после того, как к нему приблизится вилка репликации, инициированная более ранним ориджином [24].

Таким образом, регуляция репликации у высших эукариот происходит на нескольких уровнях. Во-первых, она может осуществляться на уровне отдельных ориджинов. Во-вторых, на уровне фо-

кусов репликации, организованных по принципу группировки нескольких петлевых доменов-репликонов, заякоренных на ядерном матриксе. И, наконец, существует временная регуляция репликации генома, оперирующая на уровне протяженных хроматиновых доменов и различных компартментов ядра.

### ЧЕМ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОРИДЖИНОВ?

Поскольку у высших эукариот отсутствуют консенсусные последовательности инициации репликации, картирование ориджинов представляет определенные трудности. Поэтому до недавнего времени изучение инициации репликации ограничивалось в значительной степени отдельными “модельными” ориджинами, связанными с определенными локусами [25, 26]. В последние годы появляется все больше публикаций, посвященных картированию ориджинов репликации на геномном уровне, в частности, на отдельных хромосомах в культурах клеток мыши и человека [12, 27–29]. Картированы ориджины по всему геному в различных культурах клеток и тканях дрозофилы [30, 31], в клетках мыши [32]. Опубликованы результаты полногеномного картирования ориджинов репликации у растения *Arabidopsis thaliana* [33]. Сравнение локализации ориджинов репликации в клетках разного типа у одного организма показало, что как у дрозофилы, так и у млекопитающих, распределение ориджинов тканеспецифично [12, 34].

**К вопросу об определении понятия “ориджин”.** В самом начале мы назвали ориджином репликации участок генома, на котором происходит инициация репликации (синтез лидирующей цепи ДНК). Однако, что конкретно понимается под ориджинами, когда речь идет об их картировании или о количестве ориджинов? Вопрос упирается в методику поиска ориджина.

Мы не будем сейчас подробно останавливаться на деталях различных методик картирования ориджинов репликации, однако рекомендуем читателю замечательный обзор Дэвида Гилберта [35]. Важно отметить, что практически все методы картирования на геномном уровне основаны на усреднении результатов, полученных при анализе множества клеток [1, 35, 36].

Картирование коротких вновь синтезированных лидирующих цепей ДНК позволяет определить участки генома, на которых хотя бы в части клеток произошла инициация репликации. Но мы знаем, что большинство ориджинов высших эукариот характеризуются низкой эффективностью, поэтому число ориджинов, полученных в таком анализе, будет значительно отличаться от

числа ориджинов, активирующихся в каждом конкретном клеточном цикле.

Если мы пытаемся искать ориджины по характерному набору связанных с ними белков, то мы картируем лишь потенциальные ориджины, но ничего не знаем, реально ли они иницируют репликацию. Во-первых, лишь небольшая фракция собранных *preRC* активируется в каждом клеточном цикле. Во-вторых, некоторые компоненты пререпликационных комплексов (например, MCM2-7) присутствуют в хроматине в большом избытке, а другие (например, ORC) могут иметь дополнительные функции, не связанные с инициацией репликации.

Многие подходы включают этап синхронизации клеток, например при помощи гидроксимочевины (HU). Однако любые манипуляции с клеточным циклом и активацией каскада ATR/CHK1 (см. ниже) могут значительно влиять на паттерн активных ориджинов. Например, воздействие HU приводит к запуску спящих ориджинов.

Таким образом, говоря об ориджине, необходимо каждый раз выбирать некий критерий, по которому он будет определен. Например, это может быть район генома, с которым связывается комплекс ORC.

**ORC связывается с участками ДНК, свободными от нуклеосом.** В целом, у метазоа *in vitro* ORC проявляет специфичности к нуклеотидной последовательности, но при этом обладает повышенным сродством к суперскрученной ДНК [37, 38]. На этом основании предположили, что изменение топологии ДНК, например вследствие удаления нуклеосом, может определять место потенциального ориджина. Пионерские эксперименты, выполненные на *S. cerevisiae*, показали, что присутствие нуклеосомы в положении ориджина ингибирует инициацию репликации на нем [39]. Деацетилаза гистонов Sir2 *S. cerevisiae* ингибирует активность ориджинов, стабилизируя положение нуклеосом, которые в ее отсутствие менее прочно связаны с ДНК [40]. Результаты картирования ORC на геномном уровне в клетках *S. cerevisiae* и *D. melanogaster* показали, что этот комплекс взаимодействует с участками ДНК, свободными от нуклеосом или же содержащими нуклеосомы, которые можно легко удалить [34, 41–45]. Показано, что в распределении ориджинов репликации важную роль играют комплексы АТР-зависимого ремоделирования хроматина [34, 46]. Эти комплексы участвуют в изменении положения нуклеосом относительно ДНК, замене гистонов нуклеосом на их варианты и в удалении нуклеосом с ДНК. Все эти результаты указывают на то, что организация ДНК в нуклеосомы может быть определяющим свойством ориджинов у всех эукариотических организмов.

Однако и сам комплекс ORC способен влиять на расположение нуклеосом [47, 48]. Формирование pre-RC требует посадки еще целого комплекса белков, часть из которых тоже должна связываться с ДНК. Судя по всему, ORC привлекает на место своей посадки новые хроматин-ремоделирующие комплексы, что приводит к формированию более открытой укладки нуклеосом и позволяет связаться с ДНК остальным компонентам pre-RC.

**Ориджины репликации часто локализируются в промоторных областях генов.** Эукариотические гены имеют характерную нуклеосомную организацию: как правило, в промоторах есть свободный от нуклеосом участок, расположенный на фиксированном расстоянии от сайта инициации транскрипции (transcription start site, TSS). Первая нуклеосома, перекрывающая тело гена, соответственно, тоже находится на фиксированном расстоянии от TSS. Далее нуклеосомы располагаются упорядоченно, с определенным интервалом между ними [49]. Поскольку промоторы всегда содержат участок, свободный от нуклеосом, именно они часто выступают в роли ориджинов репликации у эукариот.

У *S. cerevisiae* ориджины содержат сайты посадки фактора транскрипции Abf1, который может участвовать в активации ориджина [50]. У *Schizosaccharomyces pombe*, а также у высших эукариот ориджины репликации часто расположены в промоторах генов [27, 28, 30, 34, 51]. Известно множество примеров, когда факторы транскрипции влияют на локализацию или активацию ориджинов [46]. Это может достигаться привлечением машины ремоделирования хроматина, комплексов, вносящих ковалентные модификации гистонов, или в результате прямого взаимодействия факторов транскрипции с компонентами pre-RC. Однако важнее всего, вероятно, то, что в транскрипционно активных промоторах гистоны H3 и H4 гиперацетилированы и, как следствие, поддерживается открытая структура хроматина, которая считается предпочтительной для инициации репликации.

Наиболее полные данные о значении хроматинового ландшафта для локализации ORC получены в рамках проекта modENCODE (model organism encyclopedia of DNA elements) [34, 42] для *D. melanogaster*. Целью этого проекта был поиск всевозможных функциональных участков ДНК в геноме модельных организмов – *D. melanogaster* и *Caenorhabditis elegans*. У дрозофилы, как и у всех изученных эукариот, многие ориджины совпадают с сайтами инициации транскрипции или лежат в непосредственной близости от них. Чтобы понять, какие из элементов, окружающих ориджин, необходимы для связывания ORC, а какие обусловлены локализацией ориджинов в TSS,

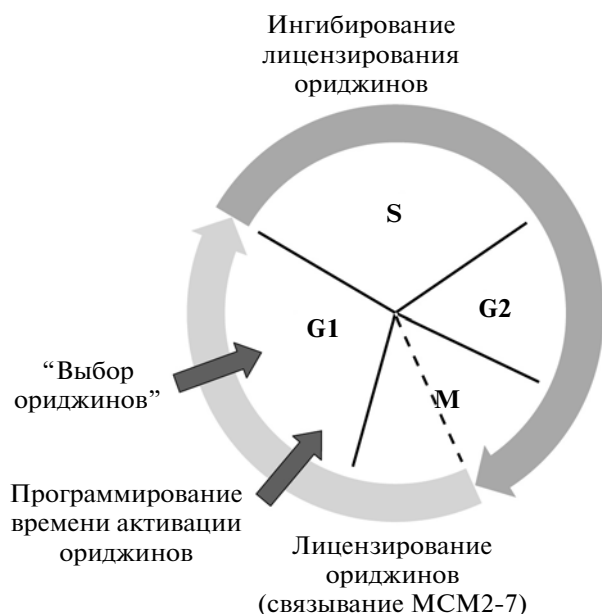
проанализировали различия между сайтами связывания ORC, лежащими в пределах 1 т.п.н. от TSS, и сайтами, удаленными от TSS на большие расстояния [34].

Оказалось, что все сайты связывания ORC, независимо от локализации ближайшего TSS, обогащены хроматин-ремоделирующими белками, например, компонентами комплекса NURF (NURF301, ISWI). В полном соответствии с представлением о связывании ORC с динамичным активным хроматином показано, что во всех сайтах связывания ORC происходит быстрый обмен нуклеосом и гистона H3.3. Многие модификации гистонов одинаково характерны как для сайтов связывания ORC, которые попадают в область промоторов, так и для удаленных от промоторов. Однако наблюдались и некоторые различия. Так, сайты связывания ORC, лежащие вблизи TSS, обогащены такими типичными для промоторов модификациями гистонов, как H3K9ac, H3K27ac, H3K4me2 и H3K4me3. В удаленных же ORC-сайтах находилось меньше H3K4me3, но больше H3K18ac и H3K4me1. Кроме того, районы ориджинов не обогащены метками хроматина, характерными для тела генов (например, H3K79me1, H3K36me1, и H3K36me3), при том что ORC-сайты, удаленные от TSS, специфически обогащены H3K36me1.

Чтобы понять, какие свойства промоторов особенно важны для функционирования в качестве ориджинов, нужно понять, чем различаются промоторы, связывающие и не связывающие комплекс ORC. Оказалось, что промоторы, являющиеся ориджинами, в среднем связаны с большим количеством хроматин-ремоделирующих белков, и обмен нуклеосом происходит в этих участках с большей скоростью. Все это еще раз подтверждает, что для связывания ORC важнее всего способность хроматина легко освобождаться от нуклеосом [34].

## ЭТАПЫ ПРОГРАММИРОВАНИЯ ОРИДЖИНОВ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ

Согласно модели лицензирования ориджинов, чтобы избежать ре-репликации генома, сборка pre-RC и его активация должны происходить на разных этапах клеточного цикла, при этом сборка не может происходить в S-фазе. Поэтому все ориджины, будь то ранние или поздние, должны быть “заряжены” до начала S-фазы. Связывание ORC с ДНК начинается еще в конце митоза и продолжается в начале фазы G1. В G1 происходит постепенная сборка pre-RC. Количество полностью собранных к началу S-фазы pre-RC значительно превышает число событий инициации репликации в одном клеточном цикле [52]. Оказывается, к началу S-фазы клетка уже “знает”, какие ориджины будут активироваться (если не наступит



**Рис. 2.** Становление программы репликации в клеточном цикле. Внутренний круг маркирует фазы клеточного цикла. На внешнем круге светлой и темной стрелками показаны периоды клеточного цикла, когда лицензирование репликации возможно, и когда оно ингибировано соответственно. Отмечены этапы клеточного цикла, во время которых происходит становление временной программы репликации и выбор ориджинов, которые будут активироваться во время ближайшей S-фазы.

репликационный стресс) и на каком этапе S-фазы должен активироваться каждый из них (рис. 2).

Согласно результатам элегантных экспериментов, выполненных на изолированных ядрах млекопитающих, реплицирующихся в экстракте яиц ксенопуса, во время фазы G1 можно выделить так называемый момент выбора ориджинов (origin decision point) — временной интервал, определяющий отбор тех ориджинов, которые будут активироваться в ближайшей S-фазе, среди всех ориджинов с уже собранными pre-RC [53]. По времени этот интервал совпадает с завершением процессов постмитотической реорганизации ядра и фиксацией ядерной архитектуры до следующего митоза. Еще один важный этап, необходимый для установки паттерна активных ориджинов в ближайшей S-фазе — митоз. Именно с митозом связана глобальная реорганизация ядра, которая завершается в начале G1.

Важность прохождения через митоз для организации репликации ярко иллюстрируют опыты по репрограммированию дифференцированных ядер млекопитающих в эмбриональные стволовые клетки после их инкубации в экстрактах яиц ксенопуса, специально подготовленных для останковки клеточного цикла на стадии митоза (“митотически компетентный экстракт”) [54]. Дело в

том, что для полного репрограммирования клетки должны перейти к быстрым эмбриональным делениям с использованием значительно большего числа активных ориджинов. Вероятно, дополнительное выдерживание ядер в клеточных экстрактах, соответствующих стадии митоза, позволяет ядрам лучше справиться с такой задачей. Кроме того, сам по себе перенос мышинных соматических ядер в зиготы именно на стадии митоза повышает эффективность репрограммирования [55–57].

