

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра медицинской биологии и генетики

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Часть II

ЯДРО КЛЕТКИ. МАТРИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ.
ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМА

Курс лекций для студентов-медиков

Подписано в печать 04.12.19. Усл. печ. л. 4,25.
Формат 60×84 1/16. Электронная библиотека. Заказ № 300/19.
197022, Санкт-Петербург, улица Льва Толстого, 6-8.
РИЦ ПСПбГМУ



Санкт-Петербург
РИЦ ПСПбГМУ
2019

УДК 576.3
ББК 28.05
М75

Авторы:

**М.А. Корженевская, Л.Е. Анисимова, В.П. Болонина, Е.В. Карпова,
С.В. Розенфельд, Е.Ф. Того, Н.Н. Степанов**

Рецензент:

д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ПСПбГМУ
им. И.П. Павлова **В.Л. Быков**

Утверждено на заседании ЦМК морфологических дисциплин. Протокол №2
от 24.09.2019 г.

Молекулярная биология и патология клетки : курс лекций для
студентов медицинских вузов. В 4-х ч. / М.А. Корженевская [и др.]. —
Часть II. Ядро клетки. Матричные процессы. Характеристика генома. —
СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2019. — 68 с.

Данное пособие представляет собой дополненное и исправленное издание курса лекций по молекулярной биологии клетки, который читают студентам-первокурсникам в первом семестре на кафедре медицинской биологии и генетики. В нем освещен круг вопросов, касающихся молекулярных основ клеточной биологии и молекулярных причин патогенеза некоторых заболеваний человека. С учетом новейших достижений в области молекулярной биологии в пособии изложены современные представления о строении и функциях поверхностного аппарата клетки, клеточных органоидов и ядра, матричных процессах. В пособии дана характеристика генома человека, описаны структура и уровни регуляции работы генов, клеточный цикл и способы деления клеток, апоптоз, молекулярные основы канцерогенеза, а также ранние этапы эмбрионального развития и его генетический контроль. Особое внимание уделено описанию на клеточном и молекулярном уровнях причин некоторых заболеваний человека, таких как – лизосомальные болезни накопления, митохондриальную патологию, инсулинзависимый и независимый диабет, синдром тестикулярной феминизации, серповидно-клеточную анемию, различные формы талассемий и др.

Разделы и главы пособия составлены в соответствии с учебной программой, логично и последовательно, знакомство с ними является необходимым условием для последующего освоения специальных профильных клинических дисциплин.

© РИЦ ПСПбГМУ, 2019

Оглавление

Список сокращений.....	4
1. Ядерный аппарат клетки	5
1.1. Поверхностный аппарат ядра	5
1.2. Кариоплазма	7
1.3. Ядерный матрикс	8
1.4. Хроматин и уровни его организации.....	8
1.5. Структура ДНК и РНК	11
2. Функции ядра. Матричные процессы	15
2.1. Репликация ДНК	15
2.2. Генетический код	19
2.3. Транскрипция	20
2.4. Структура инициаторов	22
2.5. Процессинг и-РНК	23
2.6. Трансляция	26
3. Характеристика гена и генома	30
4. Регуляция экспрессии генов	41
4.1. Претранскрипционный уровень	42
4.2. Механизм инактивации X-хромосомы	46
4.3. Транскрипционный уровень	48
4.4. Посттранскрипционный уровень	50
4.4.1. Альтернативная деградация РНК	51
4.4.2. Альтернативный сплайсинг	52
4.4.3. Альтернативное редактирование	53
4.5. Трансляционный уровень	54
4.6. Посттрансляционный уровень	56
5. Репарация	58
5.1. Способы эксцизионной репарации в клетках млекопитающих.....	59
5.1.1. Эксцизионная репарация оснований (BER).....	60
5.1.2. Репарация несовершенных или неправильно спаренных оснований (mismatch repair, MMR)	62
5.1.3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER).....	62
5.2. Система репарации двухцепочечных разрывов.....	64
5.3. SOS-репарация.....	64
Литература	67

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	— антигены
АТФ	— аденозинтрифосфат
АРП	— автономно-реплицирующиеся последовательности
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИНИ-I	— инициаторы I типа
МГЭ	— мобильные генетические элементы
МТ	— метилтрансфераза
ОСС	— опорно-сократительная система
ПАК	— поверхностный аппарат клетки
ПВК	— пировиноградная кислота
ПЛ	— плазмолемма
ПОМК	— проопиомеланокортин
ППП	— периферическая плотная пластина
СОСА	— субмембранный опорно-сократительный аппарат
ЭПС	— эндоплазматическая сеть

1. ЯДЕРНЫЙ АППАРАТ КЛЕТКИ

Ядерный аппарат, или **ядро**, клетки представляет собой целостную сложную субсистему, включающую в себя несколько основных компонентов: поверхностный аппарат, кариоплазму, ядерный матрикс и хроматин.

К функциям ядерного аппарата относятся хранение, воспроизведение, реализация и восстановление (репарация) генетической информации.

1.1. Поверхностный аппарат ядра

Поверхностный аппарат ядра, или кариотека, состоит из ядерной оболочки, поровых комплексов и периферической плотной пластины (ламина).

Ядерная оболочка образована наружной и внутренней мембранами, между которыми находится перинуклеарное пространство.

Наружная мембрана является продолжением мембраны шероховатой эндоплазматической сети, поэтому на ее поверхности обнаруживаются рибосомы, а перинуклеарное пространство, в свою очередь, сообщается с полостью шероховатой ЭПС (рис. 1).

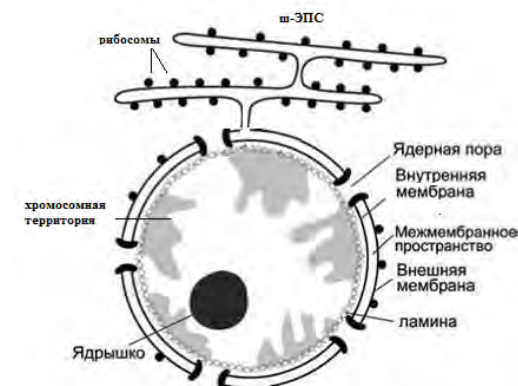


Рис. 1. Строение ядра.

Обе мембраны ядерной оболочки имеют жидкостно-мозаичное строение, характеризуются низким содержанием холестерина и кардиолипина,

а также включают мембранные белки, функционирующие в качестве переносчиков, рецепторов и ферментов. Белки, расположенные в наружной мембране, связаны с цитоскелетом и белками внутренней мембраны, которые поддерживают форму ядра, участвуют в организации хроматина, в репарации и контроле транскрипции. Ядерная оболочка выполняет функцию разделения внутриядерного содержимого от цитоплазмы, формируя отдельный компартмент клетки для хранения и реализации генетической информации.

В некоторых участках наружная и внутренняя мембраны сливаются и образуют поры диаметром до 100 нм. Поры заполнены ядерными поровыми комплексами из белков-нуклеопоринов, которые формируют три белковых кольца: цитоплазматическое, мембранное и ядерное. Каждое кольцо состоит из восьми белковых субъединиц, имеющих гидрофобные участки для закоривания в билипидном слое. Между кольцами расположены восемь белковых спиц (колонн), закрепляющих их в мембране. От белковых колец внутрь порового комплекса отходят белковые фибриллы, образующие «ловчие сети», которые обеспечивают избирательную проницаемость ядерной поры. Кроме того, фибриллярные белки, обращенные в гиалоплазму, связываются с компонентами СОСА, а другие, обращенные в ядро, образуют «ядерную корзину». Через поровые комплексы осуществляется транспорт веществ из ядра в цитоплазму и обратно. Ионы, АТФ, нуклеотиды, мелкие и средние органические молекулы могут относительно свободно диффундировать через поровые комплексы.

Из ядра в цитоплазму транспортируются субъединицы рибосом и различные виды РНК (т-РНК, м-РНК и тРНК) с помощью специальных белков-экспортинов, которые содержат определенную аминокислотную последовательность — сигнал ядерного экспорта, взаимодействующий с разными РНК и способствующий их прохождению через «ловчую сеть».

В ядро из гиалоплазмы транспортируются нуклеофильные белки, например, гистоны. Более крупные белки-ферменты: полимеразы, факторы транскрипции и рибосомные белки могут проходить через пору только, если они имеют «сигнал ядерной локализации». С помощью такого сигнала ферменты взаимодействуют с белком-импортином, который обеспечивает их проникновение сквозь фибриллы порового комплекса.

Белки, содержащие две последовательности сигналов импорта и экспорта, например, регуляторы биологических часов, могут перемещаться через поровые комплексы в разных направлениях с помощью специальных ферментов — Ran-ГТФаз.

Кроме транспортной функции, ядерные поровые комплексы принимают участие в регуляции транскрипции.

Под внутренней мембраной ядерной оболочки в клетках животных располагается ламина, или периферическая плотная пластина (ППП), образованная фибриллярными белками — ламинами А, В, и С. Ламина обеспечивает структурную связь между ядром и цитоскелетом через белковый комплекс LINC, включающий белки внутренней и наружной ядерной мембраны, которые пронизывают перинуклеарное пространство.

Структурная функция ламины заключается в поддержании формы ядра, а также в укладке или пространственной организации хромосом, которые прикрепляются к белкам ламины, образуя ламин-ассоциированные районы. Точки прикрепления хромосом характеризуются низкой плотностью генов и низким уровнем их экспрессии. Таким образом, ламина регулирует организацию генома и структуру хроматина как за счет прямого взаимодействия с ними, так и опосредованно через взаимодействие с регуляторными белками. Ламина может регулировать работу генов за счет накопления транскрипционных факторов вблизи внутренней мембраны.

Известны мутации в гене ламина А (LMNA), которые приводят к возникновению наследственного заболевания — прогерии Хатчинсона-Гилфорда, или синдрома ускоренного старения. Дефект гена LAMIN A/C, кодирующего белок-преламин А («прогерин»), который является предшественником зрелых форм ламин А и С, приводит к нарушению процесса преамина А и его накоплению в клетке. У больных ядерные оболочки клеток сморщиваются, ядра приобретают неправильную форму, клетки не могут нормально делиться, организм перестает расти, теряет способность заменять отмирающие клетки новыми, что и приводит к ускоренному старению и снижению продолжительности жизни. Описаны мутации в гене ламина А, приводящие к кардиомиопатии.

1.2. Кариоплазма

Это внутренняя среда ядра, представляющая водный раствор органических веществ и ионов. В ней содержатся ядерный матрикс, хроматин, ферменты гликолиза и другие белки, например, белок-убиквитин, который участвует в нелизосомальном расщеплении белков.

Кариоплазма создает специфическую среду, необходимую для протекания матричных процессов.

1.3. Ядерный матрикс

Ядерный матрикс включает разнообразные белки: структурные — актин и коллаген, которые совместно с белками ламины поддерживают форму ядра и составляют кариоскелет, белки-ферменты, регуляторные белки матричных процессов и белки, участвующие в организации хроматина. В ядерном матриксе выделяют ядрышковую и интерхроматиновую сеть.

Ядрышковая сеть (ядрышко) образована из фибриллярных и гранулярных компонентов.

Фибриллярный компонент представлен участками хромосом, имеющих вторичную перетяжку или ядрышковый организатор, в котором локализованы множественные копии генов р-РНК; с этих генов постоянно происходит транскрипция и образуются копии р-РНК, взаимодействующие с рибосомальными белками (р-белки), транспортированными из цитоплазмы. Объединение р-РНК и р-белков приводит к формированию больших и малых рибосомальных субъединиц, которые и составляют гранулярный компонент ядрышковой сети. Интерхроматиновая сеть участвует в пространственной организации хроматина, в частности в его компактизации и регуляции активности генов. Белковые компоненты этой сети обеспечивают формирование хромомерного уровня организации хроматина, отвечая за присоединение к последнему соответствующих ферментов в точках инициации матричных процессов.

Таким образом, ядерный матрикс обеспечивает пространственную организацию хроматина, участвует в образовании ядрышка и инициирует матричные процессы.

1.4. Хроматин и уровни его организации

Хроматин представляет собой комплекс ДНК и белков-гистонов, или дезоксирибонуклеопротеид. Из хроматина построены хромосомы.

Белки-гистоны являются важной составной частью хроматина, поскольку обладают щелочными (основными) свойствами и хорошо взаимодействуют с ДНК. В настоящее время известны 5 главных видов гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3, Н4, которые в хроматине содержатся в соотношении 1:2:2:2:2 соответственно. Поскольку длина всех молекул ДНК, выделенных из одной клетки, достигает примерно 1,7 метра, а величина отдельных хромосом составляет до 8,5 см, то в ядре ДНК укорачивается

путем ее спирализации и компактизации за счет взаимодействия с гистонами и белками ядерного матрикса. На этой основе формируется три универсальных уровня пространственной организации хроматина: нуклеосомный, нуклеомерный, хромомерный.

Нуклеосомный уровень характеризуется образованием белковых коровых частиц, которые образованы 8 молекулами разных гистонов (Н2А, Н2В, Н3, Н4х2). Коровая частица взаимодействует с участком ДНК величиной примерно 145–146 п.н. (рис. 2). При этом ДНК оборачивается вокруг нуклеосомы примерно 1,5 раза и закрепляется с помощью гистона Н1. Одновременно с ДНК взаимодействует много коровых частиц и поэтому образуется нуклеосомная нить толщиной около 12,5 нм, которая выглядит как ряд бусинок (нуклеосом), соединенных нитью (линкерной ДНК). За счет нуклеосомного уровня организации ДНК укорачивается примерно в 7 раз, что не препятствует использованию ДНК в качестве матрицы для синтеза копий.

Концевые домены положительно заряженных гистонов Н1 взаимодействуют между собой, сближая соседние нуклеосомы, что приводит к формированию нуклеомерного уровня организации хроматина. Взаимодействие гистонов Н1 между собой становится возможным только после их фосфорилирования. Группы из 4–12 нуклеосом образуют нуклеомеры, и ДНК вследствие этого укорачивается примерно в 40 раз, т.е. происходит еще большая компактизация хромосом, особенно во время деления и образования хроматид. Нуклеомерный уровень организации хроматина препятствует участию ДНК в репликации и транскрипции.

Хромомерный уровень организации формируется за счет укладки петлями нуклеомерного хроматина вокруг белков интерхроматиновой сети, ядерного матрикса и ламины, что приводит к образованию хромомера в виде розеток.

На этом уровне организации хроматиновые нити имеют толщину около 300 нм и компактизованы уже в 1000 раз.

Все три уровня организации хроматина взаимосвязаны и при определенных условиях могут переходить друг в друга. То есть, нуклеомерный

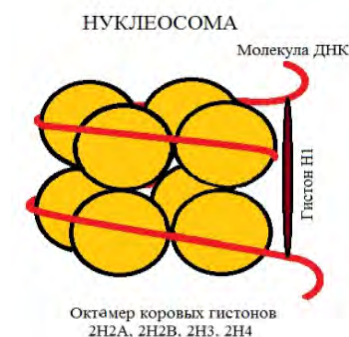


Рис. 2. Нуклеосомный уровень организации хроматина

хроматин одной петли хромомеры может переходить на нуклеосомный уровень, и тогда гены, локализованные в этой петле ДНК, становятся активными, без нарушения хромомерной организации остального хроматина (рис. 3).

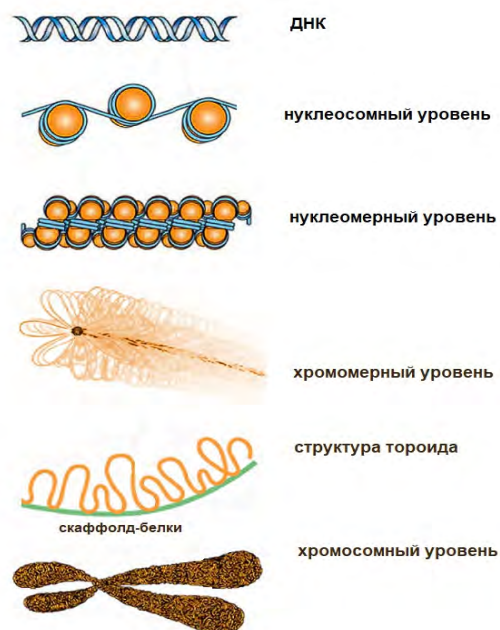


Рис. 3. Уровни пространственной организации хроматина

Хромосомы в течение интерфазы распределены не случайным образом, а образуют хромосомные территории, то есть каждая занимает ограниченный ядерный субдомен. Под световым микроскопом в ядрах большинства клеток видны хромосомы в виде структуры тороида, петли которого уложены вдоль специальных скаффолд-белков.

