Министерство образования и науки,
молодежи и спорта Украины
Харьковский национальный университет
имени В. Н. Каразина

В. Ю. Джамеев
В. В. Жмурко
А. М. Самойлов

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДОВАНИЯ

Учебное пособие

Харьков
2011

УДК 577.2
ББК 28.070
Д 40

Рецензенты:

зав. кафедрой биохимии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, доктор биологических наук, профессор **Перский Е. Э.**;

зав. кафедрой экологии и биотехнологии Харьковского национального аграрного университета имени В. В. Докучаева, член-кор. УААН, доктор сельскохозяйственных наук, профессор **Пузик В. К.**

Рекомендовано к печати Ученым советом
Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина
(*протокол № 5 от 23.04.10*)

Джамеев В. Ю.

Д 40 Молекулярные механизмы наследования / Джамеев В. Ю., Жмурко В. В., Самойлов А. М. — Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2011. — 228 с.

ISBN 966-623-322-3

В учебном пособии излагается материал, касающийся вопросов хранения, наследования и реализации генетических программ. Книга предназначена для студентов, обучающихся на биологических факультетах многопрофильных и педагогических университетов и высших учебных заведениях медико-биологического профиля. Пособие может быть полезным и интересным для аспирантов, преподавателей, научных работников и всех, кто интересуется биологией.

УДК 577.2
ББК 28.070

© Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 2011
© Джамеев В. Ю., Жмурко В. В., Самойлов А. М., 2011
© Джамеев В. Ю., макет, 2011
© Дончик И. Н., макет обложки, 2011

ISBN 966-623-322-3

Глава 1

МАТЕРИАЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

БИОХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Особи каждого из существующих видов обладают определенным морфологическим и анатомическим строением, биохимическими особенностями, типом развития, поведенческими реакциями и т. д. Совокупность признаков и свойств, характерных для организма, называется **фенотипом**. Многие признаки варьируют в пределах нормы реакции, поэтому у разных особей одного вида могут быть неидентичными.

Фенотип определяется генетической структурой (генотипом), но окончательно формируется в процессе взаимодействия генотипа с внешней средой. Две особи с абсолютно идентичным генотипом (например, однояйцевые близнецы) могут иметь фенотипические различия, в особенности, если их развитие протекало в разных условиях.

Генотип, по сути, является информацией, которая может быть по-разному выражена в конкретных условиях. Помимо внешних условий, на фенотипическое проявление генотипа влияет генетический фон, то есть совокупность аллелей гена или группы генов, участвующих в формировании какого-либо признака. Генетическая информация, записанная в виде последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот, содержит сведения обо всех признаках и свойствах организма и передается из поколения в поколение, обеспечивая существование вида как целостной специфической системы.

Фенотип (от греч. phaino — **являю и** typos — **отпечаток, форма, образец**). Совокупность всех морфологических и физиологических признаков индивидуального организма, которые определяются генотипом. Представляет результат взаимодействия генотипа и среды. Фенотип не всегда является полным выражением генотипа, поскольку факторы среды оказывают сильное воздействие на проявление наследственных признаков.

Генотип (от греч. genos — **род, происхождение** и typos — **отпечаток, форма,** образец). Совокупность генов организма (ядерных, митохондриальных, пластидных), которые следует рассматривать не как механический набор, а как единую систему, в которой любой ген может находиться в сложном взаимодействии с остальными генами.

Природа молекул, несущих генетическую информацию, долгое время была предметом научного спора. До 40-х годов 20-го столетия внимание биохимиков было сосредоточено в основном на изучении белков. Действительно, белки — это сложнейшие молекулы, выполняющие огромный спектр важнейших функций. Поэтому неудивительно, что универсальность этой макромолекулы послужила основанием для приписывания ей также и функции хранения наследственной информации. Нуклеиновыми кислотами в то время занимались немногие. Ученым нуклеиновые кислоты казались слишком просто устроенными, чтобы выполнять какие-то более важные функции, кроме структурных. Тем не менее, в 1944 году американский микробиолог Освальд Эвери и его сотрудники сделали важное открытие. Они показали, что генетические свойства пневмококков могут быть специфически изменены с помощью нативной высокомолекулярной ДНК. В основе работы научной группы Эвери использовалась идея эксперимента, проведенного Фредом Гриффитом в 1928 году.