Относительно независимо от выбора ориджинов программируется время активации ориджинов (timing decision point). Оно происходит на более раннем этапе клеточного цикла и уже не на уровне отдельных ориджинов, а на уровне более протяженных доменов [4, 53, 58–60] (рис. 2). Интересно, что “запрограммированное состояние” сохраняется лишь до тех пор, пока в районе не прошла репликация. В фазе G2 клеточного цикла районы хромосом не несут маркеров “репликационного тайминга”, они восстанавливаются вновь в ранней G1-фазе после необходимого прохождения через митоз [61].

Рассуждая в рамках модели фокусов репликации, можно сказать, что “выбор ориджинов” подразумевает определение того, какие ориджины будут активироваться в составе одного фокуса в данном клеточном цикле. А программирование “репликационного тайминга” будет определять в каком порядке и на каких этапах клеточного цикла активировать кластеры ориджинов, внутри которых инициация репликации происходит синхронно.

## ЧЕМ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОРИДЖИНОВ

Какие различия на молекулярном уровне могут приводить к различной способности ориджинов активировать репликацию? Почему некоторые активируют репликацию очень редко, другие — тканеспецифично, третьи — только в ответ на репликационный стресс? Далее мы поговорим о молекулярных механизмах, отвечающих за эти различия.

**Зависимость эффективности ориджинов от времени связывания ORC.** В некоторых случаях эффективность ориджинов зависит от сродства соответствующих хромосомных сегментов к комплексам ORC. Связывание ORC зависит от локальных условий хроматина и транскрипционной активности, поэтому неудивительно, что оно может иметь особенности в разных тканях. Показано, что у *S. pombe* эффективность ориджинов зависит от того, когда в клеточном цикле ORC связывается с хроматином. ORC-комплексы, собравшиеся в хроматине рано, в фазе M, имеют

тенденцию быть более эффективными, чем те, что собрались позднее, в G1 [62]. Связывание ORC с хроматином у *S. pombe* периодически, оно возрастает в ходе митоза и достигает максимума во время перехода M/G1. Формирование pre-RC тоже периодически в клеточном цикле, оно начинается и достигает максимума в G1. Задержка клеток на стадии митоза приводит к частичной потере специфичности связывания ORC1, в результате чего ориджины становятся более однородными по своим свойствам. При этом избыток компонентов pre-RC усиливает репликацию как на ранее эффективных, так и на неэффективных ориджинах [62].

**Зависимость от различной загрузки MCM2-7.** Еще один фактор, способный влиять на вероятность активации ориджина – количество комплексов MCM2-7, загруженных на данный ориджин. Показано, что к началу S-фазы комплексы MCM2-7 присутствуют в хроматине в большом избытке по сравнению с числом событий инициации репликации, числом комплексов ORC, а также по сравнению с их количеством, минимально необходимым для репликации генома в нормальных условиях [1]. Роль такого избытка двояка.

Во-первых, избыток MCM2-7 на каждом отдельном ориджине может повышать его эффективность. Как только активируется геликазная активность одного из комплексов MCM2-7, связанных с данным ORC, и начинается плавление ДНК, срабатывает механизм интерференции ориджинов и активация репликации на соседних MCM2-7 ингибируется [63].

Во-вторых, как показано на клетках млекопитающих, сайты посадки избыточного MCM, не связанного с ORC, соответствуют спящим ориджинам, которые активируются только в условиях репликационного стресса [63, 64]. Считается, что часть MCM2-7 после загрузки в хроматин в местах локализации комплексов ORC может двигаться вдоль хроматиновой фибриллы на достаточно большие расстояния, и этот избыток комплексов MCM2-7 обладает способностью активировать инициацию репликации в условиях стресса [13]. Полногеномный анализ распределения ориджинов в клеточных культурах *D. melanogaster* показал, что только 82% ориджинов, выявляемых в клетках после их обработки гидроксимочевинной, соответствуют сайтам связывания ORC [34].

**Лимитирующие факторы, определяющие число одновременно активных репликонов.** Роль количества компонентов, необходимых для инициации репликации, и их стехиометрического соотношения можно показать на примере инициации репликации в соматических и эмбриональных клетках млекопитающих.

Считается, что высокая плотность ориджинов и их высокая эффективность в эмбриональном хроматине в значительной степени связаны с избытком всех компонентов pre-RC, а также Cdc45 на данном этапе развития. Соматические клетки млекопитающих содержат в среднем один гексамер ORC, две молекулы Cdc6 и четыре–пять гексамеров MCM на каждые 100 т.п.н., что примерно в 10 раз меньше, чем в эмбриональных клетках. Кроме того, и, по-видимому, важнее всего то, что в соматических клетках pre-RC вынуждены конкурировать за лимитирующий фактор – Cdc45 [13]. Cdc45, присутствующий в клетках, обеспечивает активацию лишь определенной доли ориджинов, поэтому для активации новых репликонов приходится ждать, когда Cdc45 освободится. Поскольку Cdc45 принимает участие не только в инициации, но и в элонгации репликации, входя в состав геликазного комплекса, для его высвобождения требуется время, поэтому концентрация Cdc45 существенно влияет и на временные особенности S-фазы. Микроинъекция в клеточные ядра в S-фазе избытка очищенного Cdc45 активирует дополнительные ориджины, еще раз подтверждая, что в клетках млекопитающих Cdc45 является фактором, определяющим количество репликонов, которые могут использовать клеткой одновременно [13].

В активации ориджинов участвует множество факторов. Кроме Cdc45, роль которого в качестве лимитирующего фактора показана в клетках млекопитающих и *S. pombe* [62, 65], на роль лимитирующих факторов претендуют также киназы клеточного цикла Cdc7 в комплексе с Dbf4 (DDK) (*S. pombe*), CDK1, CDK2 (позвоночные) [66, 67] и Cdc28/Clb5 (*S. cerevisiae*) [68].

**Важную роль в активации ориджинов играет прикрепление ДНК к ядерному матриксу.** Обработка ядер солями в высоких концентрациях приводит к удалению значительной части белков хроматина. Оставшиеся ядерные структуры состоят из петлевых доменов, заякоренных на ядерном матриксе, которые можно видеть в микроскоп и оценивать их размеры. Существует тесная связь между такими петлями, репликонами и ориджинами репликации ДНК. Так, например, показано, что у многих видов животных и растений размер петель хроматина совпадает с размерами репликонов [46, 69]. При инкубации дифференцированных ядер в экстракте яиц *Xenopus*, соответствующем стадии митоза, наблюдаются глобальные изменения архитектуры хромосом. В частности, когда в такой экстракт поместили ядра эритроцитов, средний размер петель ДНК изменился от 97 до 15 т.п.н., что коррелировало с размерами репликонов [46].

Сходная корреляция между размером репликонов и размером петель наблюдалась в клетках



млекопитающих [70]. Оказалось, что распределение активных ориджинов в клетках китайского хомячка зависит не только от скорости движения репликационных вилок, но и от организации петель хроматина. При определении скорости движения репликационных вилок в присутствии различных химических агентов выявили существенную корреляцию между скоростью репликации в данной S-фазе и размером петель хроматина в последующей фазе G1. Показано, что в S-фазе активировались преимущественно те ориджины, которые соответствовали местам закрепления петель в G1. Эти данные указывают на существование механизма программирования ориджинов, в котором скорость репликации определяет распределение петель хроматина, а оно, в свою очередь, контролирует выбор ориджинов в последующем цикле [70].

При амплификации повторенного локуса *DHFR* (локус дигидрофолатредуктазы) в культуре клеток китайского хомячка CHO400 в каждом клеточном цикле активируется лишь 15% ориджинов, остальные повторенные единицы реплицируются пассивно вилками, пришедшими с активных ориджинов фланкирующих повторов [71]. Показано, что изменения чувствительности к нуклеазе микрококков (которые отражают изменения структуры хроматина) во время G1/S-перехода наблюдаются только в повторенных единицах, связанных с ядерным матриксом [72].

В клетках млекопитающих концентрация субъединиц ORC2–5 остается постоянной в клеточном цикле, а уровень субъединицы ORC1 осциллирует. Этот феномен называется “ORC cycle” [2]. Уровень ORC1 начинает возрастать в середине фазы G1, достигает максимума во время G1/S-перехода, когда он обнаруживается в ядерном матриксе, и снижается до базального уровня в S-фазе. Одновременно с увеличением концентрации ORC1 в ядре появляется фракция ORC2–5, связанного с ядерным матриксом [73]. Таким образом, ORC1 в клетках млекопитающих регулирует статус комплекса ORC, привлекая его к ядерному матриксу [74].

Каким образом прикрепление к матриксу регулирует инициацию репликации? У *Xenopus* распределение ориджинов репликации и ремоделирование размера петель зависят от ДНК-топоизомеразы II [57], фермента, ассоциированного с матриксом [75]. Репрограммирование распределения ориджинов репликации коррелирует с привлечением в хроматин ORC, что также зависит от топоизомеразы II [57]. Причинно-следственные связи ясны здесь не до конца, однако можно предположить, что петлевая организация хроматина важна как для локализации ORC, так и для регуляции эффективности ориджинов на этапах активации. И, наоборот, связывание ORC может

определять формирование петель, закрепляя ориджины на матриксе. Присоединение к матриксу помогает объединять несколько ориджинов репликации вместе, организуя репликационные фабрики, что облегчает их скоординированную регуляцию [76].

**Особенности хроматина, влияющие на эффективность ориджинов.** Активация ориджинов зависит от ацетилирования гистоновых “хвостов”. В клетках *S. cerevisiae* с мутацией в гене *Sir2*, кодирующем деацетилазу гистонов, все ориджины в районе повторов рДНК включаются почти в каждом клеточном цикле, в то время как в норме инициация происходит лишь на 20% ориджинов [77]. Именно различия в локальном ацетилировании гистонов в  $\beta$ -глобиновом локусе млекопитающих отвечают за активность ориджина репликации в клетках эритроидного ряда и ее отсутствие – в неэритроидных клетках [78]. И у млекопитающих, и у *D. melanogaster* белки pre-RC связаны с гистон-ацетилтрансферазами [79].

Направленное связывание гистон-ацетилтрансферазы Chameau с хорионовым ориджином дрозофилы, встроенным в искусственную конструкцию, локально стимулировало активность ориджина, тогда как связывание с деацетилазой гистонов Rpd3 или Pc ингибировало ее (Pc – субъединица мультибелковых комплексов, участвующих в поддержании определенного класса хроматиновых доменов с репрессированной транскрипцией). Следовательно, направленное привлечение ацетилаз и деацетилаз в район ориджина может программировать характер его активности в развитии и клеточном цикле. Одним из претендентов на роль направляющего агента считается белок Rb. Известно, что деацетилазы гистонов млекопитающих, подобные Rpd3, связываются с Rb и обеспечивают репрессию транскрипции. У *D. melanogaster* dE2F1 и Rbf (гомолог Rb у *D. melanogaster*) работают в комплексе при репрессии транскрипции и способны взаимодействовать с DmORC. В клетках млекопитающих E2F и Rb связываются с фокусами репликации и ориджинами [79].

Интересно, что гомолог Chameau у млекопитающих – гистон-ацетилтрансфераза HBO1, также связывается с ориджинами репликации и считается важным регулятором их лицензирования. Согласно последним данным, HBO1 взаимодействует с Cdt1 и регулирует посадку комплекса MCM2–7. В фибробластах человека концентрация HBO1 практически эквивалентна числу активных ориджинов, что указывает на важную роль этого фермента в регуляции инициации репликации [80, 81].

В то же время, ацетилирование не является универсальным свойством ориджинов репликации. Вероятно, оно используется для выбора не-

которых ориджинов, однако гораздо теснее связано с регуляцией времени инициации, чем с эффективностью ориджинов [52].

В тех случаях, когда инициация происходит в доменах закрытого хроматина с низким уровнем гистонацетилаз, используются, возможно, альтернативные механизмы привлечения компонентов pre-RC в хроматин. У *S. pombe* в активации ориджинов репликации в гетерохроматиновых районах принимает участие гомолог HP1 – белок SWI6, который направленно привлекает в эти районы комплекс DDK/Cdc7 [82]. У *D. melanogaster* выявлено взаимодействие между ORC и HP1 [83]. Предполагается, что функция ORC в процессе становления гетерохроматиновых доменов не зависит от репликации, однако, можно думать, что взаимодействие ORC и HP1 способствует, по-видимому, формированию pre-RC-комплексов в гетерохроматиновых районах.

### ИНИЦИАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ И РЕГУЛЯТОРЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА. “РАННИЕ” И “ПОЗДНИЕ” ОРИДЖИНЫ

**Ранние и поздние ориджины по-разному реагируют на “intra-S-phase checkpoint”.** В течение всей S-фазы клеточного цикла включаются все новые ориджины. Тем не менее, принято говорить о “ранних” и “поздних” ориджинах. Дело в том, что все ориджины можно разделить на два класса в зависимости от того, каким образом на инициацию репликации на данном ориджине влияет система контроля повреждений ДНК в S-фазе – так называемый “intra-S-phase checkpoint” [84, 85].