Основная масса хроматина имеет бледную окраску за счет слабого поглощения красителя и называется эухроматином. Другая его часть окрашивается более интенсивно, имеет более темную окраску и называется гетерохроматином. Интенсивность окрашивания эу- и гетерохроматина зависит от степени спирализации, а последняя, в свою очередь, отражает

функциональную активность хроматина. Поскольку эухроматин имеет невысокую степень спирализации, то может служить матрицей для синтеза РНК, т.к. содержит активные гены. Гетерохроматин сильно спирализован и может переходить в эухроматин путем деспирализации и участвовать в транскрипции. Такой гетерохроматин называют функциональным (факультативным).

Гетерохроматин, не способный к транскрипционной активности, выполняет только структурную функцию, образуя центромерные и теломерные районы хромосом. Деспирализация хроматина является одним из способов регуляции экспрессии генов.

1.5. Структура ДНК и РНК

Определение химической структуры и пространственной организации молекул ДНК явилось одним из самых ярких открытий XX века. В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик на основании рентгеноструктурного анализа кристаллов ДНК, выполненного Розалин Франклин, предложили модель, в соответствии с которой ДНК состоит из двух взаимозакрученных полимерных цепей, образующих форму правосторонней двойной спирали (рис. 4).

Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, 5-углеродного сахара дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. Таким образом, цепь ДНК представляет собой последовательность нуклеотидов (рис. 5).

Различают пиримидиновые и пуриновые азотистые основания.

К пиримидинам относятся *тимин*, *цитозин* и *урацил*, а к пуринам — *аденин* и *гуанин*. Урацил входит в состав рибонуклеиновых кислот (РНК) вместо тимина. Нуклеотиды соединяются между собой в пределах одной цепи посредством фосфодиэфирных связей между сахаром-дезоксирибозой и остатком фосфорной кислоты, которые образуют остов каждой полимерной цепи.

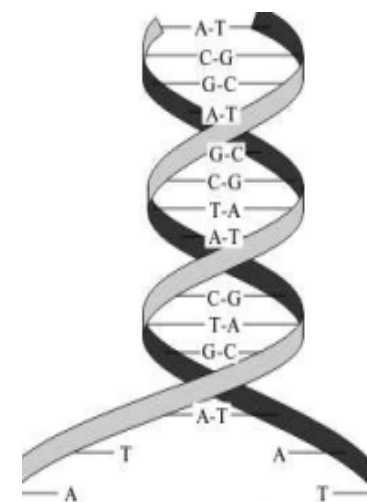


Рис. 4. Двойная спираль ДНК

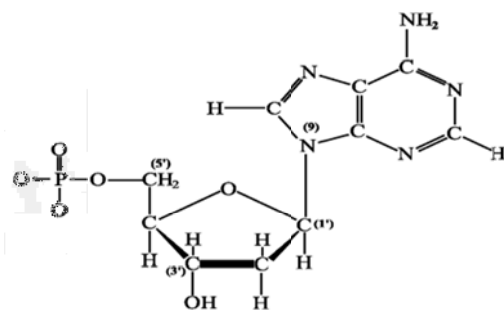


Рис. 5. Строение нуклеотида

Азотистые основания нуклеотидов обращены внутрь двойной спирали, располагаясь плоскопараллельно один над другим. Две цепи ДНК удерживаются вместе за счет водородных связей между нуклеотидами противоположных или антипараллельных цепочек. Две водородные связи образуются между аденином и тиминном и три — между гуанином и цитозинном. Это правило А–Т, G–С называется принципом комплементарности, которое обусловлено пространственным соответствием азотистых оснований по типу «ключ–замок». С помощью водородных связей достигается стабильность двойной спирали. Молярное содержание аденина равно молярному содержанию тимина, содержание гуанина — цитозину, таким образом, количество пуринов равно количеству пиримидинов. Молярное равенство пуринов и пиримидинов называют правилом Э. Чаргаффа. Каждая нить ДНК имеет форму спирали, и при их объединении образуется двойная спираль (рис. 6).

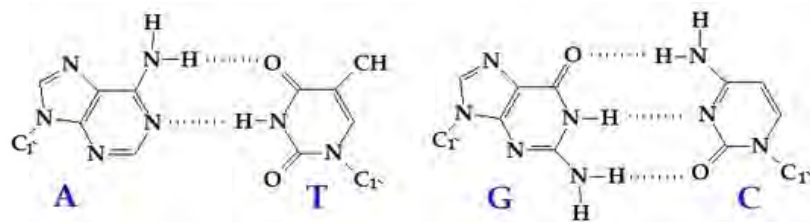


Рис. 6. Принцип комплементарности и образование водородных связей

Один оборот двойной спирали ДНК включает 10 пар нуклеотидов. В зависимости от положения атомов углерода в остатке дезоксирибозы

выделяют 5'- и 3'-концы ДНК. Цепи ДНК в двойной спирали антипараллельны друг другу, т.е. ориентированы в противоположных направлениях: одна цепь имеет направление от 5' к 3', а другая — от 3' к 5'. Цифры 3' и 5' соответствуют номерам атомов углерода в молекуле сахара, по которым может происходить присоединение следующего нуклеотида в полинуклеотидной цепи.

Поскольку связи между нуклеотидами в двойной спирали ДНК водородные, то они легко рвутся даже при относительно небольшом нагревании. Такой нормальный физиологический процесс называется **денатурацией**, или **плавлением ДНК**. При восстановлении температурных условий происходит восстановление водородных связей по правилу комплементарности с образованием двойной спирали ДНК. Этот процесс называется **ренатурацией**, или **гибридизацией**.

Длина молекул ДНК измеряется в парах нуклеотидов (п.н.) или, точнее, в парах оснований (п.о.), тысячах пар оснований — килобазах (кб) и миллионах пар оснований — мегабазах (мб). Эта длина может варьировать от нескольких нуклеотидов до десятков и даже сотен миллиардов пар оснований.

Суммарная длина молекулы ДНК человека составляет $3,2 \times 10^9$ п.о. Основная масса ДНК эукариот находится в ядрах клеток в составе хромосом в суперскрученном состоянии за счет взаимодействия с гистонами и другими белками хромосом. Около 1 % ДНК находится в митохондриях — самых крупных органоидах клетки.

К нуклеиновым кислотам относятся и разные классы РНК. Они представлены одноцепочечными полимерными молекулами из четырех типов рибонуклеотидов — аденинового, гуанинового, урацилового и цитозинового, в состав рибонуклеотидов входит пятиуглеродный сахар — рибоза.

РНК чаще функционируют в виде однонитевых структур, хотя они и способны образовывать двунитевые участки с использованием принципа комплементарности.

Различают несколько классов РНК: информационные, или матричные (и-РНК), несущие генетическую информацию о строении белков; рибосомальные (р-РНК), входящие в состав рибосом; транспортные (т-РНК), переносящие аминокислоты к месту синтеза белка; малые ядерные (мя-РНК), участвующие в процессе сплайсинга; микро-РНК, регулирующие трансляцию; piwi-РНК, участвующие в инактивации мобильных генетических элементов; и большую группу длинных некодирующих РНК с различными функциями.

Все классы РНК образуются на матрице ДНК в процессе транскрипции. Два фундаментальных свойства отличают нуклеиновые кислоты от других типов молекул. Во-первых, молекулы ДНК способны к самовоспроизведению в процессе репликации, осуществляемой ферментом *ДНК-полимеразой*. Во-вторых, ДНК является носителем генетической информации, записанной в виде последовательности нуклеотидов и определяющей разнообразие всех форм жизни.

2. ФУНКЦИИ ЯДРА. МАТРИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Главной функцией ядерного аппарата является обеспечение и регуляция потока генетической информации, заложенной в ДНК хромосом. В ядре происходит хранение, воспроизведение, рекомбинация, репарация и первые этапы реализации генетической информации.

Биомолекулярным механизмом реализации генетической информации являются матричные процессы, к которым относятся: репликация — синтез или удвоение ДНК; транскрипция — синтез РНК; трансляция — синтез белка.

Матричный процесс — это процесс копирования основы или матрицы, при котором первичная структура матрицы однозначно определяет первичную структуру копии. Для всех матричных процессов необходимы ферменты, белковые факторы и энергия АТФ. Репликация, транскрипция, репарация и рекомбинация происходят в ядре, а трансляция — в цитоплазме.

2.1. Репликация ДНК

Репликация — это процесс удвоения молекулы ДНК, в результате которого образуются ее две дочерние молекулы — копии материнской. Синтез ДНК происходит на определенных участках, которые называются репликонами и в которых определяются точки инициации репликации. Инициация репликации начинается в автономно-реплицирующихся последовательностях (АРП). Их размер составляет от 70 до 500 пар нуклеотидов, причем они богаты содержанием А-Т пар (до 80 %). Каждая линейная молекула ДНК содержит несколько репликонов, и ее удвоение имеет полирепликонный характер, что существенно увеличивает скорость репликации, но их активация может происходить неодновременно.

Репликация ДНК происходит в ядре в синтетическом периоде (S) клеточного цикла с помощью фермента ДНК-полимеразы по односторонней матрице. Кроме ДНК-полимеразы, в синтезе ДНК участвуют многие другие ферменты и белки (всего их около сорока), которые образуют комплекс, названный реплисомой. Последняя включает: ДНК-геликазу, стабилизирующие белки, ДНК-полимеразы праймазу, эндонуклеазу, ДНК-лигазу.

В ходе инициации фермент ДНК-геликаза разрывает водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями противоположных цепочек (или нитей) ДНК. При этом двойная спираль ДНК расплетается, образуя репликационную вилку, в которой каждая цепочка служит матрицей для комплементарного синтеза новых цепочек ДНК (рис. 7).

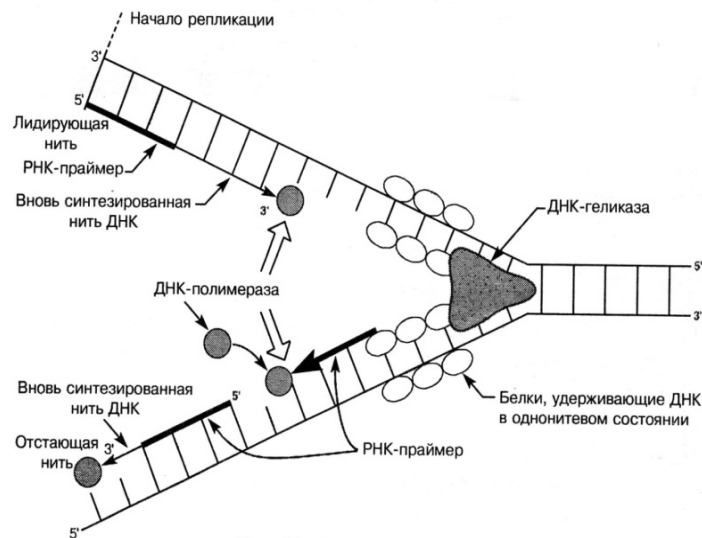


Рис. 7. Репликация ДНК

Особые белки стабилизируют репликационную вилку, удерживая однонитевые участки ДНК, для предотвращения возможности восстановления водородных связей и скручивания ДНК. Далее происходят этапы элонгации, или удлинения, дочерних цепей ДНК и терминация репликации.

Главным ферментом удвоения ДНК на этапе элонгации являются ДНК-полимеразы, причем различают пять видов подобных ферментов ДНК-полимеразы: α , β , γ , δ , ϵ .

Особенностью ферментов полимераз является их неспособность иницировать репликацию и образовывать фосфодиэфирную связь между первым и вторым нуклеотидом. Подобной способностью обладает другой фермент — праймаза, обладающий РНК-полимеразной активностью. Праймаза по матричной 3'-5' цепи ДНК строит короткую комплементарную цепочку РНК (праймер) размером до 100 нуклеотидов. К образовавшемуся гибри-

дному участку двойной спирали ДНК-РНК присоединяется фермент ДНК-полимераза- α , которая далее ведет синтез ДНК. Затем присоединяется другая ДНК-полимераза- ϵ , которая ведет синтез новой цепи ДНК, комплементарной 3'-5'-старой цепи. По антипараллельной цепочке 5'-3' репликация также начинается с построения праймера, но идет в обратном направлении с помощью еще одной ДНК-полимеразы- δ . По мере расплетения двойной спирали синтез ДНК по матричной цепи 3'-5' будет продолжаться непрерывно, а по второй матричной цепи 5'-3' — прерывисто в связи с необходимостью построения новых праймеров. В дальнейшем праймеры удаляются путем их вытеснения, а их места застраиваются короткими отрезками ДНК. Синтез ДНК на матричной цепи 5'-3' отстает по времени от синтеза на второй матричной цепи 3'-5', поэтому цепочку 3'-5' называют лидирующей, а 5'-3' — запаздывающей. Вытесненные праймеры затем расщепляются с помощью фермента эндонуклеазы (FEN1), а все фрагменты 5'-3' запаздывающей цепи ДНК, получившие название фрагментов Оказаки, сшиваются в единую цепь ферментом ДНК-лигазой. Нарушение работы эндонуклеазы может приводить к увеличению (экспансии) количества некоторых микросателлитных последовательностей, как правило, тринуклеотидных повторов, что может явиться причиной развития болезней экспансии, например хореи Гентингтона, синдрома Мартина — Белла (синдром ломкой X-хромосомы).

Необходимо отметить, что особый механизм репликации имеют концевые участки хромосом — теломеры. Поскольку при образовании и удалении праймеров 5'-конца одноцепочечных копий ДНК (теломеры) остаются недореплицированными, то после каждого цикла репликации хромосомы должны укорачиваться. Теломеры хромосом представлены высокоповторяющимися последовательностями (TTAGGG), не содержащими генетической информации о структуре РНК и белков. Поэтому утрата небольших участков теломер не становится для клетки фатальной, однако укорочение теломерной ДНК ограничивает число клеточных делений. Механизм, предотвращающий укорочение теломерной ДНК, обусловлен работой особого фермента теломеразы, содержащего в своем составе участок РНК с повтором нуклеотидов AAUCCC (рис. 8). Теломераза работает как обратная транскриптаза, используя в качестве матрицы для построения теломерной ДНК комплементарную РНК. Кроме того, теломераза обеспечивает «место» для присоединения ДНК-полимеразы. Предварительно недореплицированный одноцепочечный теломерный участок ДНК защищается от разрушения нуклеазами особым белковым комплексом, либо внедрением одноцепочечного 3'-конца в двуцепочечный участок ДНК с образованием Т-петли.

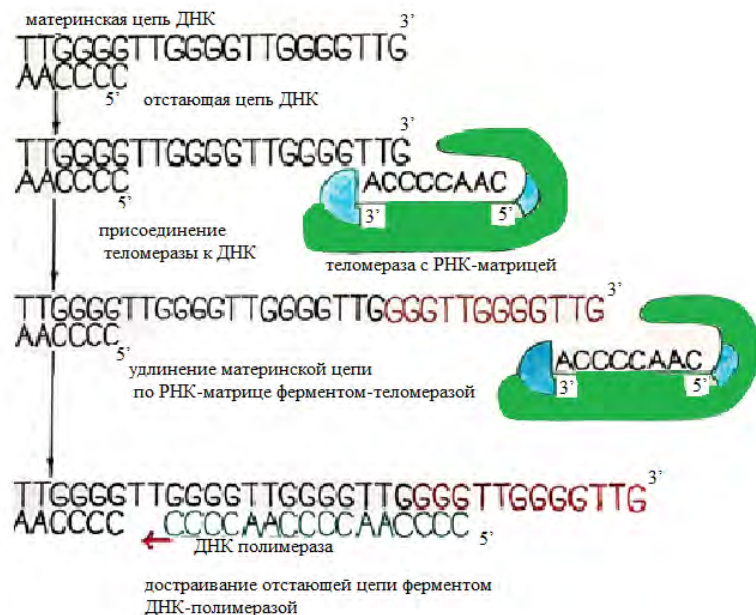


Рис. 8. Репликация теломерной ДНК

В многоклеточном организме содержатся недифференцированные или незрелые клетки, способные делиться и дифференцироваться с образованием специализированных клеток различных тканей. К ним относят первичные половые клетки, стволовые клетки крови и эпителия. В них и обнаруживается фермент теломераза, синтезирующий вторую цепь теломерной ДНК и таким образом поддерживающий постоянный размер теломерного района хромосом.

Известно, что раковые клетки отличаются от нормальных непрерывным делением и неограниченным ростом. Клетки примерно 90 % раковых опухолей обладают высокой теломеразной активностью, поэтому логично предположить, что этот фермент должен быть перспективной мишенью для противораковых средств.

В настоящее время стало известно, что клетки способны сохранить постоянный размер теломер не только с помощью теломеразы. Так, примерно в 10 % раковых клеток, не обладающих теломеразной активностью, размер концевых участков хромосом при делении поддерживается

другим альтернативным механизмом. В его основе лежат процессы рекомбинации гомологичных последовательностей ДНК, чаще всего — участков длинных теломерных повторов.

2.2. Генетический код

На ДНК с помощью генетического кода записана наследственная информация о строении белков. Генетический код представляет собой различные комбинации четырех нуклеотидов, при этом три рядом стоящие нуклеотида ДНК являются кодирующим триплетом, или кодоном. Генетический код является универсальным, триплетным, вырожденным, неперекрывающимся, коллинеарным или линейным (табл. 1).