Гриффит изучал процесс трансформации у бактерий. Уже тогда было известно, что прокариоты способны обмениваться генетическим материалом. Исследователь использовал два штамма пневмококков — вирулентный и авирулентный. При введении мышам вирулентных пневмококков грызуны погибали. Инъекции препаратами, содержащими авирулентный штамм или убитые клетки вирулентных бактерий, не вызывали гибели мышей. Но если мышам вводили смесь авирулентных пневмококков с убитыми клетками вирулентных, животные погибали, а в их трупах обнаруживали живые вирулентные клетки бактерий (рис. 1-А). Гриффит пришел к выводу, что часть генетического материала проникла из убитых вирулентных бактерий в авирулентые и сделала их вирулентными.

Продолжая данный эксперимент, Эвери с сотрудниками поставили перед собой цель выяснить химическую природу вещества, за счет которого происходит трансформация у бактерий. Для этого ученые разрушили вирулентные клетки пневмококка и фракционировали их на компоненты: углеводы, липиды, белки

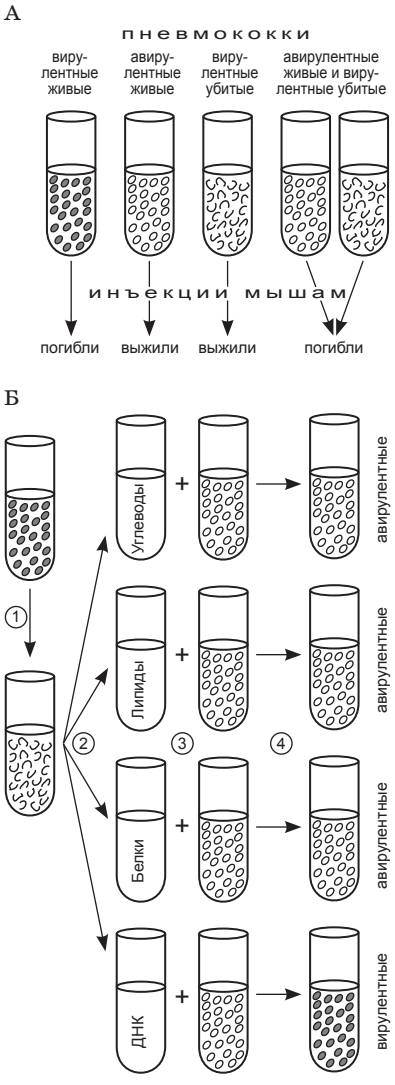


Рис. 1. Эксперименты Ф. Гриффита (А) и О. Эвери (Б):
1) разрушение вирулентных пневмококков;
2) фракционирование веществ;
3) добавление фракций к авирулентным пневмококкам;
4) идентификация вирулентности пневмококков в полученных смесях

и ДНК (рис. 1-Б). Затем каждую из этих фракций добавляли в отдельные культуры авирулентных клеток пневмококков. Из четырех культур только в культуре с ДНК были обнаружены живые вирулентные клетки. Таким образом, было установлено, что только ДНК способствовала приобретению вирулентных свойств авирулентными бактериями.

Это было первое сообщение об участии ДНК в процессах хранения и передачи генетической информации. Выводы Эвери не сразу были приняты научным миром. Под сомнение ставили чистоту препарата ДНК, считая, что он содержал примеси «наследственного» белка. Кроме того, многие биологи того времени не считали бактерии «настоящими» организмами и попросту проигнорировали выводы о том, что ДНК бактерий содержит генетическую информацию. Тем не менее, открытие Эвери послужило стимулом для детального изучения ДНК, и вскоре были получены иные доказательства роли этой молекулы в механизмах наследования и реализации генетической информации.