Для искусственной инициации остановки клеточного цикла в S-фазе на клетки воздействуют HU. Считается, что HU блокирует фермент рибонуклеотидредуктазу, что приводит к исчерпанию пула нуклеотидов в клетке и, как следствие, к замедлению или полной остановке движения вилок репликации ДНК [86]. В ответ на воздействие HU более ранние ориджины репликации – именно они и называются “ранние ориджины” – сохраняют способность иницировать репликацию. На “поздних ориджинах” инициация репликации блокируется.

Интересно, что при этом активируется множество “спящих” ориджинов, не активирующихся в нормальных условиях. Активация контрольной точки в S-фазе обеспечивает также стабилизацию остановленных вилок репликации, в результате чего в таких вилках сохраняется полимеразный комплекс. Без такой стабилизации с большой вероятностью происходит коллапс вилки, сопровождающийся двухцепочечными разрывами ДНК [87]. В случае значительных повреждений клетка вступает в апоптоз.

У эукариот система ответа на повреждение ДНК консервативна. Блокирование инициации репликации на поздних ориджинах в присутствии HU наблюдали у *S. cerevisiae* [84], млекопитающих [88], в экстракте ооцитов *Xenopus* [89] и у *D. melanogaster* [90]. Так, например, геномное исследование *S. cerevisiae* показало, что из 260 ориджинов репликации 143 (ранние) включались в присутствии HU, в то время как 104 ориджина в тех же условиях не включались [91]. У *D. melanogaster* 30% ориджинов способны к инициации репликации в присутствии HU [30, 90].

У млекопитающих, несмотря на то, что стабильно ранние и стабильно поздние ориджины составляют значительную фракцию генома, почти половина ориджинов активируется с равной вероятностью в ранней или поздней S-фазе [92]. У *S. pombe* HU слабо влияет на активацию ориджинов [9, 93]. Интересно, что у *S. pombe* почти нет постоянно поздних ориджинов – ориджины активируются стохастически относительно времени в S-фазе [51, 94].

**ATR/CHK1 каскад управляет активацией ориджинов.** Оказалось, что в ходе нормальной S-фазы последовательностью активации ориджинов репликации управляет тот же регуляторный каскад, который участвует в клеточном ответе на репликационный стресс [1, 95]. Под репликационным стрессом подразумеваются такие условия, которые приводят к остановке репликационных вилок, в частности, из-за большого количества повреждений в ДНК или при блокировании ферментов, связанных с репликацией – рибонуклеотидредуктазы (воздействие HU) и ДНК-полимераз (афидиколин).

Перечислим ключевых участников этого каскада. Главным сенсором повреждений в ДНК считается киназа ATM (ataxia telangiectasia mutated). Остановленные вилки репликации активируют другую киназу – ATR (ATM and Rad3-related). Киназы ATM и ATR имеют множество мишеней, фосфорилирование которых необходимо для регуляции нормального клеточного цикла, ответа на повреждения ДНК и апоптоза. Роль этих киназ в регуляции ориджинов репликации связана главным образом с активирующим фосфорилированием киназы контрольных точек CHK1 (checkpoint kinase 1) [96]. Активация CHK1 приводит к фосфорилированию фосфатазы Cdc25A, что запускает ее же деградацию. Cdc25A, в свою очередь, регулирует активность циклин-зависимых киназ. CHK1-зависимая деградация фосфатазы Cdc25A предотвращает дефосфорилирование CDK1 и CDK2. Это препятствует связыванию с ориджинами Cdc45, что необходимо для их активации [85, 97] (рис. 3).

В нормальном клеточном цикле именно ATR-зависимый каскад ингибирует преждевременное

включение поздних ориджинов и ограничивает использование ориджинов в кластерах ранних ориджинов (латеральное ингибирование). Блокирование активности АТМ и АТР при помощи кофеина или специфических антител приводит к значительному увеличению числа ориджинов в нормальных клетках [98, 99].

Каким образом каскад, активирующийся в ответ на репликационный стресс, работает в нормальной S-фазе в отсутствие остановившихся вилок и поврежденных ДНК?

Оказалось, что активатором АТР является интермедиат репликации – комплекс оцДНК с белками RPA (белки, связывающие оцДНК) [100]. Так, частичное удаление RPA из экстракта ооцитов *Xenopus* предотвращает увеличение числа активных ориджинов в ответ на воздействие кофеина.

Сразу можно упомянуть несколько любопытных последствий такого механизма активации АТР. Во-первых, чем медленнее происходит синтез ДНК, тем больше в репликационной вилке накапливается оцДНК, тем выше уровень индукции АТР. Во-вторых, если именно RPA активирует АТР, то АТР индуцируется сразу после начала синтеза ДНК, локально. Это может объяснить интерференцию между расположенными поблизости ориджинами [97].

Кроме того, предполагается, что движение репликационных вилок может тормозиться физиологическими ограничениями генома. Во-первых, некоторые нуклеотидные последовательности могут реплицироваться с большим трудом, чем другие. Во-вторых, факторы, связанные с хроматином, инсуляторные элементы и специфические ядерные структуры могут замедлять или останавливать репликационную вилку в отсутствие репликационного стресса, что будет также активировать каскад АТР.

Влияние АТР на интерференцию ориджинов и супрессию поздних ориджинов в ходе нормальной репликации, а также на подавление активации поздних ориджинов в ответ на репликационный стресс опосредуется именно CHK1 [99, 101, 102]. Точно так же, как и в случае АТР, при ингибировании или удалении CHK1 увеличивается количество активных ориджинов, замедляется скорость движения репликационных вилок и нарушается временная последовательность репликации генома. Важно, что в отсутствие CHK1 ориджины, в норме инициирующие репликацию поздно, активировались в ранней S-фазе [103–105]. Кроме того, на фоне снижения количества CHK1 супрессируется интерференция ориджинов, что приводит к более короткому расстоянию между ними [98].

У *S. cerevisiae* и метазоа RAD53 и CHK1, соответственно, предотвращают активацию поздних ориджинов до тех пор, пока не закончится репли-

кация примерно половины генома [99, 106]. Для перехода к репликации второй половины генома необходимо “восстановление от чекпоинта”, т.е. нейтрализация CHK1. Действительно, показано, что CHK1 разрушается посредством убиквитинирования и протеасомной деградации в средней и поздней S-фазе [107].

Роль CHK1 в S-фазе не ограничена влиянием на инициацию ориджинов через регуляцию активности циклин-зависимых киназ. CHK1 играет также важную роль в регуляции транскрипции генов, необходимых для нормального прохождения S-фазы [108]. Так, например, активация CHK1 приводит к репрессии гена, кодирующего ацетилтрансферазу GCN5, которая может участвовать в остановке клеточного цикла в ответ на репликационный стресс.

Особый интерес представляет участие CHK1 в подавлении экспрессии гена *RNR2*, кодирующего рибонуклеотидредуктазу [109]. От уровня экспрессии *RNR2* зависит количество ДНК-предшественников, т.е. скорость синтеза ДНК. Показано, что скорость репликации прямо зависит от числа активных ориджинов [70]. Вероятно, именно CHK1 координирует плотность ориджинов и скорость репликационных вилок как в нормальной S-фазе, так и в условиях репликационного стресса [109–111].

**Активация ориджинов в условиях репликационного стресса.** В ответ на повреждения ДНК и остановку вилок репликации происходит несколько событий, которые, на первый взгляд, противоречат друг другу.

С одной стороны, когда останавливается репликационная вилка, инициируются спящие ориджины [112], расположенные в непосредственной близости [64, 113]. Аналогичным образом двухцепочечные разрывы в ДНК приводят к усилению использования ориджинов, расположенных поблизости от разрыва [114]. Таким образом, контрольные точки не только отвечают за предотвращение продолжения S-фазы в условиях, затрудняющих клеточный цикл, но делают более вероятной активацию неэффективных ориджинов и активируют спящие ориджины. Вероятно, это необходимо для предотвращения недорепликации. Репарация ДНК – процесс достаточно длительный, и подобное продолжение репликации позволит как можно меньше задерживать репликацию всего генома в ответ на случайные события, происходящие по ходу движения индивидуальных репликационных вилок.

С другой стороны, репликационный стресс будет активировать АТР и ее прямую мишень – CHK1, что должно подавлять активацию ориджинов репликации. Каким образом одни ориджины супрессируются, в то время как другие, наоборот, активируются?

Одна из моделей основана на двойном эффекте ATM/ATR: на фоне репликационного стресса запускается еще один ATM/ATR-зависимый регуляторный каскад, который на спящих ориджинах прекрывает эффект ингибирования.

Кроме того, различный эффект ATR-каскада связан с регуляцией инициации репликации на уровне кластеров ориджина, организованных в репликационные фабрики [115]. При низком уровне репликационного стресса ATR/CHK1 преимущественно ингибирует активацию новых репликационных фабрик, в результате чего уменьшается общее число активных кластеров ориджина и репликационных фабрик. В это время снижается скорость репликации в уже активированных репликациях, что, как показано [70], приводит к активации спящих ориджина в пределах уже активных фокусов репликации. Ингибирование новых фабрик посредством ATR/CHK1 перераспределяет, таким образом, ресурсы в сторону уже активных фабрик (рис. 4), что позволяет минимизировать разрушительный эффект от появления остановившихся вилок и предотвратить проблему тех районов между остановившимися вилок, которые не успевают закончить репликацию до конца S-фазы.

Эти результаты показывают, что в условиях репликационного стресса к ингибированию посредством CHK1 чувствительны все ориджины, локализованные в репликационных фабриках, еще не активированных в данной S-фазе. Возникает вопрос: существует ли в действительности разделение на РАННИЕ и ПОЗДНИЕ ориджины? Или же в экспериментальных условиях, когда на клетки воздействуют HU, клетки синхронизируются на той стадии, когда успели активироваться только самые первые репликационные фабрики, соответствующие самому началу S-фазы?

Как оказалось, ранние и поздние ориджины отличаются не только по чувствительности к регуляции ATR/CHK1, но могут активироваться различными циклин-зависимыми киназами.

**Ранние и поздние ориджины активируются разными циклин-зависимыми киназами.** Предположение о том, что ранние и поздние ориджины могут активироваться разными комплексами циклинов с циклин-зависимыми киназами, возникло после изучения репликации у *S. cerevisiae*. В активации ранних ориджина у *S. cerevisiae* главную роль играет Cdk1-Clb6. В ходе S-фазы Clb6 подвергается деградации, а для активации поздних ориджина требуется циклин Clb5 [116, 117]. В случае мутации в гене циклина Clb5p весь геном реплицируется, используя лишь ранние ориджины. Оказалось, что в клетках млекопитающих ранние и поздние ориджины также активируются разными комплексами Cus/CDK.

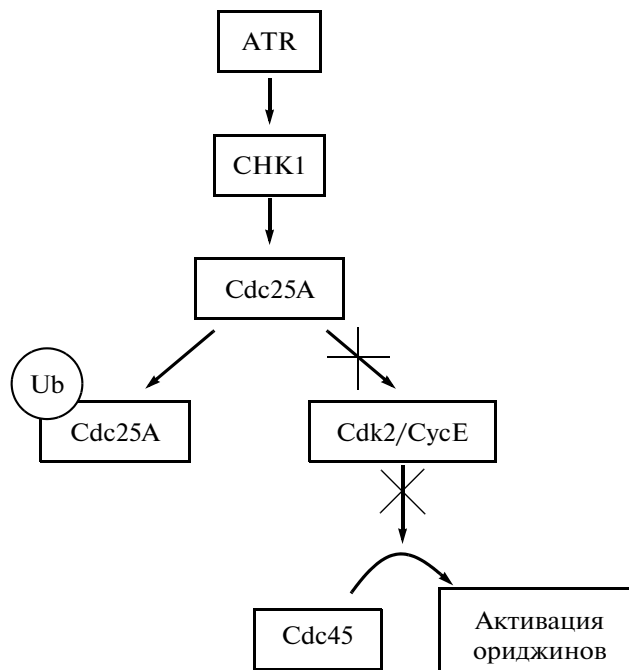
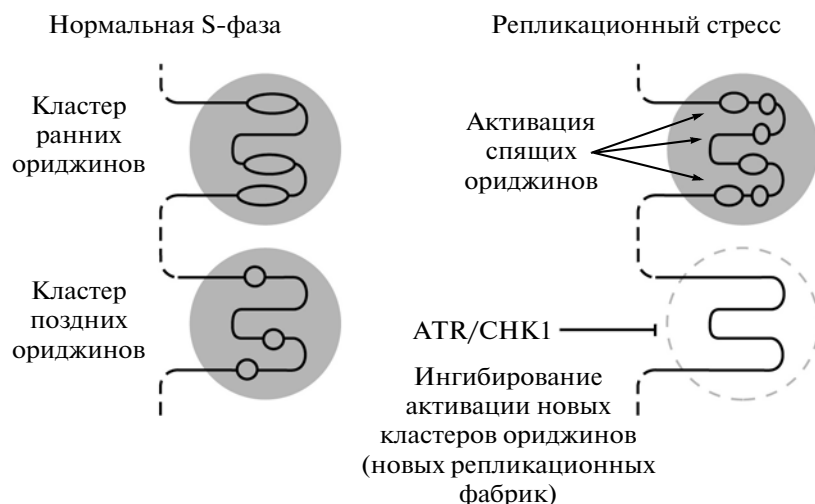


Рис. 3. Основные компоненты ATR-каскада, участвующие в регуляции активации ориджина репликации.