Таблица 1. Генетический код

Первое основание	Второе основание			
	U	C	A	G
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA ochre UAG amber	UGU Cys UGC Cys UGA opal UGG Trp
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly

Количество возможных сочетаний из четырех нуклеотидов по три в одном кодоне составляет 4^3 или 64 триплета, что является достаточным числом для кодирования 20 аминокислот, входящих в состав белков.

Триплеты в ДНК расположены в линейном порядке, и поэтому их последовательность строго соответствует последовательности аминокислот в белке. Такое свойство генетического кода называется коллинеарность. Каждый нуклеотид может входить только в один кодон и не может читаться в составе соседнего кодона, что характеризует непрерывность генетического кода.

Из 64 вариантов кодонов 61 кодон кодируют 20 аминокислот, причем все аминокислоты, за исключением метионина и триптофана, кодируются несколькими вариантами триплетов. Такое свойство генетического кода называется вырожденностью, или избыточностью. Кодон AUG на и-РНК соответствует аминокислоте метионину, но одновременно он же является инициатором трансляции, поэтому синтез всех белков начинается с включения в него метионина, который затем может отщепляться от готовых полипептидов. Вариации триплетов, кодирующих одну и ту же аминокислоту, называют кодонами-синонимами, или синонимичными триплетами, обычно различающиеся между собой только по третьему нуклеотиду.

Три особых кодона (amber, ochre, и opal: UAG, UAA, и UGA) называют стоп-кодонами, или нонсенс-кодонами, поскольку они являются сигналами прекращения процесса трансляции и свидетельствуют об окончании смысла генетической информации.

2.3. Транскрипция

Первым этапом реализации генетической информации является транскрипция, т.е. синтез всех возможных видов молекул РНК по матрице ДНК. Транскрипция происходит в ядре и осуществляется с помощью фермента РНК-полимеразы, работающего по принципу комплементарности, но при построении РНК напротив аденина вместо тимина в полинуклеотидную цепь включается урацил.

Участки молекулы ДНК, которые транскрибируются, называют структурными генами, а участки ДНК, которые не транскрибируются, но регулируют процесс синтеза РНК, — регуляторными генами (или регуляторными элементами). Регуляторными генами являются инициаторы, терминаторы и модуляторы. Инициаторы содержат в своем составе промотор и обычно располагаются перед структурным геном. Промоторы узнаются РНК-полимеразой и связываются с ней, отвечая за начало транскрипции. Терминаторы расположены в конце структурных генов и контролируют

окончание синтеза РНК, который идет по одной из двух цепочек ДНК. Копируемую цепь (3'-5') называют транскрибируемой.

Присоединение РНК-полимеразы к промотору осуществляется с помощью регуляторных белков, называемых транскрипционными факторами. Образующийся белковый комплекс обладает геликазной активностью и способен к локальной деспирализации ДНК с разрывом водородных связей. Благодаря этому на этапе инициации транскрипции формируется так называемый транскрипционный «глазок». РНК-полимераза синтезирует 5'-3'-нить РНК по матрице ДНК, при этом в транскрипционном глазке формируется гибридная двуцепочечная молекула, состоящая из ДНК и РНК (рис. 9).

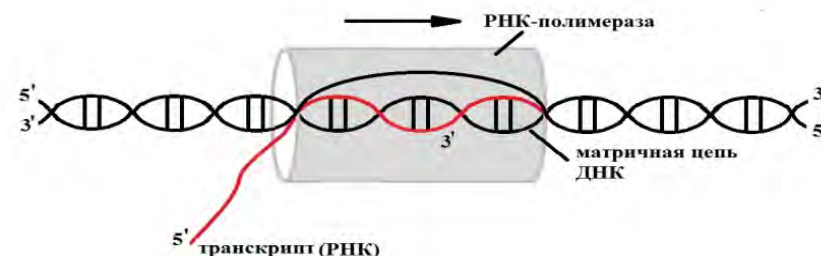


Рис. 9. Транскрипция

ДНК–РНК гетеродуплекс очень неустойчив, так как связь между ними менее прочная, чем между ДНК–ДНК. По этой причине синтезированная РНК вытесняется из транскрипционного глазка, и двойная спираль ДНК восстанавливается. Транскрипционный глазок при этом не увеличивается, а передвигается вместе с РНК-полимеразой, сохраняя свой размер относительно постоянным.

Терминация транскрипции у эукариот осуществляется с помощью двух видов терминаторов — олигоадениловых и палиндромных, которые могут взаимодействовать с белковыми факторами терминации. Олигоадениловые терминаторы содержат в составе смысловой цепи несколько адениловых нуклеотидов, поэтому при образовании РНК в соответствии с принципом комплементарности в ее состав включаются урациловые нуклеотиды (олиго U). Водородные связи между А и U очень слабые, поэтому происходит быстрое вытеснение 3'-конца синтезированной РНК из транскрипционного глазка. Дальнейшее продолжение транскрипции становится невозможным, что означает ее окончание или терминацию.

Палиндромные терминаторы содержат в смысловой цепи две взаимодополнительные последовательности (ТТТААА), которые способны образовывать «шпильки» за счет водородных связей между аденином и тиминном, что делает невозможным дальнейшее продвижение РНК-полимеразы.

У эукариот обнаружено три типа РНК-полимераз (РНК-ПОЛ I, II, III), которые могут взаимодействовать с тремя разными инициаторами и образовывать все возможные виды РНК (и-РНК, т-РНК, р-РНК, мя-РНК и др.). РНК-полимераза-I взаимодействует с инициатором I, который обеспечивает транскрипцию 45S рибосомальной РНК. РНК-полимераза-II взаимодействует с инициатором II, который обеспечивает синтез информационных РНК и большинства малых ядерных РНК. РНК-полимераза-III взаимодействует с инициаторами III и IIIA. Инициатор III обеспечивает синтез всех транспортных РНК, а инициатор IIIA — малой рибосомальной РНК-5S р-РНК. Терминация транскрипции у эукариот сопряжена с разрезанием и полиаденилированием и-РНК, а также с процессингом т- и р-РНК.

2.4. Структура инициаторов

Инициаторы I типа (ИНИ-I) имеют в своем составе две специфические последовательности нуклеотидов длиной около 50 п.о. (дистальный и центральный элементы промотора — ДЭП и ЦЭП). С ДЭП взаимодействует ряд регуляторных белков и транскрипционных факторов, которые способствуют присоединению РНК-полимеразы-I к промотору и точному началу транскрипции с первого значащего кодона. ИНИ-I не взаимодействует с нуклеосомно организованной ДНК и всегда находится в активном состоянии. РНК-ПОЛ I работает в ядрышке, с ее помощью синтезируется 45S р-РНК.

Инициаторы II типа (ИНИ-II) содержат (могут содержать или часто содержат) универсальный промоторный элемент — последовательность нуклеотидов, богатую тиминном и аденином — ТАТААА или ТАТА-бокс, который находится на транскрибируемой цепи ДНК и определяет точку начала синтеза РНК.

ИНИ-II связываются с транскрипционными факторами, содержащими ТАТА-связывающий белок. С образовавшимся комплексом взаимодействует РНК-ПОЛ II, начинающая синтез и-РНК.

Инициаторы III типа (ИНИ-III) располагаются непосредственно в матрице транскрипции. Они состоят из двух частей — бокса А и бокса В, каждый размером по 10 п.о., которые находятся на расстоянии 32 нуклеоти-

дов друг от друга. При этом бокс А располагается на расстоянии 7 нуклеотидов от точки начала транскрипции. С боксами А и В взаимодействуют транскрипционные факторы (ТФ): ТФ ШС, являющийся крупным белком из 6 полипептидов, и ТФ ШВ, содержащий ТАТА-связывающий белок. После этого к образовавшемуся сложному комплексу транскрипционных факторов присоединяется РНК-полимераза-III и начинается синтез т-РНК.

Транскриптоны с ИНИ IIIA, включающие матрицы для 5S р-РНК, содержат бокс С — последовательность нуклеотидов, расположенную на расстоянии примерно 80 нуклеотидов от точки начала транскрипции. С боксом С связываются транскрипционные факторы IIIA, ШВ и ШС, участвующие в инициации транскрипции т-РНК, после чего присоединяется ПОЛ-III и начинается синтез 5S р-РНК.

В ходе синтеза РНК происходит дезинтеграция нуклеосом на две полунуклеосомы. Структура нуклеосом восстанавливается сразу после вытеснения РНК из транскрипционного глазка.

Молекулы РНК, которые образуются в результате транскрипции, называются пре-РНК, или первичный РНК-транскрипт. В дальнейшем он подвергается процессингу, или созреванию. Процессинг пре-РНК включает в себя концевые модификации и сплайсинг.

2.5. Процессинг и-РНК

Процессинг, или созревание, РНК подразумевает два поэтапных изменения ее структуры. На первом этапе происходят концевые модификации РНК, связанные с присоединением к 5' концу 7'-метилгуанозина, называемым также кэпированием, а на 3'-конце происходит его укорочение и полиаденилирование, т.е. присоединение «хвоста» из нескольких адениновых нуклеотидов. Концевые модификации создают такую третичную структуру и-РНК, которая имеет более продолжительное время жизни, т.к. РНК защищена от атак ферментов нуклеаз. На втором этапе созревания РНК подвергается сплайсингу, или процессу вырезания интронов и сшивания экзонов.

Кэпирование («кэп») — это нестандартное присоединение гуанозинтрифосфата (ГТФ) к первому 5'-нуклеотиду, которое необходимо для правильного сплайсинга первого интрона в пре-и-РНК, связывания и-РНК с рибосомой, а также для обеспечения стабильности и-РНК и транспорта последней в гиалоплазму. За присоединения кэпа отвечают три фермента, связанные с РНК-полимеразой II.

Полиаденирование 3'-конца пре-иРНК сопряжено с узнаванием и отрезанием специфической последовательности 5'-AAUAAA-3' специальными ферментами, привлекающими полиаденилатполимеразу (ПАП), которая наращивает обрезанный 3'-конец адениловыми нуклеотидами за счет присоединения от 100 до 300 остатков АМФ. Хвост поли-А необходим для эффективного удаления последнего интрона, транспорта иРНК в гиалоплазму, унификации 3'-концов. Каждый вид иРНК имеет поли-А хвост определенной длины, который является важным регулятором стабильности иРНК, коррелирующей с длиной хвоста.

Сплайсинг РНК обусловлен мозаичным строением генов у эукариот. Гены состоят из участков, несущих генетическую информацию, — экзонов и участков, не несущих таковую, — интронов. Гены могут различаться по числу интронов и экзонов. Например, гены, кодирующие цепи гемоглобина млекопитающих, содержат 2 интрона и 3 экзона на каждый; ген для одного из вариантов коллагена — 49 интронов и 50 экзонов; ген белка тонких филаментов титина — 177 интронов и 178 экзонов. Однако имеются структурные гены, не содержащие интронов, такие как гены белков-гистонов.

В ходе сплайсинга интроны вырезаются, а экзоны сшиваются. В результате зрелая иРНК оказывается значительно более короткой по сравнению с исходной пре-иРНК. Сплайсинг происходит с помощью сплайсосомы, в состав которой входят малые ядерные РНК (мя-РНК), богатые урацилом, поэтому их называют U-РНК (U1-U6). мя-РНК имеют концевые участки, комплементарные определенным последовательностям нуклеотидов интронов пре-иРНК. На 5'-конце интрона находится донорный сайт сплайсинга — AGGU, а на 3'-конце расположен акцепторный сайт сплайсинга — CAGG. Взаимодействие мя-РНК с этими сайтами приводит к расщеплению фосфодиэфирной связи в донорном сайте и выпетливанию интрона в виде лассо. Затем интрон высвобождается, выводится из сплайсосомы и подвергается гидролизу (рис. 10).

Повышение эффективности сплайсинга РНК может достигаться взаимодействием с белками-информатинами, в результате чего образуются информиферы. Их формирование уменьшает линейные размеры пре-иРНК в 15–20 раз.

Определенные иРНК подвергаются оригинальному и редкому для эукариот варианту процессинга, который называется редактирование. Под ним понимают посттранскрипционные изменения нуклеотидной последовательности иРНК в результате делеций, вставок или замен одного или нескольких нуклеотидов.

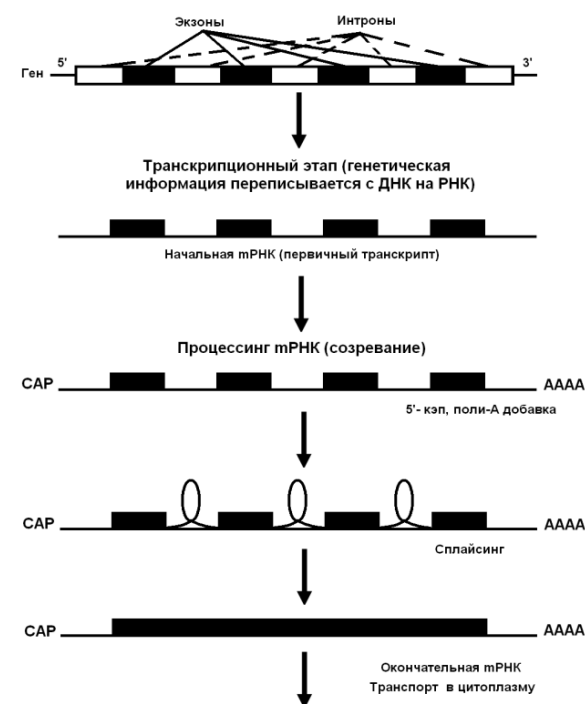


Рис. 10. Процесс сплайсинга иРНК

иРНК в митохондриях трипаносом редактируются с помощью специальной рибонуклеопротеидной частицы — эдитосомы. В ее состав входят ферменты и небольшая молекула РНК-гид, которая служит матрицей при редактировании иРНК. РНК-гид почти полностью комплементарна иРНК и способна гибридизоваться с ней в тех участках, где в последовательности РНК-гида есть избыточные некомплементарные нуклеотиды. После гибридизации происходит расщепление иРНК и по месту разрывов встраиваются дополнительные остатки урациловых нуклеотидов.

Механизмы редактирования РНК включают в себя как каскады нуклеолитических и фосфотрансферазных реакций, направляемые гидовыми РНК, так и сайт-специфическое дезаминирование за счет работы ферментов дезаминаз. Дезаминазы в клетках млекопитающих удаляют аминогруппу у азотистого основания, «превращая» при этом аденин в другой нуклеотид — ионизин, комплементарный цитозину, а цитозин в урацил.

Например, в и-РНК аполипопротеина-В кодон САА, кодирующий глутамин, заменяется на стоп-кодон UAA, что приводит к образованию укороченного, но нормального варианта белка.

Зрелая и-РНК содержит три функциональных района: лидерный, матричный и трейлерный. Лидерный район, или лидер, служит для взаимодействия с рибосомой и регулирует работу генов на уровне инициации трансляции. Матричный район содержит информацию о первичной структуре белка, т.е. является матрицей трансляции. Границы матрицы определяются иницирующим кодоном AUG и одним из трех терминальных кодонов (UAA, UAG, UGA). Трейлерный район отвечает за терминацию трансляции, за транспорт РНК через ядерную пору, за регуляцию продолжительности жизни иРНК.

На следующем этапе и-РНК переходит в цитоплазму клетки и участвует в трансляции, или синтезе, полипептидной цепи.

2.6. Трансляция

Трансляция — это процесс синтеза белка, основанный на переводе смысла генетической информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот. Молекулами-переводчиками в этом процессе выступают транспортные РНК (т-РНК), переносящие как минимум 20 разных аминокислот к месту синтеза белка. Третичная структура т-РНК имеет промежуточную форму «клеверного листа», петли которого образованы за счет некомплементарных минорных химически модифицированных азотистых оснований, а затем преобразуется в окончательную форму «бумеранга» или L-форму (рис. 11).

Транспортная РНК имеет два важных района: на центральной петле находится антикодон, который должен быть комплементарен соответствующему кодону на и-РНК, только в этом случае переносимая т-РНК аминокислота входит в состав белка. На 3'-конце т-РНК располагается триплет ССА, к которому за счет карбоксильной группы присоединяется соответствующая аминокислота с помощью фермента аминоксил-т-РНК-синтетазы. Выбор присоединяемой к т-РНК аминокислоты обеспечивается не только работой фермента, но и специфичностью антикодона. Аминокислоты, присоединенные к т-РНК, образуют активированные, или аминоксил-т-РНК (аа-т-РНК), именно в такой активированной форме они и участвуют в трансляции.