Параллельно с поиском прямых доказательств того, что ДНК выполняет функцию хранения генетической информации, обсуждались теоретически возможные способы воспроизведения информационных молекул, что необходимо для процессов насле-

дования, а также варианты реализации генетической программы. Поскольку и то, и другое, так или иначе, связано с процессами биосинтеза, главной задачей было сформулировать и обосновать принципы синтеза молекул таких сложных веществ, как белки и нуклеиновые кислоты, независимо от того, какие из них несут генетическую информацию. Это достаточно важный вопрос, так как он позволяет делать заключения не только о том, как собственно протекает синтез сложных веществ, но может помочь понять механизмы наследования и реализации генетической программы.

СИНТЕЗ МОЛЕКУЛ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ СЛОЖНОСТИ

Синтез молекул в клетках контролируется белками-ферментами. Белки — сложные молекулы, которые обладают уникальной трехмерной структурой, формирующей специфические участки связывания. У ферментов такими участками являются реакционные центры, в которых определенным образом ориентируются молекулы субстрата, и аллостерические центры, связывающие низмолекулярные соединения, регулирующие активность ферментов. Также ферменты могут иметь участки, обеспечивающие белок-белковые взаимодействия, необходимые для образования четвертичной структуры ферментативных комплексов или связывания регуляторных белков (например, кальмодулина, шаперонов и др.). Расположение групп в реакционном центре фермента таково, что они способны влиять на электронную структуру субстрата, снижая энергию активации катализируемой реакции, увеличивая, таким образом, в значительной степени ее скорость.

Специфичность ферментов абсолютно достаточна для осуществления синтеза **молекул малого и среднего размера**, поскольку субстраты занимают строгую пространственную ориентацию в реакционных центрах, а размеры молекул субстрата позволяют ферменту оказывать на них стереоспецифическое воздействие.

Высокомолекулярные полимерные соединения значительно превышают размеры фермента, поэтому фермент может влиять только лишь на ограниченный участок молекулы субстрата. Это главная характерная черта взаимодействия фермента и высокомолекулярного субстрата. Особенности синтеза полимерных мо-

лекул связаны со степенью сложности их строения. Все полимеры можно разделить на следующие типы:

а) гомополимеры:
   — неразветвленные (целлюлоза, амилоза);
   — разветвленные (амилопектин, гликоген);
б) гетерополимеры регулярного строения;
   — неразветвленные и разветвленные (гемицеллюлозы, пектиновые вещества);
в) гетерополимеры нерегулярного строения (белки, нуклеиновые кислоты).

Синтез **неразветвленных гомополимеров** контролируется одним ферментом, который катализирует образование однотипной связи между молекулой затравкой с очередным мономером. Например, фермент крахмал-синтаза катализирует образование α(1→4) связи между остатком глюкозы и растущей α-1,4-глюкановой цепью. В результате действия крахмал-синтазы образуется амилоза. Для синтеза амилопектина, **разветвленного гомополимера**, необходимо уже два фермента: крахмал-синтаза и α-1,4-глюкан-ветвящий фермент. Ветвящий фермент переносит участок α-1,4-глюкановой цепи на неконцевой гликозильный остаток этой же или соседней α-1,4-глюкановой цепи, образуя α(1→6) связь. Иногда в синтезе разветвленных гомополимеров участвуют более двух ферментов. В семенах кукурузы обнаружен полисахарид фитогликоген, отличающийся от амилопектина более высокой частотой ветвления. В его синтезе принимает участие третий фермент — амилопектин-ветвящая гликозилтрансфераза, увеличивающая степень ветвления амилопектина.

Синтез **гетерополимеров регулярного строения** изучен недостаточно полно, и до сих пор не существует четких представлений о синтезе таких гетерополимеров, как, например, гемицеллюлозы и пектиновые вещества. Вероятно, первым этапом их синтеза является образование гомополимерных цепей, затем ряд мономеров подвергается модификации (изомеризация и изменение степени окисления мономеров, присоединение групп и т. д.). Последним этапом является ветвление молекул. Процессы модификации мономеров и ветвления, вероятно, чередуются в различном порядке. Существуют также предположения, что гетерополимеры могут быть образованы путем сшивки ранее синтезированных разнокачественных гомополимерных цепей.