В соматических клетках млекопитающих инициация репликации на ранних ориджинах регулируется циклинами A и E, связанными с циклин-зависимой киназой CDK2. Кроме того, в регуляции участвует киназа Cdc7 в комплексе с регуляторной субъединицей Dbf4. Эти две киназы фосфорилируют субъединицы комплекса MCM2-7, что позволяет ориджину связывать Cdc45. В активации поздних ориджина в клетках млекопитающих важную роль играет другой комплекс – CDK1-циклин A2 [66].

В эмбриональных фибробластах мыши в ранней S-фазе активен комплекс циклин A2–CDK2. После того, как к середине S-фазы формирование комплексов с CDK2 выходит на плато, появляется и постепенно возрастает активность комплекса циклин A2–CDK1 [66]. Интересно, что подобная дифференциальная активность в значительной степени связана с CHK1. В клетках, мутантных по CHK1, активность комплекса циклин A2–CDK1 проявлялась раньше и усиливалась, а активность комплекса циклин A2–CDK2 не претерпевала значительных изменений. При этом CDK2 может связываться только с ранними ориджинами, в то время как CDK1 способна связываться и с ранними, и с поздними [66].

Таким образом, можно говорить о том, что в середине S-фазы происходит качественный переход между опосредованной CDK2 активацией “ранних” ориджина и активацией, опосредованной CDK1, “менее разборчивой” по отноше-



**Рис. 4.** Модель, показывающая, как репликационные фабрики реагируют на не очень высокий уровень репликационного стресса (© Ge, Blow, 2010 [115]. Впервые опубликовано в JCB. doi: 10.1083/jcb.201007074).

нию к ориджинам. Для этого перехода требуется нейтрализация CHK1.

Роль CHK1 в управлении активностью комплекса циклин A2–CDK1, но не циклин A2–CDK2, связана с регуляцией уровня CDC25A. Удаление CHK1 приводит к значительному повышению уровня Cdc25A и гиперактивации комплекса циклин A2–CDK1. При этом почти в 3 раза повышается плотность ориджинов репликации [66]. Сверхэкспрессия комплекса циклин A2–CDK1 оказывает аналогичный эффект. Поэтому вероятно, что именно уровень CDK1 модулирует эффективность ориджинов и время их активации [99, 102].

Почему все-таки CDK1 оказывает такой специфический эффект на поздние ориджины? CDK1 преимущественно связывается с поздними ориджинами, хотя и CDK1, и CDK2 могут взаимодействовать и с ранними. Судя по всему, циклин-зависимые киназы способны каким-то образом дифференциально распознавать те самые *цис*-факторы, которые определяют активацию ориджинов. А поскольку известно, что время активации ориджинов программируется на уровне протяженных хроматиновых доменов, в таком узнавании важную роль должно играть состояние хроматина.

Постепенная последовательная активация ориджинов необходима для поддержания баланса между числом активных репликационных вилок и скоростью, с которой происходит синтез ДНК. Плотность активных ориджинов (частота событий инициации) и движение репликационных вилок (скорость элонгации) должны корегулироваться, чтобы гарантированно обеспечить эффективную и полную дупликацию каждого хромосомного домена. Эту гипотезу подтверждают дан-

ные о том, что ATR/CHK1-каскад играет важную роль в корегуляции частоты инициаций и скорости элонгации [110].

#### МЕХАНИЗМЫ ПРОГРАММИРОВАНИЯ ВРЕМЕНИ АКТИВАЦИИ ОРИДЖИНОВ

Если ранние и поздние ориджины могут по-разному реагировать на сигналы клеточного цикла, то к началу S-фазы они должны быть каким-то образом маркированы как “ранние” и “поздние”. Далее мы рассмотрим, как и на каком этапе клеточного цикла происходит такое “программирование”.

Практически во всех случаях сами по себе ориджины, клонированные как автономно реплицирующиеся плазмиды, инициируют репликацию рано, независимо от времени их репликации в нативном положении [3]. Следовательно, время репликации ориджинов должно определяться окружающими нуклеотидными последовательностями или состоянием прилежащего хроматина. Существуют специфические последовательности, связывающие факторы поздней инициации репликации. Такие консервативные последовательности обнаружены в клетках дрожжей *S. pombe*. Они встречаются вблизи всех известных у этого организма поздних ориджинов и влияют на время их репликации [118]. У высших эукариот изучены несколько *цис*-регуляторных элементов, определяющих время включения расположенных поблизости ориджинов, однако эти последовательности специфичны только для этих ориджинов [119–121].

**Положение в ядре играет важную роль в программировании ориджинов.** Программирование временной последовательности репликации в

клетках млекопитающих происходит в начале фазы G1. Как раз в это время в клетке заканчивается постмитотическое перемещение хромосом, что косвенно указывает на возможную связь между установкой времени репликации районов хромосом и их положением в ядре [122, 123].

Недавно на геномном уровне картировали изменения временного профиля репликации в ходе развития млекопитающих. Оказалось, что эти изменения значительно коррелируют с картами пространственных взаимодействий между районами [124]. В результате возникла модель, согласно которой пространственная реорганизация ядра (она происходит как раз одновременно с “программированием” репликационных доменов) приводит к формированию ядерных компартментов, создающих различные условия для инициации репликации. Протяженные домены ранней и поздней репликации соответствуют участкам генома, попавшим в различные компартменты. Способность этих доменов быть “запрограммированными” на определенное время инициации репликации в S-фазе сохраняется до тех пор, пока они не пройдут через репликацию [61, 125].

В клетках дрожжей поздно реплицирующиеся ориджины имеют тенденцию располагаться вблизи периферии ядра в определенное время фазы G1, в то время как ориджины, реплицирующиеся рано, локализируются в ядре более случайным образом.

Важно отметить, что локализация в ядре определяет установление репликационной программы в фазе G1, но не дальнейшее ее поддержание. Так, у *S. cerevisiae* поздний ориджин ARS501 в норме локализуется на периферии ядра. Если индуцировать его выщепление из хромосомы, то образуется эписома, которая перемещается от периферии ядра, но позднее время активации ориджина в ближайшей S-фазе сохраняется [122, 126]. Хромосома 18 человека реплицируется в значительной степени поздно. Показано, что в активно делящихся клетках она находится на периферии ядра, однако когда клетка выходит из клеточного цикла, локализация хромосомы 18 в ядре изменяется. В такой клетке, если ее стимулировать к вступлению в S-фазу, хромосома 18 сохраняет способность к поздней репликации, не возвращаясь на периферию до следующего митоза [127]. Если клетки выходят из клеточного цикла в фазе G0, то пространственная организация ядра может претерпевать значительные изменения, однако после возвращения клеток в клеточный цикл репликация происходит по такому же сценарию — “запрограммированное состояние” доменов сохраняется, несмотря на видимые изменения в распределении рано и поздно реплицирующихся доменов в ядре. Следовательно, положение на периферии ядра необходимо именно для програм-

мирования, но не для поддержания программы поздней репликации.

Каким образом положение в ядре может участвовать в программировании репликации? В ранней G1-фазе, одновременно с постмитотическим перераспределением хромосом, с хромосомами связываются структурные белки, которые были удалены из хроматина во время митоза. Реассоциация белков, определяющих архитектуру хроматина в зоне периферии ядра, может приводить к увеличению локальной концентрации этих белков, создавая, тем самым, микроусловия для формирования определенной архитектуры хромосом. Эта архитектура может быть достаточно стабильной в течение оставшегося клеточного цикла, независимо от положения в ядре, и определять время включения ориджинов.

**Статус ацетилирования гистонов ориджинов определяет время инициации репликации.** Выше мы обсудили, что в начале фазы G1 на периферии ядра ориджины каким-то образом маркируются, и затем эти метки во время S-фазы узнаются киназами клеточного цикла. Что же является меткой?

Исследования на геномном уровне показывают, что именно локальные свойства хроматина определяют, какие ориджины будут активироваться преимущественно в начале S-фазы [27, 28, 36, 128–130]. Районы, маркированные модификациями гистонов, характерными для активных генов, как правило, содержат ранние ориджины, в то время как в районах с репрессивными модификациями, соответствующими гетерохроматину, ориджины обычно активируются в поздней S-фазе [131]. Это согласуется с результатами, согласно которым ранняя репликация значительно коррелирует с транскрипционной активностью [59, 129]. Ранние ориджины локализируются преимущественно вблизи активно экспрессирующихся генов, ориджины, активирующиеся в середине S-фазы, — около умеренно экспрессирующихся генов, а поздние ориджины лежат далеко от транскрибируемых генов [36]. Районы генома, реплицирующиеся рано, отличаются высокой чувствительностью к обработке ДНКазой I [132] и упаковкой в ацетилированные гистоны [42]. Поздно реплицирующиеся районы характеризуются закрытой конформацией хроматина и содержат преимущественно нетранскрибируемые последовательности [90, 92, 128, 133, 134].

Поскольку ориджины репликации располагаются вблизи активно транскрибирующихся генов и нередко совпадают с промоторами или иными регуляторными элементами транскрипции, в районах ориджинов, как правило, можно обнаружить огромное количество самых разнообразных хроматиновых меток. Из-за этого достаточно сложно определить роль отдельных компонентов хроматина именно в инициации репликации. Да-

же соседние ориджины, активирующиеся синхронно, могут иметь различный набор модификаций [135].

Считается, что главный маркер времени репликации – характер ацетилирования гистонов. Так, отсутствие деацетилазы гистонов Rpd3 или взаимодействующего с ней партнера Sin3 привело к тому, что поздние ориджины во внутрихромосомных локусах *S. cerevisiae* стали раньше связывать фактор репликации Cdc45p и, следовательно, раньше инициировать репликацию [136]. Направленное привлечение НАТ/HDAC к ориджину репликации локуса  $\beta$ -глобиновых генов человека привело к изменению времени репликации примерно на 20% от общей продолжительности S-фазы [78]. Ингибиторы деацетилаз гистонов изменяют временную картину репликации в клетках млекопитающих [137]. Все эти опыты указывают на консервативность регуляции инициации репликации через деацетилирование гистонов у эукариот.

На геномном уровне показано, что рано реплицирующиеся районы хромосом *D. melanogaster* маркированы гистонами, ацетилированными в положении H4K16, при этом обогащение H4K16ас наблюдалось даже в отсутствие транскрипции и было особенно значительным в зонах инициации репликации. Интересно, что у самцов дрозофилы в дозовокомпенсированной X-хромосоме, обогащенной H4K16ас, отсутствует поздняя репликация [59].

**Другие компоненты хроматина могут осуществлять “тонкую регулировку” временной программы репликации.** Считается, что другие компоненты и модификации хроматина тоже могут прямо влиять на временную программу репликации, однако вклад каждого фактора в отдельности оказывается относительно небольшим [138]. Например, в эмбриональных стволовых клетках мыши, мутантных по генам таких белков хроматина, как ДНК-метилтрансфераза Dnmt1, гистон-метилтрансфераза G9a, Eed – белок группы Polycomb или гистон-метилтрансферазы Suv39h1/h2, обнаружены лишь умеренные изменения во времени репликации отдельных участков прицентромерного гетерохроматина. Однако время репликации 20 проанализированных генов не изменилось [139]. Определенный эффект метилтрансферазы Suv39h1/h2 на время репликации гетерохроматиновых последовательностей наблюдали в эмбриональных фибробластах человека [140]. У дрожжей *S. pombe* на фоне мутаций в генах, кодирующих ортологи HP1 и SU(VAR)3–9 (Swi6 и Clr4, соответственно), замедлялась репликация гетерохроматиновых районов [82, 141]. Показано, что HP1 дрозофилы выполняет две функции в регуляции временных особенностей репликации: контролирует очень позднюю репликацию центромерной ДНК, а в эухроматиновых районах, характеризу-

ющихся высоким уровнем повторенных последовательностей, HP1 необходим для более ранней репликации [142]. Эти исследования показывают, что действие многих факторов хроматина, судя по всему, дополняет глобальные механизмы управления временной программой репликации, обеспечивая тонкую сайт-специфическую настройку (“fine-tuning”) этой программы [140, 142].