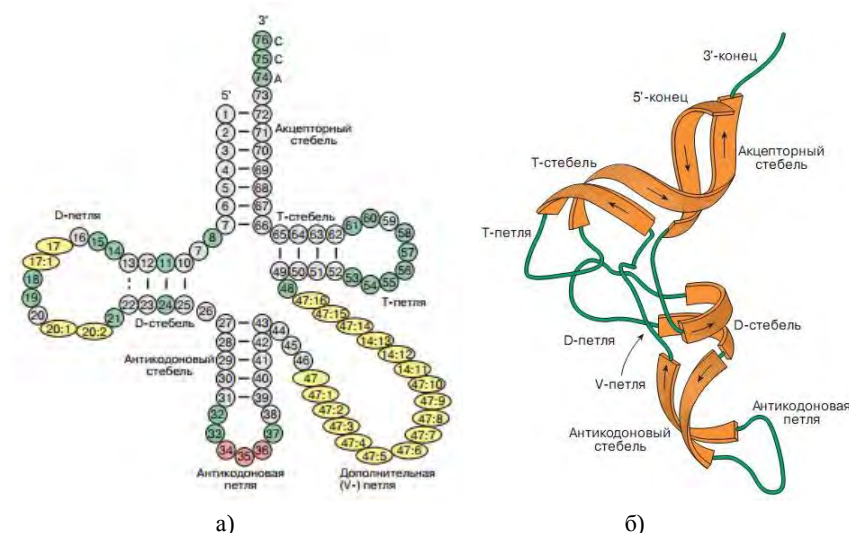


Рис. 11. Строение транспортной РНК:
а — модель «клеверного листа»; б — L-модель или «бумеранг»

Синтез белка происходит на рибосомах — небольших органоидах цитоплазмы, состоящих из большой и малой субъединиц. В состав рибосом входят рибосомальная РНК и рибосомальные белки.

Трансляцию, как и любой матричный процесс, можно разделить на три этапа: инициацию, элонгацию, терминацию.

Трансляция происходит с участием 6 факторов инициации (ИФ1-ИФ6). При инициации трансляции к малой субъединице рибосомы присоединяется стартовая метионин-аминоацил-т-РНК, которая имеет антикодон UAC и несет остаток аминокислоты метионина. Именно с нее обычно начинается трансляция. К образовавшемуся комплексу присоединяется и-РНК, а затем и большая рибосомальная субъединица. При этом UAC антикодон аа-т-РНК взаимодействует с иницирующим кодоном AUG на и-РНК. На рибосоме формируются активные центры: А — аминокислотный, Р — пептидилный, Е — эжекторный и Т — трансферный. Стартовая метионин-аа-т-РНК имеет особое строение и оказывается связанной с и-РНК и рибосомой в Р-центре. В свободном А-центре происходит узнавание антикодона новой аа-т-РНК, затем в Т-центре сближаются карбокси- и аминогруппы аминокислот-1 и 2, образуется пептидная связь между ними

и, наконец, в Е-центре происходит выталкивание освободившейся стартовой т-РНК (рис. 12). За образование пептидной связи отвечает 28S р-РНК, обладающая ферментативной активностью.

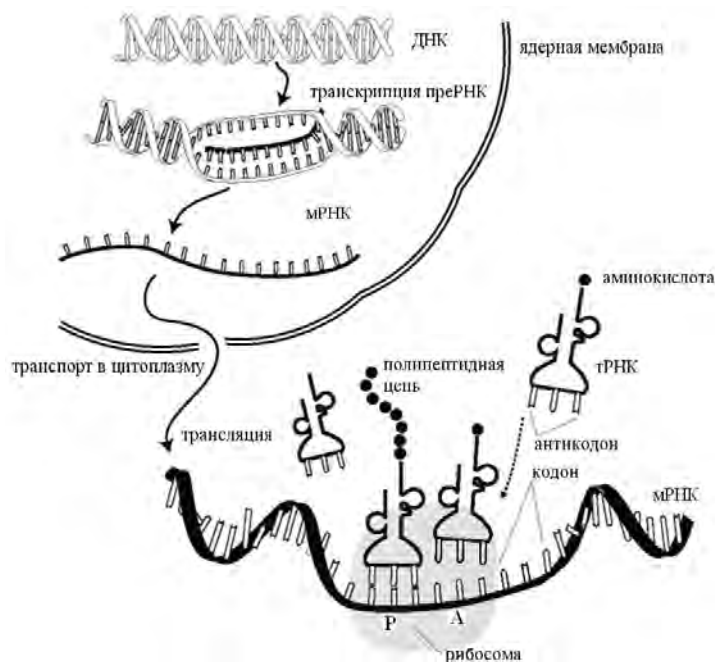


Рис. 12. Этапы реализации генетической информации в клетке: транскрипция и трансляция

На этапе элонгации к находящемуся в аминоацильном центре (А) третьему кодону и-РНК поступает третья аа-т-РНК с аминокислотой-3. Своим антикодоном она взаимодействует с кодоном и-РНК, и если такие кодоны оказываются комплементарны друг другу, то в трансферазном центре (Т) аминокислоты-3 и -2 сближаются и между ними образуется пептидная связь. т-РНК с растущим пептидом становится пептидил-т-РНК. При этом вторая аа-т-РНК освобождается, а рибосома меняет свою конформацию и «протаскивает» и-РНК ровно на один триплет, делая «шаг» вперед, или **транслокацию**. Вторая аминоацил-т-РНК оказывается в эжекторном центре (Е) и выталкивается из рибосомы, а в центр Р поступа-

ет пептидил-т-РНК с 3-, 2- и 1-й аминокислотами, т.е. с образовавшимся трипептидом. Теперь в центре А находится четвертый триплет, кодирующий аминокислоту-4. Затем весь цикл элонгации вновь повторяется. Циклическая работа рибосомы продолжается до тех пор, пока в центр А не попадет один из трех нонсенс-кодонов UAA, UGA и UAG. Поскольку в клетке не существует т-РНК с антикодонами, комплементарными терминальным кодоном, то синтез белка останавливается. Такая пауза служит сигналом для остановки синтеза белка, которая происходит при участии белкового фактора терминации, или рилизинг-фактора. Он связывается с терминальным кодоном, активируя пептидилтрансферазу, которая катализирует отщепление полипептида от последней т-РНК. В финальной стадии для восстановления карбоксигруппы ($-COOH$) к последней аминокислоте присоединяется молекула воды. Синтезированный белок покидает рибосому, которая диссоциирует на большую и малую субъединицы.

Зрелый белок отличается от полипептидной цепи, прежде всего, наличием вторичной и третичной пространственных структур.

Созревание, или процессинг, белка является высокоспецифичным для разных типов белков. Например, длинный полипептид проопиомеланокортин в клетках гипофиза человека разрезается на более короткие молекулы, которые будут выполнять разные функции в организме — АКГГ, МСГ, эндорфины и др. Известно также, что неактивная молекула проинсулина превращается в активный инсулин в результате удаления внутреннего участка полипептида размером примерно в 30 аминокислотных остатков. Кроме того, молекулы пептидов могут гликозилироваться, фосфорилироваться, сульфатироваться или подвергаться другим химическим преобразованиям, которые необходимы для формирования функционально активного белка.

На процесс трансляции могут влиять различные антибиотики: стрептомицин, тетрациклин, эритромицин, пурамицин и другие. Существуют антибиотики, которые блокируют синтез белка только в прокариотической клетке, именно их используют для лечения бактериальных заболеваний, однако при интенсивной терапии такими антибиотиками надо иметь в виду, что они блокируют синтез белков на митохондриальных рибосомах, имеющих константу седиментации 70S, как и бактериальные рибосомы.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА И ГЕНОМА

Ген — это участок молекулы ДНК, несущий информацию об элементарной структуре или функции клетки. Ген является единицей наследственной информации, которая передается из поколения в поколение. В клетке все гены взаимодействуют друг с другом на уровне своих продуктов — белков или РНК, образуя генные сети или своеобразный генетический ландшафт, контролирующий конкретный признак или свойство организма (рис. 13). Реконструкция генных сетей человека на основе геномики, транскриптомики, протеомики и других наук позволила создать базу данных GenNet, описывающую генные сети, ответственные за метаболизм и регуляционные процессы организма. Локальные генные сети входят в состав единой глобальной сети или системы организма.

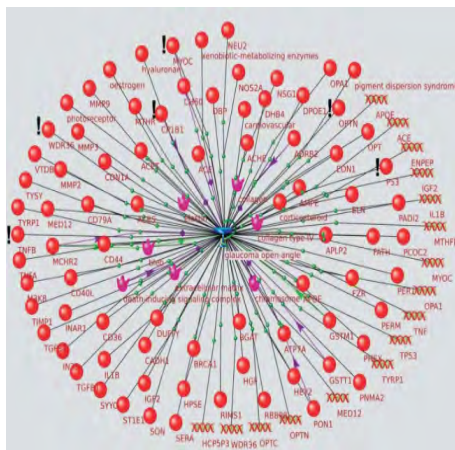


Рис. 13. Генная сеть

Совокупность генов, локализованных в гаплоидном наборе хромосом у особей определенного вида и необходимых для нормального развития организма, называют геномом. В вирусных частицах генетическая информация может быть представлена не только молекулами ДНК, но и РНК. В пределах одного биологического вида параметры генома относительно постоянны, а внутривидовое разнообразие обеспечивается за счет мута-

ционной изменчивости. Геном человека, например, упакован в 23 хромосомы и, следовательно, в 23 молекулы ДНК в период G_1 интерфазы. Число 23 не несет само по себе никакого биологического или мистического смысла. Другие виды организмов могут иметь большее или меньшее число хромосом. Основу генома составляет двуспиральная молекула ДНК, которую называют «нитью жизни».

С развитием молекулярной генетики значение термина «геном» изменилось. В настоящее время под геномом понимают совокупность наследственного материала отдельного представителя вида.

Геном можно назвать летописью нашего подвида *Homo sapiens sapiens*, поскольку в нем с помощью генетического кода зашифрованы все видовые эволюционные изменения. В «книге генома» с помощью алфавита из четырех «букв» — азотистых оснований нуклеотидов — записан рецепт приготовления всех белков и РНК, которые присутствуют в нашем организме. Поскольку генетический код триплетен, то этот «рецепт» составлен из примерно 3 млрд «букв», образующих около 1 млрд «слов». Все 4 «буквы» при этом, как и в обычном тексте, равнозначны, и смысл имеет только их комбинация.

Геном эукариот включает факультативные и облигатные элементы (рис. 14).



Рис. 14. Факультативные и облигатные элементы генома

К факультативным элементам генома относятся некоторые повторяющиеся последовательности, псевдогены, ксеногены: вирусные ДНК и транспозоны (мобильные генетические элементы). Они не являются строго обязательными, а их количество и местоположение на хромосомах значительно варьируют. Статистические данные о геноме человека представлены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика генома человека

Параметр	Геном человека
Длина ДНК	3,2 на 10.000.000.000 п.о. (=п.н.)
Количество структурных генов (СГ)	~ 25000
Средний размер гена (СГ)	27000 п.о.
Минимальное количество экзонов в СГ	1
Средний размер экзона	145 п.о.
Число псевдогенов	Более 20000
Белок-кодирующие последовательности	1,5 %
Повторяющиеся элементы	~ 50 %
Регуляторные элементы (сайты связывания регуляторных белков)	20 %

При равновесном ультрацентрифугировании тотальной ДНК в градиенте плотности CsCl выявляются два ее компонента — основной и минорный, различающиеся плавучей плотностью и нуклеотидным составом. Минорный компонент включает повторы с высокой копийностью. Повторы в геноме могут иметь разную длину и содержание. Более чем для половины повторов разной протяженности функции пока не известны, но предполагается, что в них содержится информация о программе индивидуального развития, которую метафорично называют «партитурой симфонии жизни».

Короткие повторы, длиной несколько нуклеотидов, обычно не несут никакой информации и чаще всего расположены в гетерохроматиновых районах. Они составлены из относительно коротких монотонных последовательностей и, по-видимому, выполняют структурную роль. Длинные повторы часто представляют собой копии мобильных элементов генома разной протяженности.

Мобильными генетическими элементами (МГЭ), или транспозонами, называют участки ДНК, способные к транспозиции, или перемещению, из одной хромосомы в другую внутри одной клетки. В зависимости от меха-

низма транспозиции МГЭ разделяют на два типа: 1) транспозоны, перемещающиеся из одного места хромосомы в другое без участия фермента обратной транскриптазы; 2) ретропозоны, имеющие в составе повтора ген фермента обратной транскриптазы и использующие для перемещения обратную транскрипцию с образованием промежуточного РНК-транскрипта, по матрице которого строится копия ДНК. Дополнительная копия ДНК может встраиваться в любую часть генома, содержащую последовательности нуклеотидов, гомологичные концевым участкам копии, за счет «незаконной» рекомбинации с помощью фермента инсертазы. Ретропозоны являются, вероятно, потомками ретровирусов, потерявших механизмы выхода из клеток. В геноме человека существуют несколько классов мобильных генетических элементов: относительно короткие — до 500 п.о. повторы (SINE-семейство) и относительно длинные — до 6500 п.о. (LINE-семейство). К SINE-семейству относятся Alu-повторы, а к LINE-семейству — выявленные в геноме человека повторы L1. В геноме человека сформировался инсерционно-делеционный полиморфизм (от лат. *inserto* — вставлять и *delēre* — уничтожать) по SINE- и LINE-повторам. Эти мобильные генетические элементы играют важную роль в возникновении наследственных и ненаследственных заболеваний человека, поскольку они способны индуцировать новые инсерционные мутации за счет ретропозиций, либо вызывать геномные перестройки за счет незаконной гомологичной рекомбинации между разными копиями транспозонов (рис. 15).

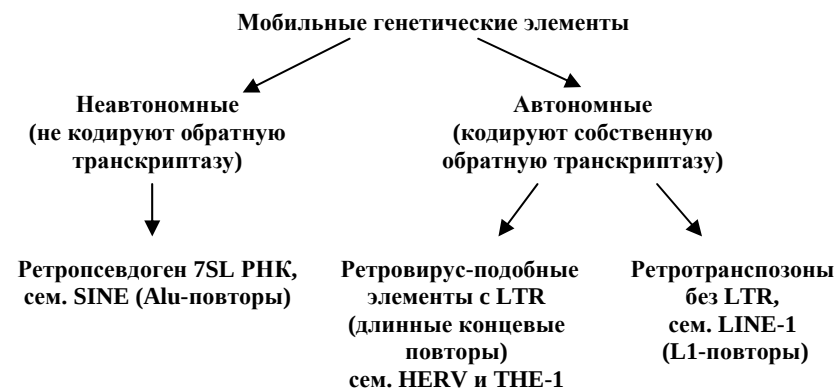


Рис. 15. Классификация мобильных генетических элементов в геноме человека

Примерами инсерционной инактивации гена является гемофилия В; примерами болезней, вызванных незаконной рекомбинацией Alu-повторов, являются α - и β -талассемия, миопатия Дюшенна, семейная гиперхолестеринемия, синдром Элерса — Данлоса.

Ксеногены представляют собой копии вирусных ДНК, встроившиеся в геном хозяина и потерявшие способность к размножению. С одной стороны, ксеногены, так же как и транспозоны, можно назвать геномными паразитами, потому что у эукариот нет механизмов, позволяющих избавляться от ненужной ДНК, однако некоторые вирусные гены могут быть полезны для хозяина. Так, например, в клетках плаценты млекопитающих работают «одомашненные» вирусные гены, помогающие образованию синцития, например, гены Syncytin1 и 2, EnvPb1, инициирующие слияние клеток. Способность продуктов этих генов нарушать целостность мембраны клеток имеет важное значение в развитии наружного слоя плаценты (синцитиотрофобласта), который образуется в результате слияния множества клеток в единую многоядерную структуру.

Псевдогенами называются молчащие копии нормальных генов, которые могут иметь множество мутаций, не позволяющих им транскрибироваться или транслироваться. Количество псевдогенов в геноме человека может превышать количество активных генов. Так, например, число псевдогенов β -тубулина превышает количество функционирующих генов этого белка в 10 раз. Многие гены обонятельных рецепторов в геноме человека превратились в псевдогены. Ген GULO, который представляет собой дефектную копию гена фермента глюконо-лактонооксидазы, необходимого для синтеза аскорбиновой кислоты, является работающим геном в геноме некоторых млекопитающих (например, крысы). Однако у современных приматов и человека при переходе на растительную пищу, богатую витамином С, произошла псевдогенизация или образование псевдогена в результате мутации. В некоторых случаях, например при раковых заболеваниях, оказываются возможными транскрипция и экспрессия псевдогенов. Если при транскрипции образуется бессмысловая РНК, то она может нарушить работу нормальных генов, поскольку будет комплементарно соединяться с их и-РНК, вызывая её разрушение за счет цитоплазматических ферментов.

На сегодняшний день собрана информация о биологическом значении факультативных элементов генома и их роли в развитии патологии человека. Известно, что длинные повторы ДНК, исходно связанные с 25 % промоторов генов человека, необходимы для их более эффективной экс-

прессии; повторяющиеся последовательности способны протектировать, или защищать, от возникновения мутаций значимые участки генома; также факультативные элементы могут быть задействованы в процессе морфогенеза и нормальном функционировании плаценты. МГЭ можно рассматривать как биологические мутагены, которые вызывают превращение протоонкогенов в онкогены за счет встраивания МГЭ в нормальную копию гена. Показано их участие в развитии аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний с помощью запуска апоптоза собственных здоровых клеток.