Нерегулярные гетерополимеры содержат несколько видов мономерных остатков (нуклеиновые кислоты — четыре, белки —

двадцать). Их количество и положение в полимерной цепи в разных молекулах сильно варьирует. Синтез этих полимеров очень сложен и не может быть осуществлен только за счет ферментов.

КОНЦЕПЦИЯ МАТРИЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Белок — это самая сложная биоорганическая молекула. Она выполняет массу функций: образует клеточные структуры, катализирует биохимические реакции, обеспечивает транспорт, движение, рецепцию, трансдукцию сигналов и др. Такое разнообразие выполняемых функций возможно только благодаря чрезвычайно сложной структурной организации белков. О сложности строения можно судить уже по его первичной структуре. Осознание этого привело к тому, что возникла **идея о существовании матрицы, которая служит неким шаблоном для синтеза белка.**

Почему же специфичности ферментов не хватает для обеспечения синтеза белка?

Аминокислоты в белке соединены однотипными пептидными связями, и предполагалось, что в образовании этих связей участвует один или несколько ферментов. Однако катализировать образование пептидной связи — еще не значит определять последовательность аминокислот в белке, и вряд ли она может быть обеспечена только ферментативным контролем. Теоретически допускалось, что для каждой аминокислоты молекулы белка может существовать специфический фермент, который помещает ее в нужное место. Но для синтеза каждого белка необходимо было бы столько ферментов, сколько содержится в нем аминокислот. Учитывая разнообразие белков, трудно представить существование столь сложного и громоздкого материального обеспечения такого важ-

Матрица — молекулярная основа для синтеза комплементарной копии макромолекул с нерегулярной структурой. Синтез ДНК или РНК осуществляется непосредственно на матрице. Белок не может синтезироваться непосредственно на кодирующей его мРНК ввиду комплементарного несоответствия матрицы и продукта матричного синтеза. Однако благодаря существованию триплетного генетического кода и транспортной РНК, которая опосредует взаимодействие мРНК с аминокислотами, возможно использование мРНК в качестве матрицы для синтеза полипептидов.

ного участка биосинтеза. Тем более, что для синтеза ферментов понадобился бы тоже набор ферментов, которые также являются белками и т. д. То есть количество необходимых ферментов увеличивалось бы в геометрической прогрессии с огромным коэффициентом, так как средняя полипептидная цепь содержит 150–200 аминокислотных остатков. Эту трудность можно обойти одним допущением: предположить полифункциональность ферментов, причем это свойство должно было выражаться в способности одного фермента катализировать десятки и даже сотни различных реакций. Такая полифункциональность и специфичность несовместимы друг с другом, и поэтому существование подобных ферментов невозможно. Таким образом, идея о том, что последовательность аминокислот в белке контролируется ферментами, оказалась неправомочной. Оставалось предположить, что существуют **матрицы**, определяющие последовательность аминокислот в полипептидных цепях белков, а сам синтез обеспечивается небольшим набором ферментов.

СВОЙСТВА МАТРИЦЫ

Матрица участвует в синтезе сложных полимеров с нерегулярным строением, в том числе и в процессе воспроизведения самой себя. Она указывает последовательность включения мономеров, но сама при этом остается интактной, то есть не используется как субстрат при синтезе. Чтобы выполнять специфические функции, матрица должна обладать соответствующими свойствами.

1. **Матрица, на которой осуществляется синтез, должна быть** макромолекулой.
2. **Взаимодействие между матрицей и мономерами должно быть** основано на слабых связях. Но для образования слабых связей необходимы определенные расстояния между взаимодействующими группами. Следовательно, контактные участки матрицы должны соответствовать по размеру мономерным единицам и быть комплементарными для специфического узнавания.
3. **Специфичность взаимодействия** матрицы и мономеров должна обеспечивать достаточную точность воспроизведения информации в процессе репликации.