Важно подчеркнуть, что ни одна эпигенетическая метка не коррелирует с репликационным таймингом сильнее, чем сама транскрипция [82].

**Каскадная активация репликационных доменов. Модель домино.** При рассмотрении фокусов репликации отмечалось, что при репликации геномов млекопитающих существует тенденция к последовательной активации соседних кластеров репликационных. Можно предположить, что репликация определенного района генома облегчается последовательным связыванием факторов репликации в соседних сайтах инициации. Вероятно, акт репликации вызывает локальные изменения в конденсации хроматина, которые, в свою очередь, обеспечивают доступ/привлечение факторов репликации и новые события инициации. Репликация, согласно такой модели, должна начинаться в сайтах с “открытой” конформацией хроматина. Результатом события инициации будет деконденсация хроматина в соседних районах, что сделает его доступным для факторов инициации репликации. Такая модель, подразумевающая каскадный механизм подготовки хроматина к инициации репликации, названа “моделью домино” [18].

По некоторым косвенным данным в таком постепенном создании хроматина, компетентного к инициации репликации, могут принимать участие компоненты геликазного комплекса, в частности MCM2-7 или Cdc45. Cdc45 участвует в специфическом фосфорилировании гистона H1 и связанной с этим фосфорилированием деконденсации хроматина, необходимой для инициации репликации. Кроме того, распределение этих белков на цитологических препаратах реплицирующихся клеток отражает общий ход S-фазы, однако они появляются в фокусах репликации раньше, чем происходит ее инициация [6].

## ПРОТЯЖЕННЫЕ РЕПЛИКАЦИОННЫЕ ДОМЕНЫ

Изучение геномных профилей репликации самых разнообразных клеток высших эукариот (за исключением эмбриональных клеток на стадии быстрых делений дробления) показало, что в геноме клеток каждого типа можно выделить четкие домены ранней и поздней репликации [58, 131]. Эти домены в целом очень хорошо отражают организацию генома в хроматиновые домены.

Можно полагать, что относительно однородные свойства хроматина в пределах домена и определяют относительно синхронную инициацию репликации в этом домене.

**Что происходит на границах репликационных доменов?** Чем определяется время репликации на границах дискретных доменов репликации? Если на границе доменов находятся какие-то физические барьеры, то можно ожидать остановки репликационной вилки и скачкообразного профиля репликации между соседними доменами. В других случаях профиль репликации должен быть более плавным.

Действительно, профиль репликации на границах репликационных доменов высших эукариот может изменяться скачкообразно. Значительная разница во времени репликации между относительно близко расположенными районами (менее 100 т.п.н.) показана для нескольких пограничных зон между R- и G-дисками млекопитающих [143, 144]. Например, в районе локуса *MHC* (major histocompatibility complex) человека разница во времени репликации последовательностей, расположенных на расстоянии всего 16 т.п.н. [144], составила 1 ч, что может указывать на наличие барьеров, на которых вилка репликации либо останавливается, либо значительно снижает скорость. Нуклеотидные последовательности в таких районах имеют общие свойства, а именно, высокую плотность Alu- и LINE-повторов, содержат полипурин/полипиримидиновые участки, ди-, три- и тетра-нуклеотидные повторы, SAR-районы [143, 144].

Однако время вступления в репликацию районов на границе G- и R-дисков может изменяться и постепенно. Такую картину наблюдали между рано реплицирующимся R-диском 13q14.3 и поздно реплицирующимся G-диском 13q21.1 хромосомы 13 человека [145]. Интересно, что переход происходит ступенчато: группы репликонов размером примерно 1 млн.п.н. (что соответствует среднему размеру фокуса репликации) реплицируются скоординировано.

Известны примеры и градиента времени репликации. Так, например, в эмбриональных стволовых клетках мыши район генов *IgH* размером 400 т.п.н. граничит с одной стороны с районом, который всегда реплицируется очень рано в S-фазе, а с другой – с районом, который всегда реплицируется поздно. Сам по себе район *IgH* реплицируется единственной вилкой, приходящей от рано реплицирующегося района в направлении поздно реплицирующегося. Получается, что проксимальный ранний ориджин направляет вилку репликации через район *IgH*, и эта вилка движется до тех пор, пока не встретится с вилкой, идущей от ориджина, который включается позднее [23, 146]. Таким образом, расстояние между

кластерами синхронно включающихся ориджинов может быть существенно больше, чем между ориджинами внутри кластеров, и границы доменов поздней репликации могут определяться скоростью движения вилок репликации от ранних ориджинов.

Когда получили геномные профили репликации различных типов клеток млекопитающих, стало ясно, что на границах многих репликационных доменов существуют зоны, протяженностью до 1.5 млн.п.н., в которых отсутствуют события инициации репликации [7, 36, 58, 124, 128, 147]. Такие зоны назвали temporal transition region (TTR). Важно, что TTR не просто не содержат ориджины репликации, но для них, вероятно, характерно активное ингибирование ориджинов. Ориджины репликации (фрагменты ДНК, способные к эффективной инициации репликации в других районах генома), встроенные в TTR локуса *IgH* мыши, репликацию не инициировали [147].

Совсем недавно опубликованы результаты, противоречащие представлениям о широком распространении протяженных репликонов в TTR млекопитающих [148]. Согласно полученным данным, такие репликоны характерны лишь для эмбриональных стволовых клеток, в то время как в дифференцированных и раковых клетках не обнаружены репликоны длиной более 100 т.п.н. Предполагается, что наблюдающийся в TTR градиент репликации обеспечивается последовательной каскадной активацией ориджинов в соответствующих районах. В частности, в клетках HeLa локус *IgH* реплицируется при помощи множества последовательно активирующихся ориджинов.

**Изменения репликации при дифференцировке происходят на уровне протяженных доменов.** Репликационные домены, в пределах которых репликация происходит координировано, представляют собой дискретные единицы хромосомной структуры и функции. Свойства этих доменов могут изменяться в ходе дифференцировки клеток [138]. В настоящее время можно с уверенностью говорить о том, что значительная часть генома является объектом временной регуляции репликации в ходе развития, и для клеток каждого типа устанавливается своя, характерная для него, программа репликации [58, 59, 131, 149]. Так, в ходе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши в клетки-предшественники нервных клеток изменяется время репликации примерно 20% генома. В целом, на тех или иных стадиях развития изменяется время репликации почти половины генома млекопитающих.

При изучении динамики геномных профилей репликации в ходе дифференцировки клеток млекопитающих был замечен любопытный факт.



Несмотря на то, что в каждом определенном типе клеток мыши или человека репликационные домены могут быть очень разными по своему размеру (вплоть до нескольких миллионов пар нуклеотидов), фрагменты генома, время репликации которых изменялось в ходе дифференцировки, имели приблизительно одинаковый размер — порядка 400–800 т.п.н. Можно предполагать, что это отражает существование минимального размера домена координированной регуляции времени репликации [58, 124, 125, 149, 150].

Подобные исследования провели и на клетках *D. melanogaster* [30, 59]. Сравнение профилей репликации в двух типах клеток: в клетках эмбрионального происхождения Кс и в клетках С18, полученных из крылового имагинального диска, также выявило различия, составившие 20%. Важно, что у дрозофилы районы дифференциальной репликации, также достаточно протяженные, равны в среднем 100 т.п.н. При этом время репликации участков генома у дрозофилы может изменяться и в пределах небольших участков генома длиной несколько тысяч пар нуклеотидов [151].

Удивительно, но общий временной порядок репликации, характерный для клеток каждого типа, обладает существенной консервативностью. Так, обнаружено сходство профилей репликации в протяженных районах, демонстрирующих синтению, в мышинных и человеческих клетках одного типа [152]. Тканеспецифические профили репликации оказались более консервативными, чем многие другие свойства тех же участков генома, в частности, чем GC-состав. Это указывает на то, что поддержание точной временной программы репликации — очень важная характеристика эпигенетического состояния клеток, хотя точное значение этой программы пока ясно не до конца.

**Репликационные домены — очень стабильная и информативная эпигенетическая характеристика типа клеток и стадий дифференцировки.** В биологии стволовых клеток необходимо бывает решать задачи, связанные с проверкой качества индуцированных плюрипотентных клеток, с выяснением их дифференцировочного потенциала и определением клеточной идентичности — на ранних этапах эмбриогенеза клетки быстро меняют свойства и эпигенетический статус. Недавно было показано, что временные особенности репликации могут использоваться для решения этих задач [153]. Как оказалось, профиль репликации — характеристика менее динамичная, чем особенности транскрипции или состава хроматина. Кроме того, она изменяется одновременно в пределах протяженных репликационных доменов, организация которых специфична для каждого типа клеток. При этом изменения в профиле репликации в ходе дифференцировки клеток происходят в

строго определенном порядке и на уровне достаточно протяженных участков генома.

Группе Дэвида Гилберта удалось протестировать несколько десятков типов клеток, соответствующих разным этапам раннего эмбрионального развития, и построить дендрограмму, которая отражает последовательность дифференцировки и “родственные связи” клеток [130].

Замечательно, что профили репликации в индуцированных плюрипотентных клетках, репрограммированных из фибробластов и человека, и мыши, практически не отличались от профилей в эмбриональных стволовых клетках. Более того, как только происходит потеря плюрипотентности, профиль репликации значительно меняется [138]. Таким образом, профиль репликации может служить прекрасным маркером плюрипотентности. Более того, удалось выделить определенные маркерные районы, которые позволяют по локальному профилю репликации классифицировать эмбриональные клетки мыши или человека. Эти районы называли “репликационными отпечатками” (replication fingerprints) [153]. Репликационные отпечатки предоставляют широкие возможности для характеристики различных типов клеток или степени их дифференцировки [153].

**Репликационные домены и регуляция транскрипции генов.** Итак, в ходе дифференцировки клеток происходят значительные изменения времени репликации протяженных хроматиновых доменов. Но как это соотносится с регуляцией экспрессии генов?

Изучение полногеномных профилей репликации и транскрипции в клетках *D. melanogaster* показало, что чем позднее ген реплицируется в S-фазе клеточного цикла, тем меньше вероятность его транскрипционной активности в клетках данного типа. В то же время, есть активные гены, которые локализируются в поздно реплицирующихся районах, и, напротив, есть неактивные гены, которые реплицируются в ранней S-фазе [59, 133]. Однако корреляции между временем репликации гена и уровнем его транскрипции у *D. melanogaster* не обнаружено. Большинство активных генов с различным уровнем экспрессии реплицируется рано, в то время как меньшая группа генов, среди которых есть и активно транскрибируемые, реплицируется поздно [154]. При этом уровень транскрипции генов коррелирует с уровнем специфичных для эухроматина модификаций гистонов. Оказалось, что у *D. melanogaster* домены ранней и поздней репликации существенно различаются по плотности транскрипции вдоль хромосомы. Плотность сайтов связывания РНК-полимеразы II также значительно выше в районах наиболее ранней репликации по сравнению с районами, вступающими в репликацию позже.

Эти данные указывают на то, что транскрипционный статус влияет на профиль репликации на уровне крупных доменов (>100 т.п.н.), а не на уровне отдельных генов [90].

К подобным же выводам привело изучение репликации у млекопитающих [58, 124, 130]. Значительная корреляция наблюдается между временем репликации и транскрипцией тех генов, которые реплицируются в средней и поздней S-фазе. В то же время, такой корреляции не найдено для генов, которые реплицируются во время первой трети S-фазы, т.е. эти гены могут примерно с одинаковой вероятностью экспрессироваться или быть неактивными.

Важно учитывать еще и то, что нуклеотидные последовательности, соответствующие генам, имеют тенденцию реплицироваться в ранней S-фазе независимо от уровня их экспрессии. Полногеномный анализ профилей репликации у млекопитающих показал, что около 75% генов реплицируются в первой половине S-фазы, в то время как большая часть негенной ДНК реплицируется в поздней S-фазе во всех исследованных типах клеток [58].

**Какие же гены попадают в домены, время репликации которых изменяется в ходе развития?** Судя по всему, это зависит не от функции гена, а от его хроматинового контекста и, как следствие, от его молекулярной организации. В качестве примера можно привести паралогичные гены  $\beta$ - и  $\alpha$ -глобинов млекопитающих, которые экспрессируются только в клетках эритроидного ряда.

Локус  $\beta$ -глобинов расположен в хроматиновом домене размером более 1 млн.п.н., который в эритроидных клетках становится чувствительным к расщеплению ДНКазой I (“открытая” конформация хроматина). Этот локус характеризуется повышенным уровнем ацетилирования гистонов H3 и H4, он расположен далеко от прицентромерного гетерохроматина и реплицируется в ранней S-фазе. В неэритроидных клетках гены глобинов подвержены сайленсингу, локус нечувствителен к расщеплению эндонуклеазами (“закрытый” хроматин), гипоацетилирован, перемещается к прицентромерному гетерохроматину и реплицируется в поздней S-фазе [155, 156]. Регуляция таких тканеспецифических изменений осуществляется при помощи специфических *цис*-последовательностей, которые локализованы в пределах 40 т.п.н., окружающих LCR (элемент, необходимый для регуляции тканеспецифической экспрессии  $\beta$ -глобинового локуса) и *транс*-факторов, способных переключить программу репликации в клетках эритроидного ряда. С использованием делеционного анализа удалось разделить нуклеотидные последовательности, отвечающие за временную регуляцию экспрессии и репликации в данном локусе, а также показать, что время репликации локуса коррели-

рует с его чувствительностью к нуклеазам (т.е. со структурой хроматина), но не с экспрессией глобиновых генов [157].