К облигатным, или обязательным, элементам генома относят структурные и регуляторные гены, количество и расположение которых на хромосомах достаточно стабильно (см. рис. 14).

Регуляторные гены обеспечивают работу структурных генов в процессе транскрипции, или синтеза РНК. Они представляют собой специфические последовательности нуклеотидов, которые взаимодействуют с разнообразными транскрипционными факторами, регуляторными белками и РНК-полимеразами. К регуляторным генам относятся инициаторы, модуляторы и терминаторы транскрипции. Инициаторы располагаются перед структурным геном и содержат особую последовательность нуклеотидов — промотор, который узнается транскрипционными факторами и затем главным ферментом транскрипции РНК-полимеразой. К модуляторам относятся энхансеры (усилители) и сайленсеры (гасители) транскрипции.

Они могут занимать любое положение по отношению к регулируемым генам — располагаться в интроне самого гена или находиться в межгенных промежутках. Энхансеры выполняют функции усиления транскрипции, при этом молекула ДНК может образовывать петли, приближая энхансер к инициатору в пространстве. С энхансерами связываются белки-активаторы транскрипции, а с сайленсерами — репрессоры. Наличие тканеспецифичных энхансеров позволяет тонко регулировать экспрессию генов в многоклеточном организме. Терминаторы располагаются после структурного гена, они взаимодействуют с регуляторными белками — факторами терминации транскрипции, что приводит к ее окончанию. Особенность регуляторных генов состоит в том, что их генетическая информация реализуется только на уровне ДНК, хотя появились данные о том, что энхансеры могут транскрибироваться, но полученные РНК деградируют в клетке.

Структурные гены могут быть разделены на две группы в зависимости от образования конечного продукта: структурные гены группы 1 — транскрибируемые, переводящие информацию с ДНК в разные классы РНК (т-РНК, р-РНК, мя-РНК и др.), и структурные гены группы 2 —

транслируемые, переводящие информацию с ДНК в белок (ДНК $\Rightarrow$ и-РНК $\Rightarrow$ белок), т.е. генетическая информация СГ1 реализуется на уровне РНК, а СГ2 — на уровне белка (табл. 3).

Таблица 3. Структурные гены

Гены РНК	Функция
т-РНК	Структура РНК («клеверный лист» или «бумеранг»)
р-РНК (сотни идентичных генов в геноме)	Структура РНК (для формирования рибосом)
Псевдогены	«Молчащие» копии структурных генов, которые могут транскрибироваться, но не транслируются. Их функция неизвестна.
Малые ядерные РНК	Компоненты сплайсосом
Малые ядрышковые РНК	Процессинг р-РНК в ядрышке
Микро-РНК	Регулируют экспрессию генов, блокируя трансляцию
Малые интерферирующие РНК	Участвуют в деградации и-РНК конкретных генов
Теломеразные РНК	Компоненты теломераз, которые достраивают концевые участки хромосом
Xist-РНК	Инактивирует одну из X-хромосом
7SL-РНК	Участвует в транспорте белков в полость ш-ЭПС в составе СРЧ

Гены, которые экспрессируются во всех клетках организма и необходимы для постоянного обеспечения жизнедеятельности, называют генами общеклеточных функций, или «домашнего хозяйства» (house-keeping genes). Например, гены белков гистонов, тубулинов, гены т- и р-РНК и т.д. Размеры генов в геноме могут сильно отличаться. Так, к малым генам относятся гены глобиновых цепей, ген инсулина; их размер не превышает 10 тыс. п.о. К генам среднего размера (от 10 до 50 тыс. п.о.) относятся гены каталазы и альбумина. Самым крупным геном в геноме является ген миодистрофина; его размер составляет более 2 млн. п.о.

Гены, экспрессирующиеся только в дифференцированных клетках, называют «генами роскоши» (luxury genes). К ним относятся гены «цитодифференцировки», обеспечивающие специализированные функции, активные только в определенных типах клеток (тканей) или на конкрет-

ных этапах онтогенеза, и гены «адаптивного ответа», экспрессирующиеся в ответ на изменение условий окружающей среды. К генам цитодифференцировки можно отнести гены, кодирующие белковые цепи гемоглобина (HBA1 и HBA2, HBB, HBD, HBE, HBG, HBZ). Они экспрессируются только в эритроблестах, из которых формируются зрелые эритроциты. В эритроблестах желточного мешка эмбрионов функционируют гены HBE, HBZ, и эритроциты эмбриона содержат эмбриональный гемоглобин (HbG), состоящий из двух ξ (дзета) и двух ϵ (эпсилон) цепей. На стадии плода (после 10 недели развития) эритропоэз происходит в печени и селезенке, в первичных эритроблестах функционируют гены HBA и HBG, а эритроциты плода содержат фетальный (плодный) гемоглобин (HbF), включающий две α - и две γ -цепи. Незадолго до рождения кровотообразование начинается в красном костном мозге, в эритроблестах которого функционируют гены HBA, HBB и HBD, и эритроциты содержат 2 вида взрослого гемоглобина A1, состоящего из двух α - и двух β -цепей и небольшого количества гемоглобина A2, включающего две α - и две δ -цепи. Различные виды гемоглобина у человека имеют разную степень связывания молекул кислорода, что обусловлено разными механизмами его поступления в ткани. Высокое сродство к кислороду имеют гемоглобины, образующиеся у эмбриона/плода во время внутриутробного развития, вследствие поступления кислорода из желточного мешка или по пуповинным сосудам от матери. После рождения появляется легочное дыхание, при котором насыщение кислородом крови значительно возрастает, поэтому сродство к кислороду у гемоглобинов взрослого человека меньше, чем у плода (табл. 4).

У человека известны наследственные заболевания — талассемии, связанные с нарушением синтеза цепей гемоглобина, что приводит к задержке физического развития ребенка вследствие развивающейся анемии. Выделяют несколько вариантов талассемий: в зависимости от типа поврежденной цепи глобина (например, α -талассемия, β -талассемия) или от типа мутации в соответствующем гене (например, талассемию типа «0» — при полном отсутствии продукта гена, или талассемию типа «+» — при снижении уровня глобина в клетке). Талассемия имеет аутосомно-рецессивный тип наследования, причем клинические проявления могут наблюдаться и у рецессивных гомозигот и у гетерозигот.

Причиной β -талассемий являются точковые мутации, приводящие к нарушению транскрипции, процессинга и трансляции этого гена. Клинически различают большую и малую талассемию в зависимости от степени тяжести анемии (табл. 5).

Таблица 4. Виды гемоглобина человека

Вариант гемоглобина	Цепи глобинов	Примечания
HbA1 (Adult)	$\alpha_2\beta_2$	~95 % у взрослого человека
HbA1C*	$\alpha_2\beta(\text{glu})_2$	Гликированный гемоглобин, ~3 % у взрослого человека, повышается при диабете
HbA2	$\alpha_2\delta_2$	~2 % у взрослого человека
HbF (Fetus)	$\alpha_2\gamma_2$	Основной плодный гемоглобин (3–9 месяцы беременности), обладает повышенным сродством к кислороду, ~1 % у взрослого человека
Gower1	$\xi_2\varepsilon_2$	Эмбриональные гемоглобины, максимальное сродство к кислороду
Gower2	$\alpha_2\varepsilon_2$	
Portland	$\xi_2\gamma_2$	
HbH	β_4	Не функционирует, появляется при тяжелой врожденной анемии
Hb Barts	γ_4	Не функционирует, приводит к внутриутробной гибели плода

Примечание: * – HbA1C содержит β -глобиновые цепи, к которым присоединяются молекулы глюкозы. У пациентов с нарушением утилизации глюкозы уровень этого гемоглобина повышается. В лабораторной диагностике существует анализ на гликированный (гликозилированный) гемоглобин, позволяющий заподозрить сахарный диабет.

Таблица 5. Варианты β -талассемий

Заболевание	Генотип	Лабораторные показатели	Проявления
Большая β -талассемия (гомозиготная)	β^0/β^0 (талассемия типа «0»)	HbF 98 %; HbA2 > 2 %.	Тяжелая врожденная анемия, спленомегалия, гиперплазия ККМ, «мишеневидные» эритроциты, необходимы частые гемотрансфузии и трансплантация ККМ
	β^+/β^+ (талассемия типа «+»)	HbF 70–80 %; HbA2 > 1 %; HbA1 10–20 %.	
Малая β -талассемия (гетерозиготная)	β^0/β β^+/β	HbA2 > 3,5 %	Асимптомное течение/легкая анемия, аномалии эритроцитов

Основной причиной α -талассемии являются делеции разной протяженности в соответствующих генах HBA1 и HBA2 или делеция регуляторного участка этих генов, которые могут приводить к клинически разнообразным картинам или вариантам заболевания (табл. 6).

Таблица 6. Варианты α -талассемий

Заболевание	Генотип (HBA1 и HBA2)	Лабораторные показатели	Проявления
Асимптомная α -талассемия	$-\alpha/\alpha\alpha$	Снижен уровень HbA1	Асимптомное течение без аномалии эритроцитов
Малая α -талассемия	$--/\alpha\alpha$ (Азия) $-\alpha/-\alpha$ (Африка)	HbA2 > 3,5 %	Асимптомное течение/легкая анемия, аномалии эритроцитов
Большая α -талассемия	$--/-\alpha$	Появление HbH	Тяжелая врожденная анемия, спленомегалия, «мишеневидные» эритроциты, пациенты нуждаются в частых гемотрансфузиях
Внутриутробная водянка плода	$--/--$ (α^0 -талассемия типа «0»)	Наличие Hb Barts	Внутриутробная гибель

Гены адаптивного ответа начинают экспрессироваться при изменении внешних воздействий, связанных с повышением температуры, окислительным стрессом, множественными повреждениями в ДНК и т.д. Например, при поступлении ионов тяжелых металлов в клетку включается один из двух генов (MT1 и MT2), кодирующих белок металлотионеин, который обладает способностью связывать тяжелые металлы, в частности ртуть (Hg) и кадмий (Cd), и выводить их из клетки. Один из генов постоянно работает в клетках как «ген домашнего хозяйства», а второй ген начинает функционировать как «ген роскоши» только при значительном поступлении тяжелых металлов. При отравлении тяжелыми металлами количество металлотионеина возрастает, металлы связываются с ним и удаляются, что сопровождается детоксикацией организма. Снижение концентрации тяжелых металлов приводит к прекращению экспрессии «гена роскоши» MT1 и снижению уровня металлотионеина в клетках. Кроме

того, к генам адаптивного ответа относятся гены, кодирующие белковый компонент различных вариантов цитохрома P450 (гены CYP), функционирующие только при проникновении в организм различных ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов. Так, при приеме фенobarбитала работают гены CYP2A и CYP2B, которые после инактивации ксенобиотиков выключаются.

4. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

В настоящее время установлено, что общее число структурных генов человека не превышает 25000, что составляет примерно 10–15 % всего генома. Таким образом, большая часть молекулы ДНК не несет информации о структуре белков или т-РНК и р-РНК. Ранее функции этой избыточной (junk) ДНК были не ясны, хотя ее состав изучен достаточно подробно.

В настоящее время предполагается, что эта ДНК кодирует различные виды регуляторных РНК, в том числе miRNA — микро-РНК, которые могут участвовать в регуляции экспрессии генов или в процессинге РНК, выполнять структурные функции, повышать точность гомологичного спаривания и рекомбинации хромосом во время профазы I мейоза, способствовать успешной репликации.

Структурные гены характеризуются высокой консервативностью, т. е. они имеют сходные или гомологичные последовательности нуклеотидов у организмов разных видов. Гомологичные последовательности в экзонах таких генов являются стабильным показателем, а в интронах они более изменчивы, поскольку последние, как правило, не содержат смысловой информации.

Абсолютное большинство прокариот — эубактерии не имеют экзон-интронной организации генов. Однако эволюционно наиболее древние прокариоты — архебактерии характеризуются экзон-интронным строением генов. Этот факт дает основание полагать, что мозаичное строение генов было исходным и сохранилось до сих пор у эукариот, но исчезло у эубактерий (прокариот). Вероятно, экзон-интронная структура генов закрепилась в эволюции в связи с тем, что на ее основе за счет дупликации экзонов или других нуклеотидных последовательностей можно формировать новые гены, кодирующие крупные полидоменные белки со сходными функциями, которые могут работать в разное время и в разных клетках. Например, в эукариотических клетках животных имеется ацилсинтазный комплекс, который представлен одним крупным полипептидом, содержащим семь доменов, выполняющих функции, аналогичные семи ферментам метаболизма жирных кислот в бактериальной клетке.

В процессе эволюции мозаичные гены могли возникать и за счет включения одного короткого гена в качестве экзона в состав нескольких разных крупных генов. Например, сходные экзоны имеются в генах, коди-

рующих белки: активатор плазминогена, фибронектин и эпидермальный фактор роста. Очевидным преимуществом экзон-интронной структуры генов является возникновение возможности альтернативного сплайсинга. В этом случае из одной пре-и-РНК формируется несколько вариантов зрелых и-РНК, содержащих различные комбинации из исходного набора экзонов, что делает возможным синтез нескольких вариантов белка на основе информации, содержащейся в одном гене.

Под активностью гена подразумевают наличие в клетке активного (функционирующего или экспрессирующегося) конечного продукта — структурного белка или белка-фермента, а его отсутствие свидетельствует об инактивации, или выключении, гена.

Генетическая информация реализуется в клетке последовательно путем ее перенесения сначала в процессе транскрипции с ДНК на и-РНК, а после созревания и-РНК в процессе трансляции на продукт гена — белок, который выполняет свои клеточные функции. Регуляция работы, или экспрессии, генов у эукариот может осуществляться на нескольких различных уровнях в соответствии с этапами реализации генетической информации. Претранскрипционный уровень регуляции действия генов реализуется на уровне ДНК и хроматина. На этом уровне регулируется экспрессия генов общеклеточных и специфических функций. Все остальные уровни регулируют работу только генов специфических функций.

Транскрипционный уровень выражается в регуляции инициации транскрипции.

Посттранскрипционный уровень регуляции экспрессии генов осуществляется после синтеза и-РНК и базируется на различных вариантах процессинга этой РНК.

Трансляционный уровень регуляции работы генов определяется возможностью изменять интенсивность синтеза полипептидов на стадии инициации трансляции.

Посттрансляционный уровень реализуется после синтеза полипептида и связан с процессингом молекул белка.

4.1. Претранскрипционный уровень

Претранскрипционный уровень регуляции экспрессии генов основан на изменении функциональной активности хроматина, которая зависит от степени его конденсации в районе инициатора СГ2. Появление хроматина в процессе эволюции позволило многоклеточным эукариотам осуществ-

лять долговременное выключение тканеспецифичных генов и производить дифференцировку клеток разных типов. Поскольку РНК-полимераза и транскрипционные факторы не могут взаимодействовать со спирализованным хроматином, то его деспирализация и переход нуклеомерного уровня на нуклеосомный достигается химической модификацией белков-гистонов, например метилированием, ацетилизацией или фосфорилированием гистонов коровой частицы. Обычно на первом этапе перехода происходит дефосфорилирование или повторное фосфорилирование гистона Н1, затем дальнейшее ацетилирование гистонов Н2-Н4 с помощью ферментов гистоновых ацетилаз приводит к ослаблению связи между ДНК и коровой частицей, что облегчает присоединение транскрипционных факторов к ДНК. Удаление остатка уксусной кислоты, или ацетата, гистоновыми деацетилазами приводит к противоположному эффекту — спирализации хроматина и подавлению транскрипции. Другой важной химической модификацией является метилирование. Присоединение метильных остатков к «хвостам» гистонов имеет разные последствия, зависящие от подвергающейся модификации конкретной аминокислоты. Наибольшее количество меток может нести гистон Н3: если он метилируется по лизину в четвертом положении Н3К4 получается метка транскрипционно активного хроматина (хроматин деспирализуется), а метилирование лизина в девятом положении образует метку гетерохроматина Н3К9 (хроматин спирализуется) (табл. 7).

Таблица 7. Сравнение эу- и гетерохроматина

Эухроматин	Гетерохроматин*
– Светло окрашен	– Темно окрашен
– Деконденсирован	– Конденсирован
– Потенциально транскрипционно активен	– Транскрипционно неактивен
– Реплицируется в ранней S-фазе	– Реплицируется в поздней S-фазе
– ДНК не метилирована	– ДНК метилирована
– Гистоны ацетилованы, метилированы и дефосфорилированы	– Гистоны деацетилированы деметилированы и фосфорилированы

Примечание: * Факультативный гетерохроматин представлен инактивированной X-хромосомой (тельце Барра), импринтированными генами, ДНК вирусов, генами специфических функций (тканеспецифические гены и гены раннего развития), повторяющимися последовательностями ДНК. Конститутивный гетерохроматин не содержит генов (центромерные и теломерные участки).