В то же время  $\alpha$ -глобиновый локус расположен в хроматиновом домене, для которого характерна “открытая” конформация и ранняя репликация в S-фазе независимо от статуса транскрипции глобиновых генов. Локус содержит большое число активных генов и CpG-островков [155]. В этом районе не найден ориджин или зона, которая определяла бы время репликации района. Здесь, вероятно, паттерн репликации связан со структурой хроматина во всем локусе, которая облегчает доступ к множественным ориджинам репликации. Вероятно, для ранней инициации репликации не требуется специального программирования. Известно, что CpG-островки (G + C-богатые районы длиной около 1 т.п.н., свободные от метилирования) содержат промоторы многих генов млекопитающих. Эти островки также составляют значительную фракцию ориджинов репликации млекопитающих, для которых характерна скоординированная ранняя инициация репликации в S-фазе [158].

Изменение времени репликации района в S-фазе может быть одним из механизмов перепрограммирования его состояния в следующих клеточных поколениях. Действительно, переключение программы репликации на “позднюю” может определить дальнейшее репрессированное, “молчащее”, состояние района. Активное же состояние хроматина, сопряженное с ранней репликацией, не обязательно приводит к повышению активности генов, так как для активации транскрипции могут требоваться специфические регуляторные факторы. При этом активное состояние хроматина может облегчить связывание промоторов с этими факторами. В свою очередь, способность регуляторов транскрипции рекрутировать ферменты, которые модифицируют и перестраивают хроматин, может быть одним из факторов, определяющих, где и когда начнется репликация в хромосомах высших эукариот.

### ЗНАЧЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕПЛИКАЦИИ

Мы обсудили особенности и механизмы регуляции пространственно-временной организации репликации эукариотических геномов и выяснили, что программа репликации – стабильная эпигенетическая характеристика клеток, которая жестко регулируется в клеточном цикле и в развитии. Нам осталось ответить на самый главный вопрос – почему регуляция репликации подвержена такому жесткому контролю, какова ее роль в клеточном цикле, в развитии многоклеточного организма, а также в эволюции геномов.

**Роль в поддержании стабильности геномов.** Судя по всему, первоначальная роль пластичной инициации репликации связана с поддержанием стабильности эукариотического генома. Управление эффективностью потенциальных ориджинов позволяет добиться заданной протяженности S-фазы независимо от скоростей движения отдельных репликационных вилок и от определенного количества повреждений в молекуле ДНК. Это позволяет строго придерживаться определенного времени клеточного цикла, что очень важно для согласованного развития многоклеточного организма. Нарушение регуляции временной последовательности репликации у высших эукариот приводит к нестабильности генома, нарушению конденсации хромосом в митозе и когезии сестринских хроматид, а также и к злокачественной трансформации клеток [138].

**Роль в регуляции экспрессии генов и поддержании хроматиновых доменов.** У всех изученных к настоящему моменту многоклеточных организмов наблюдается значительная положительная корреляция между ранней репликацией и транскрипцией, однако, нельзя говорить об однозначной связи между временем репликации гена и уровнем его транскрипции. Считается, что временная организация репликации важна именно для поддержания эпигенетического статуса протяженных доменов хроматина, которые, в свою очередь, определяют транскрипционную компетентность отдельных генов в клетках каждого типа.

Само по себе разделение во времени и пространстве репликации и, соответственно, сборки хроматина разного типа, кажется очень “разумным”, поскольку обеспечивает дополнительную защиту от случайного перераспределения хроматиновых меток. Так, например, очень важно, чтобы центромерный вариант гистона H3 собрался вновь только на центромерной ДНК. Появление этого гистона в других районах хромосомы может привести к возникновению эктопической центромеры. Предполагается, что у всех эукариот центромерный хроматин является независимым репликационным доменом, хотя время репликации центромерной ДНК может значительно отличаться. Так, у дрожжей *Candida albicans*, *S. cerevisiae* и *S. pombe* центромерный хроматин реплицируется в самом начале S-фазы [159, 160]. Показано, что в клетках *C. albicans* ориджин репликации, связанный с центромерой, — это наиболее рано активирующийся ориджин в хромосоме. При этом перенос центромерных детерминант в эктопический сайт также приводит к очень ранней репликации [160]. У высших эукариот центромерная ДНК может реплицироваться на самых разных этапах S-фазы, однако всегда асинхронно с соседним прицентромерным гетерохроматином [161].

Кроме пассивного влияния на упаковку хроматина, пространственно-временная организация репликации позволяет обеспечить активный механизм эпигенетического наследования. Оказывается, набор белков, участвующих в упаковке и модификациях хроматина может значительно отличаться в репликационных вилках, работающих на разных этапах S-фазы.

Пожалуй, наиболее ярко дифференциальную сборку хроматина на разных этапах S-фазы иллюстрирует ситуация с ацетилированием гистонов [162]. Оказалось, что ацетилирование гистонов H3 и H4, сопровождающее сборку хроматина в репликационной вилке, определяется именно временем репликации соответствующего района. Прежде чем попасть в нуклеосому, вновь синтезированные димеры H3/H4 подвергаются следующим модификациям: на этапе ранней S-фазы активно ацетируется изначально неацетилированный гистон H3. Для этого с репликационной вилкой связываются ацетилазы гистонов. На этапе поздней S-фазы, наоборот, с репликационной вилкой связаны деацетилазы, которые деацетилируют гистон H4, поступающий в ядро в преацетилированном состоянии.

Получается, что ДНК, запрограммированная реплицироваться в первой половине S-фазы, автоматически переупаковывается в ацетилированные коровые гистоны, в то время как районы генома, лежащие в поздно реплицирующихся участках, получают деацетилированные гистоны. Если заставить ДНК, изначально упакованную в нуклеосомы с деацетилированными гистонами, реплицироваться в ранней S-фазе, то произойдет “переупаковка” хроматина в ацетилированные гистоны. Наоборот, изменение репликации от ранней к поздней сопровождается упаковкой хроматина в деацетилированные гистоны [162].

Поскольку время репликации ДНК у высших эукариот регулируется на уровне протяженных (около 1 млн. п.н.) доменов, во время репликации геном будет подразделяться на домены двух дискретных типов — гипо- или гиперацетилированные. Это очень хорошо согласуется с организацией хромосом млекопитающих, где выделяются гиперацетилированные рано реплицирующиеся R-диски и гипоацетилированные G-диски, реплицирующиеся позднее.

ДНК- и H3K9-метилтрансферазы обнаруживаются в вилках репликации на стадии поздней S-фазы, что обеспечивает упаковку всех поздно реплицирующихся последовательностей в гетерохроматин.

Получается, что мы имеем дело с петлей обратной связи. Тип домена хроматина определяет время репликации, а время репликации, в свою очередь, тип хроматина, в который будет упаковываться домен. Вероятно, таким образом поддерживается

“грубое” разделение на домены с открытым и закрытым типом хроматина, которое происходит непосредственно в репликационной вилке. После репликации наблюдается последовательное постепенное созревание хроматина, в котором могут участвовать дополнительные район-специфичные факторы, в частности, ДНК-связывающие белки, которые узнают определенные сайты-мишени или некодирующие РНК, привлекаемые к участкам генома с определенной нуклеотидной последовательностью.

Важно, что, регулируя время репликации района, можно не только воспроизводить хроматиновые метки в клеточных поколениях, но и перепрограммировать состояния района. Так, например, при инактивации X-хромосомы млекопитающих переключение времени репликации является одним из первых эпигенетических событий. У большинства генов высших эукариот оба аллеля экспрессируются одинаково и реплицируются скоординированно. Однако имеется небольшой класс генов, которые в каждой клетке транскрибируются преимущественно с одного аллеля (явление импринтинга). В большинстве случаев инактивированный аллель реплицируется поздно. При этом как поздняя репликация, так и инактивация программируются в мейозе и поддерживаются в течение остального развития, и эта программа стирается во время следующего раунда гаметогенеза. Считается, что временной сдвиг к поздней репликации может использоваться как механизм выбора активного аллеля [163, 164]. В качестве прямого доказательства возможности программирования транскрипционного статуса гена при помощи изменения времени его репликации можно привести результаты опытов, в которых в клетки, находящиеся на разных этапах S-фазы, вводили плазмиды, несущие репортерный ген. В культуре клеток млекопитающих на стадии поздней S-фазы репортерный ген во время репликации запаковывается в закрытый хроматин и не транскрибируется. Это состояние затем наследуется в клеточных поколениях. Если же плазмиду вводят на более ранних этапах S-фазы, то репортерный ген стабильно транскрибируется в клеточных поколениях [162, 165].

**Роль пространственно-временной организации репликации в эволюции геномов.** Пространственно-временная организация репликации также отражает сложность эукариотического генома. Показано, что существует четкая корреляция между размером генома и “степенью асинхронности репликации”, т.е., по сути дела, с протяженностью S-фазы [166]. Во время эмбрионального развития асинхронность репликации возникает одновременно со становлением гетерохроматиновых доменов [167].

У млекопитающих подразделение генома на рано и поздно реплицирующиеся домены соответствует организации генома в R/G-диски [138]. Кроме того, у млекопитающих обнаруживается выраженная корреляция между доменами репликации и изохорами – участками генома с относительно однородным GC-составом [15]. Еще в одной из первых работ по построению хромосомного профиля репликации в клетках млекопитающих было замечено, что переход от ранней репликации к поздней соответствовал скачку в GC-составе. При этом, как правило, рано реплицирующиеся зоны, в отличие от поздно реплицирующихся, относятся к GC-богатым [144]. Таким образом, уже по особенностям организации генома можно предсказать многие временные закономерности его репликации.

Известно, что у дрозофилы домены поздней репликации обладают особыми свойствами на геномном уровне, которые позволяют предсказывать такие домены, основываясь на анализе нуклеотидной последовательности [168]. Закономерность заключается в том, что по краям зон поздней репликации, как правило, располагаются области повышенной плотности генов, в которых находятся короткие и часто перекрывающиеся гены. Внутри этих зон располагаются длинные гены с большими интронами, перемежающиеся длинными межгенными промежутками. Кроме того, внутри содержатся очень короткие гены, и значительная их часть представляет собой гены, экспрессирующиеся в семенниках самцов.

Временной профиль репликации отражает неоднородную организацию хроматина, которая, в свою очередь, связана с неоднородной организацией генома. Возможно, именно неодновременная репликация разных районов хромосом является важной движущей силой дивергенции организации доменов хроматина. Дело в том, что и у млекопитающих, и у дрозофилы скорость нейтральной эволюции участков генома, реплицирующихся на разных этапах S-фазы, значительно различается [166, 169, 170]. Описано несколько независимых механизмов, которые могут приводить к такому результату. Основной механизм накопления мутаций в поздно реплицирующихся динуклеотидах CpG, а именно, накопление замен C → T, увеличивается из-за высокого уровня метилирования этих динуклеотидов именно в поздно реплицирующихся районах генома (метилирование CpG значительно повышает вероятность замены C → T). Это актуально для тех видов, у которых важную роль играет метилирование ДНК, например, для млекопитающих. Кроме того, положительная корреляция между скоростью динуклеотидных замен и временем репликации района обнаружена и вне CpG-участков. Главным механизмом здесь считается снижение эффективности систем репарации в ходе S-фазы. Мож-

но, например, вспомнить, что для активации поздних ориджинов во второй половине S-фазы требуется нейтрализация СНК1-зависимой системы контроля повреждений ДНК. Судя по всему, в поздней S-фазе снижается активность репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair) и, возможно, некоторых других систем репарации. Кроме того, вероятность возникновения мутаций в ходе собственно синтеза ДНК также не одинакова на разных этапах клеточного цикла [166, 169]. Таким образом, пространственно-временная организация репликации является важным фактором, управляющим скоростью эволюции геномов у млекопитающих.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Давно известно, что разные типы хроматина реплицируются в разное время в S-фазе, однако лишь в последние годы регуляцию репликации начали рассматривать как эпигенетическое явление. Стало ясно, что в ходе дифференцировки в программе репликации генома происходят значительные изменения, тесно связанные с транскрипционной активностью и организацией ядра. Домены временно скоординированной репликации представляют собой дискретные единицы хромосомной структуры и функции. И хотя функциональное значение такой жесткой регуляции репликации еще до конца не известно, можно с уверенностью говорить, что программа репликации — еще одна эпигенетическая характеристика каждого типа клеток.