Помимо химических модификаций гистоновых белков хроматина возможна химическая модификация самой ДНК в инициаторных последовательностях СГ2. У позвоночных работают ферменты метилазы (ДНК-цитозил-метилтрансферазы (МТ)), присоединяющие метильные группировки к цитозину, который расположен рядом с гуанином в так называемых СГ-островках примерно в 1000 п.о., или сайтах, инициатора. Такие СГ-сайты содержатся в 60 % инициаторов генов, поэтому метилирование является очень распространенным механизмом регуляции экспрессии генов.

Метилирование СГ-сайтов в составе инициаторов генов специфических функций снижает уровень синтеза и-РНК и приводит к долговременному сайленсингу, или «замалчиванию», гена, поскольку с метилированного инициатора не может начаться транскрипция. Например, в эритроблестах функционально активны глобиновые гены, а во всех остальных клетках организма, кроме эритробластов, инициаторы генов белковых цепей гемоглобина метилированы, поэтому в них отсутствует экспрессия данных генов.

Существуют несколько типов ДНК-метил-трансфераз: ДНК-МТ 1 типа распознает полуметилированные СГ-сайты, образующиеся после репликации и метилирует их, МТ 2 типа метилирует т-РНК, а ДНК-МТ 3 типа узнает неметилированные СГ-сайты и наносит метки метилирования в процессе развития организма.

В геноме человека метилированы: повторяющиеся последовательно-сти ДНК, гетерохроматиновые районы хромосом, ДНК вирусов, транспозоны или короткие повторы ДНК, инактивированная Х-хромосома, импринтированные гены. По мере развития организма в клетках метилируются гены раннего развития, а в процессе цитодифференцировки идет метилирование различных наборов генов специфических функций. Метилирование ДНК как механизм регуляции действия генов поддерживается в ряду последовательных клеточных делений. После репликации метилированной ДНК образуются две ее дочерние молекулы, в которых метилирована только одна, матричная, цепь. Неметилированные СГ-сайты второй-дочерней цепи узнаются и метилируются поддерживающей метилазой (МТ1). Таким образом, инактивация генов сохраняется в дальнейших клеточных делениях, что получило название «геномного импринтинга», или «геномной памяти».

У млекопитающих СГ-сайты подвергаются масштабному двойному деметилированию и метилированию. В процессе миграции первичных половых клеток в зачаток гонады сначала происходит деметилирование

генома, с целью последующей дифференцировки клеток в сперматогонии или овогонии. Затем в ходе оогенеза или сперматогенеза ДНК метилируется по-разному, а именно в ядре сперматозоида метилируются и инактивируются одни гены, в ядре яйцеклетки — другие. Второе деметилирование происходит в процессе дробления зиготы до образования стадии бластоцисты и дифференцировки бластомеров на клетки внутренней клеточной массы и трофобласт. Второе метилирование ДНК происходит в процессе эмбрионального развития в зависимости от пола плода.

Интересным фактом является то, что профили (или метки) метилирования в одинаковых тканях людей разного этнического происхождения практически не отличаются, а межтканевые отличия у одного человека значительно более выражены.

Было доказано, что метилирование играет важную роль в процессах канцерогенеза, старения, развития инфекционных заболеваний и наследовании поведенческих реакций.

После оплодотворения в зиготе оказывается взаимодополняющий набор метилированных и неметилированных аллелей генов специфических функций от отца и матери, необходимый для нормального развития нового организма, причем является важным от кого из родителей унаследован метилированный (инактивированный) аллель гена. Если путем метилирования в оогенезе окажется выключен материнский ген, то у потомков проявится отцовский аллель этого же гена и наоборот, т.е. в диплоидных клетках человека импринтированные гены обычно экспрессируются только с одного аллеля. Такой вариант регуляции работы гомологичных генов у человека описан на сегодняшний день лишь для примерно 100 генов специфических функций, влияющих на рост, развитие и метаболизм организма. При этом все импринтированные гены располагаются группами, или кластерами, на участке хромосом 11p15, 15q11-q1. В таких кластерах присутствуют центры импринтинга (ICE — imprinting control elements), которые регулируют работу генов в пределах кластера. Таким образом, геномный импринтинг является эпигенетическим механизмом экспрессии гомологичных генов в процессе развития организма в зависимости от родительского происхождения аллеля гена.

С медицинской точки зрения геномный импринтинг реализуется в различном проявлении одного и того же дефекта, наследуемого от родителей разного пола. Примером такой мутации может быть делеция небольшого участка длинного плеча 15 хромосомы (15q11-13). Если хромосома с делецией была получена от отца, то у потомка развивается синдром Пра-

дера-Вилли, который характеризуется малым весом при рождении, мышечной гипотонией, умственной отсталостью в дальнейшем, ожирением и гипогонадизмом, особенно выраженным у мальчиков. В том случае, если ребенок получает 15-ю хромосому с делецией от матери, то он страдает синдромом Ангельмана («смеющейся» или «механической куклы»). Симптомами этого синдрома являются судороги, необычная походка (гиперкинезы, атаксия), немотивированный смех и отсутствие речи.

Особым случаем регуляции действия генов на претранскрипционном уровне у млекопитающих является обязательная инактивация одной из X-хромосом в соматических клетках самок, которая происходит на стадии бластоцисты. Процесс инактивации является случайным, но инактивированная X-хромосома остается таковой на протяжении всей жизни. Однако в клетках женских гонад работают по две X-хромосомы. При гетерозиготности по генам, сцепленным с X-хромосомой, у самок проявляется функциональный генетический мозаицизм. Часть соматических клеток самки будет иметь доминантный фенотип, а другая — рецессивный, в зависимости от того, какая из X-хромосом, с доминантным или рецессивным аллелем, будет инактивирована. Например, при гетерозиготности X-сцепленного гена, мутации в котором вызывают ангидротическую эктодермальную дисплазию у женщин, на теле случайным образом, мозаично чередуются участки кожи с потовыми железами и без них. Кроме того, при этом заболевании у пациенток наблюдается олигодентия или адентия (отсутствие зубов), гипотрихоз или алопеция (отсутствие волос). У мужчин наличие такого мутантного аллеля приводит к тяжелой умственной отсталости, отсутствию работающих потовых желез, патологии зубов и даже к летальному исходу.

4.2. Механизмы инактивации X-хромосомы

У плацентарных млекопитающих, и в том числе у человека, существует феномен инактивации одной из двух X-хромосом у особей гомогаметного пола, связанный с дозовой компенсацией работы генов. У особей одного вида, но разного пола наблюдается генный дисбаланс, обусловленный разным числом генов, локализованных в половых хромосомах: в X-хромосоме картировано более 1000 генов, а в Y-хромосоме — около 100 генов. Инактивация одной из X-хромосом происходит случайно на раннем этапе эмбрионального развития.

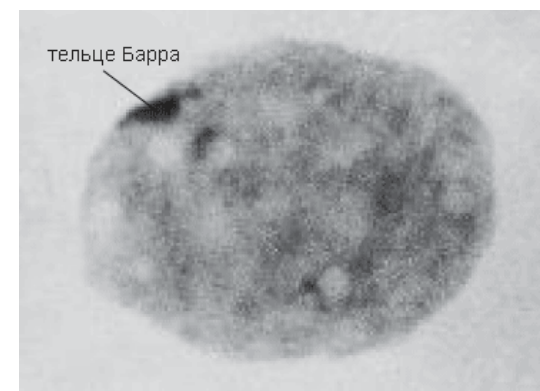


Фото 3. Тельце Барра или половой хроматин (cellbiology.ru)

Механизм инактивации X-хромосомы связан с существованием уникального генетического элемента — центра инактивации XIC (X inactivation centre). В нем расположен ген XIST, кодирующий функциональную Xist-РНК, которая может связываться со многими сайтами на X-хромосоме, выключая расположенные в этих сайтах гены и инактивируя этим хромосому. Xist-РНК представляет собой довольно большую молекулу длиной 15-17 т.о, создающую «оболочку» вокруг неактивной хромосомы за счет привлечения к ней гетерохроматиновых, негистоновых белков, гистоновых деацетилаз и неканонических вариантов гистонов. В интерфазе инактивированная X-хромосома представлена участком факультативно сильно спирализованного гетерохроматина (тельце Барра), она не транскрибируется, кроме нескольких генов (например, XIST), а оставшаяся активная X-хромосома имеет выключенный ген XIST.

На X-хромосоме имеется псевдоаутосомный район, гомологичный последовательности нуклеотидов на Y-хромосоме. Этот район может вступать в рекомбинацию с гомологичной X-хромосомой в овогенезе или с Y-хромосомой в сперматогенезе. Рекомбинация между X- и Y-хромосомами может приводить к появлению мужского фенотипа при женском кариотипе за счет переноса или транслокации на X-хромосому гена SRY, определяющего мужской пол. У таких мужчин могут наблюдаться пороки развития репродуктивных органов и нарушения их функции.

В псевдоаутосомном районе обнаружены гены, сохраняющие активность в инактивированной X-хромосоме. Наличие активных генов являет-

ся возможной причиной фенотипических особенностей у больных с измененным числом X-хромосом. Показано, что один из генов в псевдоаутосомном районе, обозначаемый как SNOX, частично ответственен за низкорослость, которая является наиболее характерным признаком при синдроме Шершевского–Тернера (45,X0).

4.3. Транскрипционный уровень

Транскрипционный уровень регуляции действия генов реализуется на этапе инициации транскрипции. Он обусловлен изменением эффективности присоединения РНК-полимеразы к уже деспирализованным промоторам в составе инициатора генов специфических функций.

Регуляторные белки, стимулирующие транскрипцию, называются активаторами, а белки, снижающие уровень транскрипции — репрессорами. Регуляция транскрипции с помощью активаторов называется позитивной регуляцией, а с помощью репрессоров — негативной. Регулируемый ген может включаться или выключаться, т.е. переходить из активного состояния в неактивное в процессе репрессии, и в обратное состояние — в процессе индукции. Следовательно, возможны четыре варианта регуляции работы генов: позитивная и негативная индукция и репрессия.

Позитивная индукция представляет собой включение гена с помощью белка-активатора, который, присоединяясь к инициатору, делает возможным присоединение транскрипционных факторов и РНК-полимеразы для начала транскрипции.

Позитивная репрессия представляет собой процесс выключения гена за счет прекращения транскрипции, который достигается путем инактивации белка-активатора с последующим его отсоединением от инициатора.

Негативная индукция представляет собой процесс включения гена за счет удаления белка-репрессора, блокировавшего присоединение РНК-полимеразы. В результате инактивации белок-репрессор освобождает инициатор, и синтез и-РНК становится возможным.

Негативная репрессия представляет собой процесс выключения гена и подавление транскрипции за счет присоединения белка-репрессора к инициатору.

Механизм действия белков активаторов и репрессоров у эукариот заключается в привлечении к промоторной области ферментов гистоновых ацетилаз или деацетилаз, которые изменяют степень компактизации хроматина за счет его ацетилирования.

Так ядерные рецепторы тиреоидных гормонов представляют собой негистоновые белки хроматина, прочно связанные с ДНК. Такие белки называют лиганд-зависимыми факторами транскрипции. При отсутствии лиганда-гормона ядерный рецептор является репрессором, а при появлении тиреоидного гормона и его связывании с рецептором конформация последнего изменяется, образовавшийся комплекс становится гистоновой ацетилазой, что активирует транскрипцию за счет ацетилирования гистонов.

Примером сложной каскадной регуляции работы генов на транскрипционном уровне может служить генетический контроль развития мужских половых желез. На Y-хромосоме локализован ген SRY, который кодирует структуру белкового тестикул-детерминирующего фактора (обозначаемый как SRY- или TDF-белок). Ген SRY активируется на ранних этапах эмбриогенеза, примерно 7–8 недель, под действием плацентарного гонадотропного гормона. Синтезируемый SRY-белок работает как транскрипционный фактор для генов, включающих развитие по мужскому пути и необходимых для дифференцировки зачаточных гонад в семенники. Те гены, которые отвечают за развитие яичников, при этом выключаются. Таким образом, SRY-белок является активатором для одних генов и опосредованным репрессором для других.

Регуляция работы генов на уровне транскрипции может быть достигнута за счет изменения активности регуляторных белков с помощью фосфорилирования или взаимодействия с другими белковыми и небелковыми молекулами. Так, белок-белковые взаимодействия регулируют работу генов, контролирующих репликацию ДНК. Для их включения к инициаторам, например, генов ДНК-полимераз, присоединяется белок-активатор транскрипции E2F, который до начала S периода клеточного цикла, репрессирован другим белком — RB. Фосфорилирование белка RB приводит к изменению его конформации, а затем к отсоединению и активации транскрипционного фактора E2F, который включает гены репликации ДНК. Наследственные дефекты RB-белка приводят к развитию опухоли сетчатки глаза — ретинобластоме, поскольку в этом случае белок E2F постоянно находится в клетке в активном состоянии, что приводит к её неконтролируемому делению.

Изменения конформации регуляторных белков могут происходить и при взаимодействии с сигнальными молекулами, которые у эукариот представлены стероидными гормонами или же жирорастворимыми витаминами. Например, роль активатора генов может играть цитоплазматический рецептор к витамину D. При проникновении витамина D, или кальциферола, в клетку, он связывается с цитоплазматическим клеточным ре-

цептором. Этот комплекс транспортируется в ядро и активирует работу гена, кодирующего структуру кальций-связывающего белка. Указанный белок принимает участие в активном транспорте ионов кальция в клетки кишечника, кожи, костей и др. и обеспечивает нормальный обмен кальция, обычно сопряженный с обменом фосфата. Дефект цитоплазматического рецептора, связывающего витамин D, вызывает витамин-D-независимый рахит (рахит II типа), устойчивый к лечению этим витамином.

На транскрипционном уровне регуляции действия генов может также использоваться механизм альтернативной инициации транскрипции. Так, ген DMD, кодирующий структуру белка дистрофина, имеет 8 альтернативных промоторов. Три промотора расположены в инициаторе гена DMD, а пять — внутри самого гена. Альтернативные промоторы работают в различных тканях и на разных этапах эмбрионального развития, что приводит к образованию отличающихся друг от друга дистрофинов, входящих в состав поверхностного аппарата мышечных волокон и клеток разных типов. В связи с различным расположением промоторов, дистрофины в этих случаях будут различаться по длине аминокислотной последовательности в начале белка, тогда как концевые участки белков различаться не будут.

Регуляция работы генов на уровне транскрипции может происходить и с помощью модуляторов — энхансеров и сайленсеров. Например, синтезируемые в печени белки альфа-фетопrotein и альбумин отвечают за транспорт жирных кислот в крови и кодируются сцепленными генами AFP и ALB соответственно, которые экспрессируются в разное время. Ген AFP находится под контролем энхансера в эмбриогенезе и экспрессируется у плода, только до рождения, а ген ALB в этот момент находится под контролем сайленсера и будет экспрессироваться только в постнатальный период.

4.4. Посттранскрипционный уровень

Регуляции действия генов на уровне после транскрипции основывается на процессинге незрелой иРНК. Обычно количество и размеры первичного транскрипта (пре-иРНК) в дифференцированных клетках значительно превышают количество зрелой РНК. Вся избыточно образуемая РНК в дальнейшем деградирует. Кроме этого, пре-иРНК подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого из нее вырезаются интроны и часть экзонов, и редактированию.

4.4.1. Альтернативная деградация РНК

Стабильность и-РНК зависит от наличия концевых последовательностей: экпирования 5'-конца и полиаденилирования 3'-конца и-РНК. Однако у и-РНК для некоторых белков на 3'-конце отсутствуют поли-А-хвосты, поэтому стабильность обеспечивается формированием структуры типа шпильки. Так, на 3'-конце и-РНК рецептора железо-транспортирующего белка-трансферрина имеется нетранслируемый участок, который образует несколько шпилек. К таким шпилькам присоединяется белок-регулятор, увеличивающий стабильность трансферриновой и-РНК. При избытке железа в клетке, белок-регулятор взаимодействует с ионом железа и отсоединяется от и-РНК, вследствие чего последняя разрушается экзо- и эндонуклеазами. При наследственных дефектах регуляторного белка, и-РНК трансферрина не стабильна, что приводит к недостатку железа в клетках и к развитию анемии (рис. 16, А).

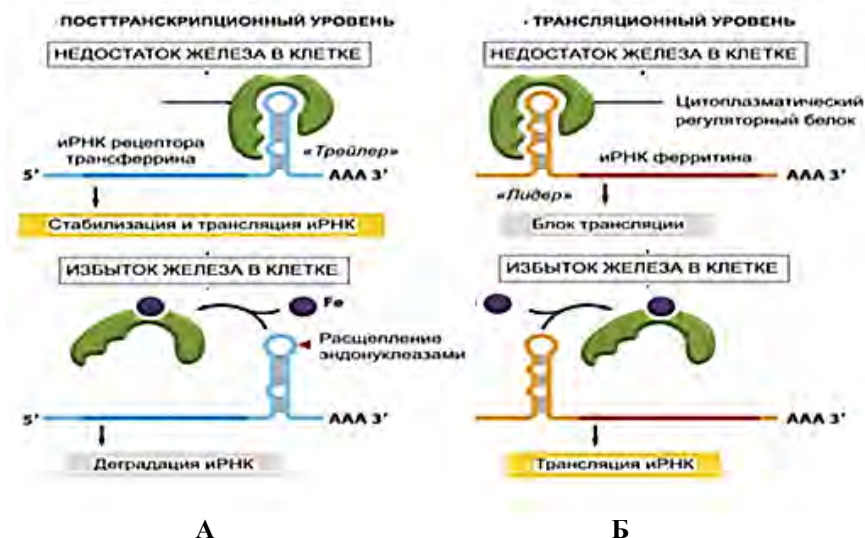


Рис. 16. Регуляция работы: А — гена белка трансферрина; Б — гена белка ферритина

В 3'-нетранслируемых участках короткоживущих и-РНК, кодирующих клеточные белки цитодифференцировки, выявляются многократно повторяющиеся последовательности нестабильности 5'-AUUUA-3'. При-

соединение к этим последовательностям регуляторных белков повышает чувствительность и-РНК к экзонуклеазам. При делеции AU-участка-нестабильности и-РНК, транскрибированной с протоонкогена c-FOS, деградация соответствующего РНК-транскрипта блокируется, и его значимое количество обнаруживается в клетках опухолей мозга, яичников и крови. Причиной подобного эффекта является активация онкогена в результате мутационного повреждения протоонкогена c-FOS.

Еще одним механизмом, регулирующим стабильность и время жизни и-РНК, является использование клеточных малых интерферирующих РНК (mi-РНК), которые являются новым классом регуляторных молекул. Они (mi-РНК) способны гибридизоваться с 3'-некодирующими последовательностями конкретных и-РНК, используя принцип комплементарности, с образованием двуцепочечных фрагментов — mi-РНК-и-РНК. Двуцепочечные фрагменты РНК быстро распознаются и расщепляются нуклеазами, что приводит к выключению или «замалчиванию» соответствующих генов на уровне транскрипции и/или трансляции. mi-РНК закодированы в повторяющихся инвертированных последовательностях генома и транскрибируются в виде коротких 12–14-олигонуклеотидных последовательностей.

4.4.2. Альтернативный сплайсинг

Для 60 % генов человека доказана возможность альтернативного сплайсинга, благодаря которому из одной молекулы пре-и-РНК могут образовываться разные варианты зрелых и-РНК за счет удаления разных комбинаций интронов и даже экзонов. Поскольку альтернативному сплайсингу могут подвергаться лидерные районы и-РНК, отвечающие за взаимодействие с рибосомой, то разные клетки синтезируют идентичные белки с разной интенсивностью. Некоторые виды злокачественных опухолей и наследственных болезней человека обусловлены дефектами сплайсинга.

Примером регуляции экспрессии генов на уровне альтернативного сплайсинга является формирование лидерного района пре-и-РНК гена CYP19, включающего или исключаящего так называемый овариальный экзон. Ген CYP19 кодирует цитохром-P450 или ароматазу, которая катализирует превращение андрогенов в эстрогены, синтезирующиеся в яичниках (гонадах), плаценте, печени плода, коже и жировой ткани. При альтернативном сплайсинге в и-РНК клеток яичников лидерный овариальный экзон сохраняется, а в остальных тканях — удаляется. Поэтому

в яичниках синтез эстрогена имеет высокий уровень, а в других эстроген-продуцирующих тканях он значительно снижен. Нарушение альтернативного сплайсинга и удаление лидерного овариального экзона из и-РНК в клетках гонад приводит к половому инфантилизму, то есть к недоразвитию женских первичных и вторичных половых признаков за счет снижения уровня синтеза эстрогенов. Сохранение овариального экзона при сплайсинге в других тканях приводит к избыточному синтезу эстрогенов в организме и к ускоренному половому созреванию у девочек. У мальчиков в клетках тестикул и других тканей овариальный экзон в норме должен удаляться, но если он сохраняется, то это приводит к мужскому ложному гермафродитизму.

За счет альтернативного сплайсинга возможно образование двух изоформ фермента амилазы: одна работает в слюнных железах и расщепляет крахмал, а вторая — расщепляет гликоген в клетках печени.

Альтернативный сплайсинг играет важную роль при активации В-лимфоцитов и их дифференцировке в плазматические клетки, продуцирующие иммуноглобулины. Сохранение экзона, кодирующего трансмембранный домен в и-РНК тяжелой цепи иммуноглобулина IgM, приводит к образованию клеточного рецептора, а отсутствие этого домена — к секреторируемой форме IgM, выполняющей функцию антитела.

4.4.3. Альтернативное редактирование

Альтернативное редактирование — это процесс посттранскрипционного изменения последовательности нуклеотидов и-РНК за счет удаления, вставки или замены 1–2 нуклеотидов. Подобный процесс характерен, например, для и-РНК полипептида, входящего в состав пассивного $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ — канала-симпортера в постсинаптической мембране нейронов гиппокампа головного мозга. В большинстве нейронов и-РНК этого полипептида не редактируется, и канал транспортирует оба иона. В определенных нейронах происходит редактирование РНК за счет замены кодона CAG, кодирующего глутамин, на CCG, кодирующего аргинин, что приводит к потере активности соответствующего белка и к блоку проводимости кальция. Нарушение редактирования и-РНК в этом случае может быть причиной наследственной амнезии — нарушения памяти, способности сохранять и воспроизводить полученную информацию.

Другим примером редактирования является замена синонимичного глутаминового кодона САА на стоп-кодон UAA в и-РНК гена APOB, ко-

дирующего белок аполипопротеин В, который участвует в транспорте холестерина, жирных кислот и триглицеридов. В гепатоцитах и-РНК этого белка не редактируется, в результате синтезируется полноразмерный аполипопротеин В, состоящий из 4536 аминокислотных остатков. В клетках кишечника — энтероцитах происходит редактирование и-РНК, что приводит к образованию укороченного аполипопротеина В, состоящего из 2152 аминокислотных остатков. Различия в размерах белка АРОВ обусловлены цитодифференцировкой и являются вариантом нормы.

4.5. Трансляционный уровень

Трансляционный уровень регуляции действия генов у эукариот осуществляется на стадии инициации синтеза белка, при сборке белоксинтезирующего аппарата из зрелой и-РНК, аминоацил-т-РНК, большой и малой рибосомальных субъединиц и ферментов — факторов трансляции.

Многие зрелые и-РНК своими 5'-лидерными районами взаимодействуют со специальными белками, образуя информосомы, и поэтому не соединяются с рибосомами и не транслируются. Такой механизм маскировки и-РНК позволяет запасть инактивированную и-РНК в клетках. Например, масштабное образование информосом происходит в оогенезе, который характеризуется активностью многих генов. После оплодотворения в зиготе начинается разборка информосом и активация и-РНК для ее участия в трансляции. При этом в зиготе начинается синтез белков, необходимых для репликации ДНК, дробления зиготы и образования бластомеров, т.е. на самых ранних этапах развития реализуется материнская генетическая информация.

Другим примером является адаптивная регуляция работы гена белка ферритина в ответ на поступление ионов железа в клетку. Ферритин — это сывороточный белок крови, состоящий из 24 протомеров, образующих полую сферу с белковыми каналами, внутри которой содержатся до 4300 атомов окисленного железа. Функция ферритина состоит в связывании железа для предотвращения его избыточного количества в плазме крови. В отсутствие железа в клетке лидерный участок и-РНК ферритина формирует шпильки, к которым присоединяется регуляторный белок, что делает и-РНК неактивной и препятствует началу трансляции. При избыточном поступлении железа в клетку регуляторный белок взаимодействует с ним, изменяет свою конформацию и отсоединяется от и-РНК. Освобожденная и-РНК участвует далее в трансляции и в клетке синтезируется

белок ферритин (см. рис. 16, Б). Дефицит ферритина в цитоплазме клеток приводит к избытку свободного железа и болезни сидерозу — отложению солей железа в различных тканях и органах.

Адаптивная регуляция действия генов на трансляционном уровне может осуществляться путем модификации факторов инициации трансляции, например, фактора ИФ2, который необходим для фиксации стартовой т-РНК в пептидном центре рибосомы. В эритроблестах красного костного мозга при синтезе глобиновых цепей работает фермент протеинкиназа, являющаяся гем-контролирующим ингибитором, она инактивирует ИФ2 путем его фосфорилирования при недостатке гема. Неактивный ИФ2 препятствует трансляции глобиновой и-РНК и, следовательно, глобиновые цепи не синтезируются. При появлении в эритроблестах гема и его частичном окислении до гемина, протеинкиназа теряет способность фосфорилировать ИФ2. Следовательно, трансляция глобиновых цепей возобновляется.

Еще один механизм регуляции работы генов связан с маскировкой Кэп-узнающего белка (4Е), который в норме должен связываться с 5'-концом и-РНК. Белок-4Е входит в состав иницирующего трансляцию комплекса вместе с факторами инициации ИФ3 и ИФ4. Взаимодействие белка-4Е с кэпом на и-РНК регулируется белком репрессором (BP-1), фосфорилирование которого с помощью mTog-киназы препятствует распознаванию кэпа. Маскировка кэпа приводит к невозможности взаимодействия малой субъединицы рибосомы с и-РНК и блоку инициации трансляции (рис. 17).

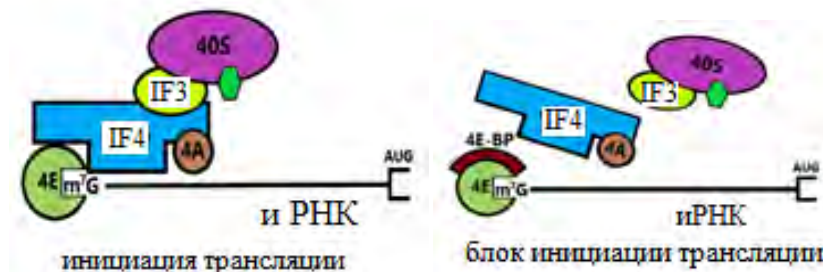


Рис. 17. Маскировка кэп-узнающего белка (4Е) с помощью репрессора — BP

4.6. Посттрансляционный уровень

Посттрансляционный уровень регуляции действия генов осуществляется после синтеза белка и основан на альтернативном процессинге полипептидов, а также на их химической модификации.

Альтернативный процессинг полипептида приводит к образованию разных белков-продуктов, считанных с одного гена. Такой процессинг происходит, например, с предшественником пептидных гормонов гипофиза — проопиомеланокортином (ПОМК). Последний синтезируется в передней и средней долях гипофиза и состоит из 239 аминокислотных остатков. С помощью фермента прогормон-конвертазы 1 из молекулы ПОМК в результате реакции гидролиза формируется большое количество биологически активных веществ, которые влияют на рост, развитие, поведение и метаболизм. В передней доле гипофиза из ПОМК образуется липотропный и адренотропный гормоны, а в средней доле — меланостимулирующий гормон, кортикотропинподобный пептид, а также эндорфины и энкефалины. Нарушение альтернативного процессинга ПОМК, обусловленное мутациями гена прогормон-конвертазы 1, вовлечено в патогенез ряда заболеваний у человека: недостаточность гормонов надпочечников, ожирение у подростков, гипогонадизм, диабет.

Регуляция на посттрансляционном уровне может осуществляться и путем изменения скорости деградации белка, например цитохрома P450, который синтезируется, но быстро деградирует в клетке за счет действия протеаз. При поступлении в клетку этанола цитохром P450 не разрушается, а поступает в пероксисомы и участвует в окислении этанола.

Кроме того, регуляция работы генов на посттрансляционном уровне может происходить за счет изменения функциональной активности белков путем их фосфорилирования и дефосфорилирования, а также с помощью аллостерических взаимодействий с различными ионами, циклическими нуклеотидами (цАМФ и цГМФ), стероидными гормонами или при взаимодействии с другими белками.

Нередко в регуляции активности белка используется несколько механизмов. Например, опухолевый супрессор — белок p53 в нормальных условиях имеет очень короткую продолжительность жизни, поскольку сразу после синтеза он распознается убиквитин-лигазой MDM2 и убиквитинируется (разрушается). Появление метки на белке p53 путем присоединения убиквитина является сигналом к его деградации в протеасомах. В случае клеточного стресса, например при повреждении ДНК, активиру-

ется протеинкиназа, фосфорилирующая p53. Фосфатная метка мешает убиквитинированию, продолжительность жизни белка увеличивается, он транспортируется в ядро, где включает гены-мишени, контролирующие остановку клеточного цикла, и адаптивный ответ, например, гены антиоксидантных белков или ферментов репарации. В случае очень серьезных некорректируемых повреждений ДНК могут включаться гены, контролирующие апоптоз.

5. РЕПАРАЦИЯ

Многие неблагоприятные экзо- и эндогенные воздействия могут индуцировать повреждения молекул ДНК и приводить к возникновению и накоплению мутаций в клетке. Мутагенным эффектом обладают различные химические соединения, ультрафиолетовое и ионизирующее облучение. В процессе эволюции были выработаны мощные механизмы, направленные на защиту и стабилизацию генетического материала. Одним из них является система **репарации ДНК**, под которой понимают исправление повреждений или восстановление исходной нативной структуры ДНК. Системы репарации в клетках могут быть различными в зависимости от типов повреждения ДНК:

- 1) апуринизация — утрата пуринового основания (аденина или гуанина), которая блокирует работу ДНК-полимераз;
- 2) окислительное дезаминирование и алкилирование азотистых оснований, приводящие к мутациям типа замены оснований;
- 3) возникновение тиминовых димеров при ультрафиолетовом облучении, сопровождающееся возникновением ковалентных связей между соседними тиминами и блокировкой работы ДНК-полимераз;
- 4) ковалентная сшивка двух цепей ДНК вследствие разрыва фосфодиэфирных связей при ионизирующем облучении;
- 5) одно- и двунитевые разрывы в ДНК (разрывы сахарофосфатных связей).

Многие системы репарации умеют воспринимать как сигнал к действию одновременно целый спектр нарушений структуры ДНК. Как правило, клетки имеют несколько систем, отвечающих за репарацию ДНК. В геноме человека идентифицировано более 130 генов, продукты которых участвуют в процессах репарации.

Системы репарации можно подразделить на несколько общих типов:

- Прямое ферментативное исправление конкретных повреждений ДНК.
- Вырезание азотистых оснований или целых нуклеотидов, с последующим удалением и заменой цепи ДНК.
- Использование рекомбинации с неповрежденной цепочкой ДНК, с помощью которой замещается поврежденный участок.

- Путь негомологичного соединения концов, склеивает двуцепочечные «рваные концы».

Ферменты, удаляющие из ДНК азотистые основания, называются гликозилазами и лиазами.

Гликозилазы узнают и напрямую удаляют из ДНК урацил и алкилированные основания. У млекопитающих известно более 10 различных гликозилаз. Фермент урацил-ДНК-гликозилаза узнает урацил в ДНК, который появляется за счет спонтанного дезаминирования цитозина. Гликозилаза его узнает и удаляет. Это происходит следующим образом: урацил «выскакивает» из спирали ДНК в активный сайт гликозилазы. Механизм удаления алкилированных оснований имеет сходный принцип. Реактивационная метилтрансфераза катализирует перенос метильных и этильных групп с алкилированного азотистого основания на собственные остатки цистеина. У человека фермент алкиладенин-ДНК-гликозилаза (ААГ) удаляет целый спектр алкилированных субстратов, в том числе 3-метиладенин, 7-метилгуанин, гипоксантин. Также у *E.coli* и у человека есть фермент, который использует окислительный механизм. В 1-метил-аденине метильная группа CH_3 окисляется до CH_2OH , и отделение формальдегида (HCHO) возвращает аденин. Этот же фермент может исправлять такую же модификацию азотистого основания в рРНК. Это первый обнаруженный вариант репарации РНК.

За удалением в ДНК азотистого основания следует эксцизия фосфодиэфирного остова эндонуклеазой, синтез ДНК ДНК-полимеразой для заполнения образовавшейся брешы и соединения концов ДНК-лигазой.

5.1. Способы эксцизионной репарации в клетках млекопитающих

В клетке происходят более сложные реакции восстановления структуры ДНК, при которых поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК. При этом могут удаляться не только поврежденные участки, но и соседние с ними нуклеотиды (отсюда происходит термин *excision* — вырезание). Образовавшиеся брешы застраиваются по матрице неповрежденной ДНК, поэтому для эксцизионной репарации необходима комплементарная цепь ДНК. Все типы эксцизионной репарации имеют общие этапы.

1 этап. Распознавание повреждения. Например, ДНК-гликозилазы перемещаются по ДНК, выворачивают основание из спирали и оценивают его статус.