Исследования пространственно-временной организации репликации бурно развиваются и, вероятно, преподнесут нам в ближайшие годы еще немало сюрпризов. Постоянно публикуются все новые данные, полученные на различных организмах, в клетках и тканях разного типа. Это, с одной стороны, полногеномные профили репликации, а также данные об их связи с организацией хроматина и распределением хромосомных белков. С другой стороны, это данные о молекулярных механизмах эпигенетической регуляции репликации. В обзоре мы попытались проследить все ступени регуляции репликации, чтобы помочь читателю сориентироваться в этом огромном потоке информации.

Автор выражает глубокую благодарность Е.И. Волковой, Е.Н. Андреевой, Е.С. Беляевой за ценные замечания при подготовке текста, Джулиан Блоу (Julian Blow) за любезное разрешение использовать рисунок, а также рецензенту статьи, ценные замечания которого позволили значительно улучшить текст.

Работа получила финансовую поддержку Программы Президиума РАН (№ 6.4), Программы партнерских фундаментальных исследований СО

РАН (проект № 82) и Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-00874-а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowiec J.A., Schildkraut C.L. 2011. Open sesame: activating dormant replication origins in the mouse immunoglobulin heavy chain (IgH) locus. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**, 284–292.
2. DePamphilis M.L. 2003. The ‘ORC cycle’: a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene.* **310**, 1–15.
3. Diffley J.F., Labib K. 2002. The chromosome replication cycle. *J. Cell Sci.* **115**, 869–872.
4. Dimitrova D.S., Gilbert D.M. 1999. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol. Cell.* **4**, 983–993.
5. Ives I., Petojevic T., Pesavento J.J., Botchan M.R. 2010. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol. Cell.* **37**, 247–258.
6. Alexandrow M.G., Hamlin J.L. 2005. Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation. *J. Cell Biol.* **168**, 875–886.
7. Arias E.E., Walter J.C. 2007. Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* **21**, 497–518.
8. Raghuraman M.K., Winzeler E.A., Collingwood D., et al. 2001. Replication dynamics of the yeast genome. *Science.* **294**, 115–121.
9. Heichinger C., Penkett C.J., Bahler J., Nurse P. 2006. Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* **25**, 5171–5179.
10. Lebofsky R., Heilig R., Sonnleitner M., et al. 2006. DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 5337–5345.
11. Hamlin J.L., Mesner L.D., Lar O., et al. 2008. A revisionist replicon model for higher eukaryotic genomes. *J. Cell. Biochem.* **105**, 321–329.
12. Mesner L.D., Valsakumar V., Karnani N., et al. 2011. Bubble-chip analysis of human origin distributions demonstrates on a genomic scale significant clustering into zones and significant association with transcription. *Genome Res.* **21**, 377–389.
13. Wong P.G., Winter S.L., Zaika E., et al. 2011. Cdc45 limits replicon usage from a low density of preRCs in mammalian cells. *PLoS One.* **6**, e17533.
14. Holmquist G.P. 1992. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 17–37.
15. Costantini M., Bernardi G. 2008. Replication timing, chromosomal bands, and isochores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 3433–3437.

16. Berezney R., Dubey D.D., Huberman J.A. 2000. Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma*. **108**, 471–484.
17. Sadoni N., Cardoso M.C., Stelzer E.H., et al. 2004. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *J. Cell. Sci.* **117**, 5353–5365.
18. Chagin V.O., Stear J.H., Cardoso M.C. 2010. Organization of DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **2**, a000737.
19. Jackson D.A., Pombo A. 1998. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J. Cell. Biol.* **140**, 1285–1295.
20. Conti C., Sacca B., Herrick J., et al. 2007. Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 3059–3067.
21. Sporbert A., Gahl A., Ankerhold R., et al. 2002. DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol. Cell.* **10**, 1355–1365.
22. Maya-Mendoza A., Olivares-Chauvet P., Shaw A., Jackson D.A. 2010. S phase progression in human cells is dictated by the genetic continuity of DNA foci. *PLoS Genet.* **6**, e1000900.
23. Ermakova O.V., Nguyen L.H., Little R.D., et al. 1999. Evidence that a single replication fork proceeds from early to late replicating domains in the IgH locus in a non-B cell line. *Mol. Cell.* **3**, 321–330.
24. Yamashita M., Hori Y., Shinomiya T., et al. 1997. The efficiency and timing of initiation of replication of multiple replicons of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VI. *Genes Cells.* **2**, 655–665.
25. Aladjem M.I. 2007. Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 588–600.
26. Hamlin J.L., Mesner L.D., Dijkwel P.A. 2010. A winding road to origin discovery. *Chromosome Res.* **18**, 45–61.
27. Cadoret J.C., Meisch F., Hassan-Zadeh V., et al. 2008. Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 15837–15842.
28. Sequeira-Mendes J., Diaz-Uriarte R., Apedaile A., et al. 2009. Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells. *PLoS Genet.* **5**, e1000446.
29. Karnani N., Taylor C.M., Malhotra A., Dutta A. 2010. Genomic study of replication initiation in human chromosomes reveals the influence of transcription regulation and chromatin structure on origin selection. *Mol. Biol. Cell.* **21**, 393–404.
30. MacAlpine H.K., Gordan R., Powell S.K., et al. 2010. *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res.* **20**, 201–211.
31. Sher N., Bell G.W., Li S., et al. 2012. Developmental control of gene copy number by repression of replication initiation and fork progression. *Genome Res.* **22**, 64–75.
32. Cayrou C., Coulombe P., Vigneron A., et al. 2011. Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res.* **21**, 1438–1449.
33. Costas C., de la Paz Sanchez M., Stroud H., et al. 2011. Genome-wide mapping of *Arabidopsis thaliana* origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 395–400.
34. Eaton M.L., Prinz J.A., MacAlpine H.K., et al. 2011. Chromatin signatures of the *Drosophila* replication program. *Genome Res.* **21**, 164–174.
35. Gilbert D.M. 2010. Evaluating genome-scale approaches to eukaryotic DNA replication. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 673–684.
36. Desprat R., Thierry-Mieg D., Lailier N., et al. 2009. Predictable dynamic program of timing of DNA replication in human cells. *Genome Res.* **19**, 2288–2299.
37. Vashee S., Cvetic C., Lu W., et al. 2003. Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* **17**, 1894–1908.
38. Remus D., Beall E.L., Botchan M.R. 2004. DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *EMBO J.* **23**, 897–907.
39. Simpson R.T. 1990. Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element *in vivo*. *Nature.* **343**, 387–389.
40. Crampton A., Chang F., Pappas D.L. Jr., et al. 2008. An ARS element inhibits DNA replication through a SIR2-dependent mechanism. *Mol. Cell.* **30**, 156–166.
41. Field Y., Kaplan N., Fondufe-Mittendorf Y., et al. 2008. Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000216.
42. Roy S., Ernst J., Kharchenko P.V., Kheradpour P., et al. 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science.* **330**, 1787–1797.
43. Berbenetz N.M., Nislow C., Brown G.W. 2010. Diversity of eukaryotic DNA replication origins revealed by genome-wide analysis of chromatin structure. *PLoS genetics.* **6**, e1001092.
44. Deal R.B., Henikoff J.G., Henikoff S. 2010. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones. *Science.* **328**, 1161–1164.
45. Eaton M.L., Galani K., Kang S., et al. 2010. Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.* **24**, 748–753.
46. Cayrou C., Coulombe P., Mechali M. 2010. Programming DNA replication origins and chromosome organization. *Chromosome Res.* **18**, 137–145.

47. Lipford J.R., Bell S.P. 2001. Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol. Cell.* **7**, 21–30.
48. Ghosh M., Kemp M., Liu G., et al. 2006. Differential binding of replication proteins across the human c-myc replicator. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5270–5283.
49. Lee W., Tillo D., Bray N., et al. 2007. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat. Genet.* **39**, 1235–1244.
50. Diffley J.F., Stillman B. 1989. Similarity between the transcriptional silencer binding proteins ABF1 and RAP1. *Science.* **246**, 1034–1038.
51. Dai J., Chuang R.Y., Kelly T.J. 2005. DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 337–342.
52. Mechali M. 2010. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**, 728–738.
53. Wu J.R., Gilbert D.M. 1996. A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science.* **271**, 1270–1272.
54. Ganier O., Bocquet S., Peiffer I., et al. 2011. Synergic reprogramming of mammalian cells by combined exposure to mitotic *Xenopus* egg extracts and transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 17331–17336.
55. Abdurashidova G., Radulescu S., Sandoval O., et al. 2007. Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin. *EMBO J.* **26**, 998–1009.
56. Egli D., Rosains J., Birkhoff G., Eggan K. 2007. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature.* **447**, 679–685.
57. Lemaitre J.M., Danis E., Pasero P., et al. 2005. Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell.* **123**, 787–801.
58. Hiratani I., Ryba T., Itoh M., et al. 2008. Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol.* **6**, e245.
59. Schwaiger M., Stadler M.B., Bell O., et al. 2009. Chromatin state marks cell-type- and gender-specific replication of the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* **23**, 589–601.
60. Gay S., Lachages A.M., Millot G.A., et al. 2010. Nucleotide supply, not local histone acetylation, sets replication origin usage in transcribed regions. *EMBO Repts.* **11**, 698–704.
61. Lu J., Li F., Murphy C.S., et al. 2010. G2 phase chromatin lacks determinants of replication timing. *J. Cell. Biol.* **189**, 967–980.
62. Wu P.Y., Nurse P. 2009. Establishing the program of origin firing during S phase in fission yeast. *Cell.* **136**, 852–864.
63. Woodward A.M., Gohler T., Luciani M.G., et al. 2006. Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J. Cell. Biol.* **173**, 673–683.
64. Ibarra A., Schwob E., Mendez J. 2008. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 8956–8961.
65. Patel P.K., Kommajosyula N., Rosebrock A., et al. 2008. The Hsk1(Cdc7) replication kinase regulates origin efficiency. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 5550–5558.
66. Katsuno Y., Suzuki A., Sugimura K., et al. 2009. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 3184–3189.
67. Krasinska L., Besnard E., Cot E., et al. 2008. Cdk1 and Cdk2 activity levels determine the efficiency of replication origin firing in *Xenopus*. *EMBO J.* **27**, 758–769.
68. McCune H.J., Danielson L.S., Alvino G.M., et al. 2008. The temporal program of chromosome replication: genomewide replication in *clb5{Delta} Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **180**, 1833–1847.
69. Buongiorno-Nardelli M., Micheli G., Carri M.T., Marilley M. 1982. A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature.* **298**, 100–102.
70. Courbet S., Gay S., Arnoult N., et al. 2008. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature.* **455**, 557–560.
71. Dijkwel P.A., Vaughn J.P., Hamlin J.L. 1994. Replication initiation sites are distributed widely in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4989–4996.
72. Pemov A., Bavykin S., Hamlin J.L. 1998. Attachment to the nuclear matrix mediates specific alterations in chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 14757–14762.
73. Tatsumi Y., Ohta S., Kimura H., et al. 2003. The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J. Biol. Chem.* **278**, 41528–41534.
74. Anachkova B., Djeliova V., Russev G. 2005. Nuclear matrix support of DNA replication. *J. Cell. Biochem.* **96**, 951–961.
75. Earnshaw W.C., Heck M.M. 1985. Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J. Cell. Biol.* **100**, 1716–1725.
76. Eivazova E.R., Gavrilov A., Pirozhkova I., et al. 2009. Interaction *in vivo* between the two matrix attachment regions flanking a single chromatin loop. *J. Mol. Biol.* **386**, 929–937.
77. Pasero P., Bensimon A., Schwob E. 2002. Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev.* **16**, 2479–2484.
78. Goren A., Tabib A., Hecht M., Cedar H. 2008. DNA replication timing of the human beta-globin domain is controlled by histone modification at the origin. *Genes Dev.* **22**, 1319–1324.
79. Aggarwal B.D., Calvi B.R. 2004. Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature.* **430**, 372–376.