2 этап. Надрезание нити пентозофосфатного остова ДНК осуществляют эндонуклеазы. Они гидролизуют внутренние фосфодиэфирные связи

и расщепляют молекулу ДНК. Участвуют в репарации, рекомбинации и рестрикции.

3 этап. Эксцизия (вырезание) участка, содержащего повреждение.

4 этап. Репаративный синтез на неповрежденной матрице. Встраивание нуклеотидов проводят ферменты ДНК-полимеразы. Эукариоты имеют около 15 видов ДНК-полимераз, которые различаются по числу субъединиц, молекулярной массе, ассоциации с разными вспомогательными белками и функциональному назначению.

Основные типы эксцизионной репарации получили свои названия в зависимости от того, какие именно повреждения исправляются. Различают три вида эксцизионной репарации:

1. Эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER).
2. Эксцизионная репарация неспаренных оснований (mismatch repair, MMR).
3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), которая делится на глобальную и транскрипционную.

5.1.1. Эксцизионная репарация оснований (BER)

Мишенью этого типа репарации служат неправильно спаренные, алкилированные, окисленные основания. Этот тип повреждений не вызывает серьезных изменений в структуре двойной спирали, не приводит к нарушению репликации ДНК и остановке клеточного цикла, но служит источником мутаций.

Выделяют два пути BER репарации:

- 1) репарация длинными фрагментами (заплатками);
- 2) репарация короткими фрагментами (заплатками).

У млекопитающих запуск эксцизионной репарации производится прямым удалением поврежденного основания ДНК. Такое начало служит пусковым механизмом активации ферментов, которые вырезают и заменяют отрезок ДНК, содержащий поврежденный сайт.

Гликозилаза разрезает связь между поврежденным или неспаренным основанием и дезоксирибозой и удаляет его из ДНК. Некоторые гликозилазы являются еще и лиазами. Лиаза вносит разрыв в цепь ДНК с 3'-конца поврежденного нуклеотида, используя аминогруппу в качестве атакующей группы.

Дальнейший способ репарации зависит от того, какой из ферментов гликозилаза или лиаза удалил поврежденное основание.

Активность гликозилазы «подхватывает» эндонуклеаза APE, которая разрезает полинуклеотидную цепочку с 5'-стороны. Это привлекает репликативный комплекс, состоящий из ДНК-полимераз δ/ϵ , который использует одноцепочечный разрыв в ДНК в качестве стартовой точки деградации одной из цепей ДНК и её замещение новой молекулой ДНК (это т.н. ник-трансляция). Эти полимеразы связаны с белком PCNA (proliferating cell nuclear antigen), который удерживает полимеразы на матричной цепи ДНК: молекулы этого белка плотно взаимодействуют друг с другом, формируя замкнутое кольцо вокруг двойной спирали ДНК, и синтез идет до тех пор, пока фрагмент не достигнет нужной длины. Во время этого синтеза участок ДНК, ранее спаренный с тем, который служит матрицей для синтеза, вытесняется, образуя свободно свешивающийся фрагмент ДНК. Вытесненный материал удаляется эндонуклеазой FEN1. Фермент лигаза-1 сшивает цепь ДНК. Этот механизм называют «способом длинной заплатки».

Если в удалении азотистого основания задействована лиаза, то эндонуклеаза APE1 объединяется с ДНК-ПОЛ β для замены единственного нуклеотида; оставшийся разрыв сшивает лигаза-3. Такой механизм называют «способом короткой заплатки». Механизм распознавания поврежденных оснований обычно основан на том, что они нарушают структуру двойной спирали.

У человека известно заболевание, связанное с нарушением эксцизионной репарации — пигментная ксеродерма (ПС) (ген XP). Больные гиперчувствительны к солнечному свету. Фибробласты пациентов с XP не способны к эксцизии пиримидиновых димеров и других повреждений ДНК. Мутации, вызывающие ПС, картированы в 8 генах с названиями XP-A–XP-G. Белковый комплекс, содержащий продукты нескольких генов XP, отвечает за эксцизию тиминовых димеров. Он связывает ДНК в месте повреждения, цепи ДНК расплетаются за счет геликазной активности фактора транскрипции, входящего в состав этого комплекса. На следующем этапе репарации эндонуклеазы делают надрезы по обе стороны расплетенного участка. После этого фрагмент одной из цепей заменяется вновь синтезированным материалом. В тех случаях, когда тиминовый димер не был удален до репликации, требуется активность специальной ДНК-ПОЛ η (эта). Она относится к группе неточно работающих полимераз, не соблюдающих принцип комплементарности, поэтому и напротив тиминового димера вставляются любые нуклеотиды, что приводит к возникновению мутаций.

Эту полимеразу кодирует ген XPV, мутации в котором приводят к раку кожи.

5.1.2. Репарация несовершенных или неправильно спаренных оснований (*mismatch repair, MMR*)

С помощью этой системы репарации можно исправить неправильно спаренные нуклеотиды, возникшие в результате ошибок ДНК-полимеразы или спонтанных реакций, приводящих к заменам азотистых оснований.

Гены *MUT* кодируют белки системы репарации некомплементарных пар оснований. Выбор, в какой из цепей произвести замену нуклеотида для восстановления комплементарности, неслучаен. В полуметилированном состоянии обычно замена происходит в неметилированной цепи. Эта система репарации используется для удаления ошибок в новосинтезированной цепи ДНК. В случае неспаренных G-T или C-T белки *mut L* и *mut S* предпочтительно удаляют T.

Система белков *mut T, M, Y* борется с последствиями окислительных перегрузок. В этом случае единый типичный вариант химической модификации азотистых оснований — окисление гуанина до 8-оксогуанина. Белки *mut M* и *mut Y* — это гликозилазы, удаляющие азотистое основание из ДНК. После удаления остается апуриновый сайт, который узнает эндонуклеаза и запускается эксцизионная репарация.

Для удаления некомплементарных азотистых оснований необходимо различать дочернюю цепь ДНК и материнскую. При репликации ДНК *E.coli* процесс метилирования дочерней цепи отстает от её синтеза на метилированной матрице. Например, ошибка репликации приводит к несоответствию A-C. Димер белка *mut S* связывается с некомплементарным сайтом, привлекает ближайший к сайту палиндром GATC, с которым и связывается. Белок *mut M* режет неметилированную цепь GATC, после этого нуклеазы разрушают неметилированную цепь на интервале от GATC до ошибочного основания, т.е. эта цепь подвергается эксцизии. Новую цепь синтезирует ДНК-полимераза.

Также система *Mut S/Mut L* инициирует репарацию, возникающую из-за «проскальзывания» комплекса ферментов репликации по матрице ДНК, состоящей из цепи повторов (микросателлитов).

5.1.3. Эксцизионная репарация нуклеотидов (*NER*)

Это тип репарации исправляет пиримидиновые димеры, межнитевые сшивки и другие повреждения. У человека процесс NER осуществляется за счет координированной работы примерно 30 белков, последовательно

формирующих на ДНК комплексы переменного состава, из них семь белков — продуктов генов XP (*XPA–XPG*).

Выделяют два варианта NER, различающихся на уровне начального узнавания повреждения.

1. GG-NER (*global genome nucleotide excision repair*) — осуществляет поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, включая не-транскрибируемые участки и молчащий хроматин.

Этапы GG-NER у человека.

На ДНК формируются белковые комплексы XPA-RPA, которые движутся вдоль цепи, отыскивая повреждение. После распознавания повреждения XPA взаимодействует с комплексом белков TFIIH, который локально раскручивает ДНК. XPC удерживает комплекс ферментов NER на поврежденном участке ДНК, а ферменты XPF и XPG работают как ножницы: одноцепочечный разрыв с 3'-конца повреждения формирует эндонуклеаза XPG, а с 5'-конца повреждения — XPF. Образовавшаяся брешь заполняется ДНК-полимеразами δ/ϵ и сшивается ДНК-лигазой III.

2. TC-NER (*transcription-coupled nucleotide excision repair*) — осуществляет поиск и удаление объемных повреждений в транскрибируемых участках. Еще в 80-х годах было сформулировано представление о том, что транскрибируемая часть генома репарируется быстрее, чем молчащая, т.е. репарация транскрипционно-активных генов приоритетна. Это особенно касается транскрибируемой цепи и направлено для удаления помех для транскрипции. Причиной этого может быть связь ферментов репарации с РНК-полимеразой. Белок Rad3 (хеликаза) является компонентом фактора транскрипции, ассоциированного с РНК-полимеразой.

РНК-полимераза II останавливается в процессе транскрипции перед повреждением ДНК, ее распознают специальные белки (CSA-CSB), и она перемещается в сторону от повреждения без разрушения четвертичной структуры транскрипционного комплекса. Одновременно белки CSA-CSB привлекают компоненты репаративной системы XPA и TFIIH к месту повреждения ДНК и помогают сборке нуклеазного комплекса. Нуклеотиды поврежденной цепи вырезаются и брешь репарируется. После этого РНК-полимераза продолжает транскрипцию. У человека мутации в генах белков CSA и CSB вызывают синдром Коккейна. Каждая клетка имеет несколько способов исправления повреждений ДНК.

Системы рекомбинационной репарации задействуют активность ферментов, участвующих в генетической рекомбинации.

Пути рекомбинационной репарации могут помочь восстановить репликативную вилку после репарации или позволить репликативной вилке обойти повреждение.

Столкнувшись с повреждением вилка репликации прекращает движение. Репликативный аппарат частично разбирается. Это делает возможным сдвиг вилки назад, причем новые цепи ДНК образуют дуплекс.

После того, как повреждение исправлено, хеликаза инициирует восстановление репликативной вилки.

5.2. Система репарации двухцепочечных разрывов

Двухцепочечные разрывы могут быть последствием облучения. Главный механизм репарации таких разрывов называется негомологичным соединением концов (NHEJ). Белковые гетеродимеры Ku70 и Ku80 узнают рваные концы и образуют механическую опору для других ферментов и белков. Ключевой участник процесса — ДНК-зависимая протеинкиназа. Её мишень-белок Artemis, который в фосфорилированной форме может быть и экзо- и эндонуклеазой. Он обрезает одноцепочечные концы ДНК. ДНК-полимераза μ или λ реплицирует ДНК и соединяет концы ДНК-лигаза IV. Мутации по любому из перечисленных компонентов приводит к гиперчувствительности к радиации.

5.3. SOS-репарация

При множественных повреждениях ДНК в клетке может активироваться SOS-репарация у бактерий или сходные процессы у эукариот. Этот вид репарации запускается при очень большом количестве повреждений и заключается в появлении новых субъединиц ДНК-полимеразы у прокариот или новых ДНК-полимераз у эукариот, которые при работе не соблюдают принцип комплиментарности и могут во время репликации проходить поврежденные участки. В результате клетка может завершить репликацию, не активируя апоптоза, но выходит из нее с большим количеством мутаций.

У человека подобные, не точно работающие TLS-полимеразы (translesion DNA synthesis), например, участвуют в увеличении разнообразия антител.

Мутации в одной из TLS-полимераз, полимеразы η (eta), синтезирующей цепь напротив тиминового димера, приводят к мягкой форме пигментной ксеродермы XPV.

Множественные повреждения ДНК у многоклеточных организмов снижают темпы деления клеток или вызывают их гибель по типу апоптоза. С дефектами ферментов репарации связаны некоторые наследственные синдромы. Например, синдром Луи-Бар (атаксия–телеангиэктазия) развивается вследствие дефекта эндонуклеазы, которая в норме должна восстанавливать повреждения ДНК, вызываемые γ -облучением. Синдром характеризуется нарушением функций мозжечка и иммунной системы и повышенной чувствительностью к γ -облучению.

Часть повреждений ДНК не успевает репарироваться до репликации в случае большого числа повреждений. Такие нарушения могут исправляться с помощью рекомбинационной или репликативной репарации. Примером наследственного дефекта, связанного с репликативной репарацией, является синдром Блума. Он обусловлен нарушениями структуры гена, кодирующего ДНК-лигазу. Признаками этого синдрома являются очень низкий рост (нанизм), поражение кожи и повышенная частота возникновения опухолей лимфатических органов и желудочно-кишечного тракта. В том случае, если повреждения ДНК не устранены до момента транскрипции, в клетке осуществляется транскрипционная репарация. Повреждения в ДНК возникают каждую секунду, и особенно от этого страдают транскрипционно-активные участки. Репарация на месте активно транскрибируемых генов называется транскрипционной. Она обеспечивается белками, входящими в состав транскрипционного комплекса.

Наследственные дефекты белков транскрипционной репарации приводят к развитию синдрома Коккейна. Он характеризуется задержкой роста, аномалиями скелета и сетчатки глаза, микроцефалией, разрушением миелиновой оболочки нервных волокон, умственной отсталостью (табл. 8).

Синдромы, связанные с дефектами системы репарации ДНК, проявляются повышенной частотой развития опухолей, иммунодефицитами, преждевременным старением и другими специфическими симптомами. У пациентов отмечается повышенная чувствительность к воздействию мутагенных факторов (излучение, химические мутагены).

Таблица 8. Наследственные синдромы дефектов репарации у человека

Ген	Тип белка	Функции белка	Тип репарации	Болезни, вызванные дефектами белка
MSH2	Входит в состав MutSa комплекса	Распознавание не правильно спаренных оснований и внесение одонитевых разрывов вблизи них	Мисмэтч-репарация	Колоректальный рак
XP D	ДНК-геликаза	Компонент транскрипционного фактора TFIIIF	Эксцизионная	Пигментная ксеродерма
XP E	Белок DDB2	Распознавание повреждения и привлечение гистоновых метилтрансфераз	Эксцизионная	Пигментная ксеродерма
XP G	Эндонуклеаза	Внесение разрывов вблизи повреждений	Эксцизионная	Пигментная ксеродерма
XP V	ДНК пол η (эта)	Создание новой цепи напротив тиминовых димеров	Репликативная	Пигментная ксеродерма
AT	Протеинкиназа	Распознавание двуцепочечных разрывов ДНК, фосфорилирование и активация ферментов репарации	Рекомбинационная	Синдром Луи-Бар
BRCA2	ДНК-связывающий белок	Связывание с одноцепочечной ДНК, активация гомологичной рекомбинации, участие в репарации двунитевых разрывов	Рекомбинационная	Рак молочной железы, яичников и простаты
WRN	Белок синдрома Вернера	Присутствие геликазной и эндонуклеазной активности, участие в репарации двунитевых разрывов ДНК	Рекомбинационная	Синдром Вернера
BLM	Геликаза	В комплексе с топоизомеразой препятствует завершению рекомбинационной репарации кроссинговером между сестринскими хроматидами	Рекомбинационная	Синдром Блума
FANC	Несколько генов, среди которых убиквитинлигазы и ДНК-связывающие белки	Распознавание и участие в удалении поперечных сшивок в молекуле ДНК, привлечение TLS полимераз	Репликативная	Анемия Фанкони
LIG1	ДНК лигаза	Сшивание фрагментов ДНК	Репликация, эксцизионная репарация	46BR пациент

ЛИТЕРАТУРА

1. Генетика человека по Фогелю и Мотульски. Проблемы и подходы / под ред. М.Р. Спейчер, С.Е. Антонаракис, А.Г. Мотульски. — 4 изд. — СПб.: Изд.Н-Л, 2013. — 1056 с.
2. Клетки / Б. Льюин, Л. Кассимерис, В.П. Лингаппа, Д. Плоппер. — М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2011. — 951 с.
3. Льюин Б. Гены / Б. Льюин ; пер. с англ. под ред. Д.В. Ребрикова. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. — 896 с.
4. МакКонки Э. Геном человека / Э. МакКонки. — М.: Техносфера, 2008. — 288 с.
5. Медицинская биология и патология клетки : в 4-х ч. / М.А. Корженевская [и др.]. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2013. — 161 с.
6. Миронова Л.Н. РНК: синтез и функции : учебное пособие / Л.Н. Миронова, М.В. Падкина, Е.В. Самбук. — СПб.: Эко-Вектор, 2017. — 287 с.
7. Никитин А.Ф., Адоева Е.Я., Захаркив Ю.Ф. Биология клетки : учебное пособие / под ред. А.Ф. Никитина. — СПб.: Спецлит, 2014. — 166 с.
8. Основы генетики / У.С. Клаг, М.Р. Каммингс, Ш.А. Спенсер, М.А. Палладино. — М.: Техносфера, 2016. — 944 с.
9. Солвей Дж. Г. Наглядная биохимия : пер. с англ. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 160 с., ил.
10. Эллис С.Д. Эпигенетика. / Эллис С.Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. — М.: Техносфера, 2010. — 358 с. (Мир биологии и медицины)
11. Molecular Biology of the Cell / B. Alberts [et al.]. — 5th ed. — Garland Science, 2008. — 1267 p.

При подготовке рисунков использовали интернет-ресурсы свободного доступа:

www.cellbiology.ru
www.med.gen.by
www.nature.com
 medicaplanet.su
 www.ebio.ru