80. Miotto B., Struhl K. 2008. HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes Dev.* **22**, 2633–2638.
81. Iizuka M., Takahashi Y., Mizzen C.A., et al. 2009. Histone acetyltransferase Hbo1: catalytic activity, cellular abundance, and links to primary cancers. *Gene.* **436**, 108–114.
82. Hayashi M.T., Takahashi T.S., Nakagawa T., et al. 2009. The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus. *Nat. Cell. Biol.* **11**, 357–362.
83. Pak D.T., Pflumm M., Chesnokov I., et al. 1997. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell.* **91**, 311–323.
84. Shirahige K., Hori Y., Shiraishi K., et al. 1998. Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature.* **395**, 618–621.
85. Willis N., Rhind N. 2009. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div.* **4**, 13.
86. Hendricks S.P., Mathews C.K. 1998. Differential effects of hydroxyurea upon deoxyribonucleoside triphosphate pools, analyzed with vaccinia virus ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **273**, 29519–29523.
87. Paulsen R.D., Cimprich K.A. 2007. The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst).* **6**, 953–966.
88. Dimitrova D.S., Gilbert D.M. 2000. Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 686–694.
89. Marheineke K., Hyrien O. 2001. Aphidicolin triggers a block to replication origin firing in *Xenopus* egg extracts. *J. Biol. Chem.* **276**, 17092–17100.
90. MacAlpine D.M., Rodriguez H.K., Bell S.P. 2004. Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Dev.* **18**, 3094–3105.
91. Yabuki N., Terashima H., Kitada K. 2002. Mapping of early firing origins on a replication profile of budding yeast. *Genes Cells.* **7**, 781–789.
92. Jeon Y., Bekiranov S., Karnani N., et al. 2005. Temporal profile of replication of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 6419–6424.
93. Hayashi M., Katou Y., Itoh T., et al. 2007. Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *EMBO J.* **26**, 1327–1339.
94. Patel P.K., Arcangioli B., Baker S.P., et al. 2006. DNA replication origins fire stochastically in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 308–316.
95. Shechter D., Gautier J. 2005. ATM and ATR check in on origins: a dynamic model for origin selection and activation. *Cell Cycle.* **4**, 235–238.
96. Zegerman P., Diffley J.F. 2009. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint. *DNA Repair.* **8**, 1077–1088.
97. Nakanishi M., Katsuno Y., Niida H., et al. 2010. Chk1-cyclin A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals. *Chromosome Res.: Internat. J. Mol., Supramol. Evol. Aspects Chromosome Biol.* **18**, 103–113.
98. Marheineke K., Hyrien O. 2004. Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J. Biol. Chem.* **279**, 28071–28081.
99. Shechter D., Costanzo V., Gautier J. 2004. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat. Cell Biol.* **6**, 648–655.
100. Sorensen C.S., Syljuasen R.G., Lukas J., Bartek J. 2004. ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell Cycle.* **3**, 941–945.
101. Miao H., Seiler J.A., Burhans W.C. 2003. Regulation of cellular and SV40 virus origins of replication by Chk1-dependent intrinsic and UVC radiation-induced checkpoints. *J. Biol. Chem.* **278**, 4295–4304.
102. Syljuasen R.G., Sorensen C.S., Hansen L.T., et al. 2005. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3553–3562.
103. Petermann E., Caldecott K.W. 2006. Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *Cell cycle.* **5**, 2203–2209.
104. Petermann E., Maya-Mendoza A., Zachos G., et al. 2006. Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3319–3326.
105. Maya-Mendoza A., Petermann E., Gillespie D.A., et al. 2007. Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J.* **26**, 2719–2731.
106. Santocanale C., Diffley J.F. 1998. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature.* **395**, 615–618.
107. Whitcomb E.A., Taylor A. 2009. Ubiquitin control of S phase: a new role for the ubiquitin conjugating enzyme, UbcH7. *Cell Div.* **4**, 17.
108. Shimada M., Niida H., Zinkelde D.H., et al. 2008. Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell.* **132**, 221–232.
109. Zhang Y.W., Jones T.L., Martin S.E., et al. 2009. Implication of checkpoint kinase-dependent up-regulation of ribonucleotide reductase R2 in DNA damage response. *J. Biol. Chem.* **284**, 18085–18095.
110. Herrick J., Bensimon A. 2008. Global regulation of genome duplication in eukaryotes: an overview from the epifluorescence microscope. *Chromosoma.* **117**, 243–260.
111. Naruyama H., Shimada M., Niida H., et al. 2008. Essential role of Chk1 in S phase progression through regulation of RNR2 expression. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **374**, 79–83.



112. Branzei D., Foiani M. 2005. The DNA damage response during DNA replication. Current opinion in cell biology. **17**, 568–575.
113. Ge X.Q., Jackson D.A., Blow J.J. 2007. Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev.* **21**, 3331–3341.
114. Doksani Y., Bermejo R., Fiorani S., et al. 2009. Replicon dynamics, dormant origin firing, and terminal fork integrity after double-strand break formation. *Cell.* **137**, 247–258.
115. Ge X.Q., Blow J.J. 2010. Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J. Cell Biol.* **191**, 1285–1297.
116. Donaldson A.D., Raghuraman M.K., Friedman K.L., et al. 1998. CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell.* **2**, 173–182.
117. Jackson L.P., Reed S.I., Haase S.B. 2006. Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2456–2466.
118. Yompakdee C., Huberman J.A. 2004. Enforcement of late replication origin firing by clusters of short G-rich DNA sequences. *J. Biol. Chem.* **279**, 42337–42344.
119. Aladjem M.I., Rodewald L.W., Kolman J.L., Wähl G.M. 1998. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science.* **281**, 1005–1009.
120. Lu L., Zhang H., Tower J. 2001. Functionally distinct, sequence-specific replicator and origin elements are required for *Drosophila* chorion gene amplification. *Genes Dev.* **15**, 134–146.
121. Urnov F.D., Liang C., Blitzblau H.G., et al. 2002. A DNase I hypersensitive site flanks an origin of DNA replication and amplification in *Sciara*. *Chromosoma.* **111**, 291–303.
122. Gilbert D.M. 2001. Nuclear position leaves its mark on replication timing. *J. Cell Biol.* **152**, F11–15.
123. Gilbert D.M. 2010. Cell fate transitions and the replication timing decision point. *J. Cell Biol.* **191**, 899–903.
124. Ryba T., Hiratani I., Lu J., et al. 2010. Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res.* **20**, 761–770.
125. Gilbert D.M., Takebayashi S.I., Ryba T., et al. 2010. Space and time in the nucleus: developmental control of replication timing and chromosome architecture. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **75**, 143–153.
126. Heun P., Laroche T., Raghuraman M.K., Gasser S.M. 2001. The positioning and dynamics of origins of replication in the budding yeast nucleus. *J. Cell Biol.* **152**, 385–400.
127. Bridger J.M., Boyle S., Kill I.R., Bickmore W.A. 2000. Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr. Biol.: CB.* **10**, 149–152.
128. Farkash-Amar S., Lipson D., Polten A., et al. 2008. Global organization of replication time zones of the mouse genome. *Genome Res.* **18**, 1562–1570.
129. Hansen R.S., Thomas S., Sandstrom R., et al. 2010. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 139–144.
130. Hiratani I., Ryba T., Itoh M., et al. 2010. Genome-wide dynamics of replication timing revealed by *in vitro* models of mouse embryogenesis. *Genome Res.* **20**, 155–169.
131. Pope B.D., Hiratani I., Gilbert D.M. 2010. Domain-wide regulation of DNA replication timing during mammalian development. *Chromosome Res.* **18**, 127–136.
132. Kerem B.S., Goitein R., Diamond G., et al. 1984. Mapping of DNase I sensitive regions on mitotic chromosomes. *Cell.* **38**, 493–499.
133. Schubeler D., Scalzo D., Kooperberg C., et al. 2002. Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat. Genet.* **32**, 438–442.
134. Woodfine K., Fiegler H., Beare D.M., et al. 2004. Replication timing of the human genome. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 191–202.
135. Norio P. 2006. DNA replication: the unbearable lightness of origins. *EMBO Repts.* **7**, 779–781.
136. Vogelauer M., Rubbi L., Lucas I., et al. 2002. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol. Cell.* **10**, 1223–1233.
137. Bickmore W.A., Carothers A.D. 1995. Factors affecting the timing and imprinting of replication on a mammalian chromosome. *J. Cell Sci.* **108 ( Pt 8)**, 2801–2809.
138. Hiratani I., Gilbert D.M. 2009. Replication timing as an epigenetic mark. *Epigenetics.* **4**, 93–97.
139. Jorgensen H.F., Azuara V., Amoils S., et al. 2007. The impact of chromatin modifiers on the timing of locus replication in mouse embryonic stem cells. *Genome Biol.* **8**, R169.
140. Wu R., Singh P.B., Gilbert D.M. 2006. Uncoupling global and fine-tuning replication timing determinants for mouse pericentric heterochromatin. *J. Cell Biol.* **174**, 185–194.
141. Hayashi M.T., Takahashi T.S., Nakagawa T., et al. 2009. The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus. *Nat. Cell Biol.* **11**, 357–362.
142. Schwaiger M., Kohler H., Oakeley E.J., et al. 2010. Heterochromatin protein 1 (HP1) modulates replication timing of the *Drosophila* genome. *Genome Res.* **20**, 771–780.
143. Tenzen T., Yamagata T., Fukagawa T., et al. 1997. Precise switching of DNA replication timing in the GC content transition area in the human major histocompatibility complex. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4043–4050.
144. Watanabe Y., Tenzen T., Nagasaka Y., et al. 2000. Replication timing of the human X-inactivation center (XIC) region: correlation with chromosome bands. *Gene.* **252**, 163–172.

145. Strehl S., LaSalle J.M., Lalande M. 1997. High-resolution analysis of DNA replication domain organization across an R/G-band boundary. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6157–6166.
146. Norio P., Kosiyatrakul S., Yang Q., et al. 2005. Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development. *Mol. Cell.* **20**, 575–587.
147. Guan Z., Hughes C.M., Kosiyatrakul S., et al. 2009. Decreased replication origin activity in temporal transition regions. *J. Cell Biol.* **187**, 623–635.
148. Guilbaud G., Rappailles A., Baker A., et al. 2011. Evidence for sequential and increasing activation of replication origins along replication timing gradients in the human genome. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002322.
149. Hiratani I., Takebayashi S., Lu J., Gilbert D.M. 2009. Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect—part II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 142–149.
150. Woodfine K., Beare D.M., Ichimura K., et al. 2005. Replication timing of human chromosome 6. *Cell Cycle.* **4**, 172–176.
151. Belyaeva E.S., Goncharov F.P., Demakova O.V., et al. 2012. Late replication domains in polytene and non-polytene cells of *Drosophila melanogaster*. *PloS one.* **7**, e30035.
152. Yaffe E., Farkash-Amar S., Polten A., et al. 2010. Comparative analysis of DNA replication timing reveals conserved large-scale chromosomal architecture. *PLoS Genet.* **6**, e1001011.
153. Ryba T., Hiratani I., Sasaki T., et al. 2011. Replication timing: a fingerprint for cell identity and pluripotency. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1002225.
154. Schubeler D., MacAlpine D.M., Scalzo D., et al. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–1271.
155. Smith Z.E., Higgs D.R. 1999. The pattern of replication at a human telomeric region (16p13.3): its relationship to chromosome structure and gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1373–1386.
156. Schubeler D., Francastel C., Cimborá D.M., et al. 2000. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev.* **14**, 940–950.
157. Cimborá D.M., Schubeler D., Reik A., et al. 2000. Long-distance control of origin choice and replication timing in the human beta-globin locus are independent of the locus control region. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5581–5591.
158. Delgado S., Gomez M., Bird A., Antequera F. 1998. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO J.* **17**, 2426–2435.
159. Kim S.M., Dubey D.D., Huberman J.A. 2003. Early-replicating heterochromatin. *Genes Dev.* **17**, 330–335.
160. Koren A., Tsai H.J., Tirosh I., et al. 2010. Epigenetically-inherited centromere and neocentromere DNA replicates earliest in S-phase. *PLoS Genet.* **6**, e1001068.
161. Weidtkamp-Peters S., Rahn H.P., Cardoso M.C., Hemmerich P. 2006. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase. *Histochem. Cell Biol.* **125**, 91–102.
162. Lande-Diner L., Zhang J., Cedar H. 2009. Shifts in replication timing actively affect histone acetylation during nucleosome reassembly. *Mol. Cell.* **34**, 767–774.
163. Kitsberg D., Selig S., Brandeis M., et al. 1993. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature.* **364**, 459–463.
164. Shufaro Y., Lacham-Kaplan O., Tzuberi B.Z., et al. 2010. Reprogramming of DNA replication timing. *Stem Cells.* **28**, 443–449.
165. Zhang J., Xu F., Hashimshony T., Keshet I., Cedar H. 2002. Establishment of transcriptional competence in early and late S phase. *Nature.* **420**, 198–202.
166. Herrick J. 2011. Genetic variation and DNA replication timing, or why is there late replicating DNA? *Evol.; Internat. J. Organic Evol.* **65**, 3031–3047.
167. Shermoen A.W., McClelland M.L., O'Farrell P.H. 2010. Developmental control of late replication and S phase length. *Curr. Biol.: CB.* **20**, 2067–2077.
168. Belyakin S.N., Babenko V.N., Maksimov D.A., et al. 2010. Gene density profile reveals the marking of late replicated domains in the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma.* **119**, 589–600.
169. Chen C.L., Rappailles A., Duquenne L., et al. 2010. Impact of replication timing on non-CpG and CpG substitution rates in mammalian genomes. *Genome Res.* **20**, 447–457.
170. Weber C.C., Pink C.J., Hurst L.D. 2012. Late-replicating domains have higher divergence and diversity in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 873–882.