Типы слабых связей

Ван-дер-ваальсовы силы. При сближении двух любых атомов между ними возникает неспецифическое притяжение, которое называется ван-дер-ваальсовым взаимодействием. Сила взаимодействия между атомами возрастает при сокращении расстояния, а при достижении максимальной силы взаимодействия дальнейшее сближение атомов приводит к возникновению ван-дер-ваальсовых сил отталкивания (за счет взаимопроникновения электронных оболочек). Расстояние, на котором уравновешиваются силы притяжения и отталкивания, называют ван-дер-ваальсовым радиусом.

Ван-дер-ваальсовы силы по величине энергии близки к энергии теплового движения (примерно 4 кДж/моль). Они возникают между молекулами любых типов: и полярными, и неполярными. Многие молекулы, будучи в целом электронейтральными, могут поляризоваться вследствие смещения электронной плотности под влиянием электроотрицательных атомов, то есть центры положительного и отрицательного заряда могут не совпадать. Такие молекулы обладают дипольным моментом, то есть разные полюса молекулы несут частичные положительные и отрицательные заряды. Индуцированные диполи могут взаимодействовать между собой в рамках одной молекулы, а также с другими диполями и заряженными частицами.

Такой вид взаимодействий имеет важное биологическое значение, так как он обусловливает взаимную пространственную ориентацию молекул и играет существенную роль во взаимодействии молекул и процессах самосборки биологических структур.

Водородная связь образуется между двумя электроотрицательными атомами через атом водорода, который ковалентно связан с одним из этих атомов. Очень важный тип связи для биологических систем, поскольку дисперсная среда живого — это вода, а молекулы воды тоже способны к образованию водородных связей. Именно в водной среде макромолекулы приобретают правильную ориентацию и нативную конформацию. Энергия водородной связи больше ван-дер-ваальсовой — 12–30 кДж/моль, но значительно меньше ковалентной. Для биологических систем наиболее важными являются водородные связи, которые образуются за счет атомов водорода, ковалентно связанных с атомами кислорода (O–H) или азота (N–H). Эти же атомы чаще всего выступают в качестве электроотрицательных акцепторов.

Ионные связи возникают между двумя заряженными частицами. В живых системах эти связи чаще образуются между заряженными группами макромолекул и ионами, то есть ионы выступают в качестве противоионов заряженных групп макромолекул. Также ионные взаимодействия могут образоваться между противоположно заряженными группами одной белковой молекулы. К примеру, структура глобулярного белка может стабилизироваться за счет солевых мостиков, образованных противоположно заряженными аминокислотными остатками. Важным является взаимодействие между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными «хвостами» гистонов. Это играет роль в процессах компактизации ДНК и регуляции генной экспрессии.

Гидрофобные связи рассматривают в связи с сильно выраженной способностью воды отталкивать неполярные группы. По сути, это даже не связи, а неспецифические гидрофобные взаимодействия, которые определяются изменением структуры воды при внедрении в нее неполярных групп. Вблизи неполярных групп уменьшается подвижность молекул воды, в результате чего они упорядочиваются в кластерные структуры, то есть формируется кристаллическая решетка воды. При этом значительно увеличивается свободная энергия и данная система, состоящая из молекул воды и неполярных соединений, переходит в неустойчивое состояние. Неполярные группы будут стремиться расположиться таким образом, чтобы минимально контактировать с водой. Следовательно, гидрофобные взаимодействия определяются ван-дер-ваальсовыми силами, возникающими между неполярными группами в водной среде. Таким образом, гидрофобные силы являются комбинированными. Они важны для поддержания структуры мембран и белков. Полярные липиды, обладая амбивалентными свойствами, образуют стабильную бислойную структуру — элементарную мембрану. У растворимых белков не менее половины боковых групп аминокислотных остатков имеют неполярный характер. Именно наличие большого количества неполярных групп способствует высокой стабильности глобулярных белков в водной среде.

Избирательность взаимодействия

Практически любые биоорганические молекулы способны взаимодействовать друг с другом. Тем не менее, при наличии огромного разнообразия веществ в клетке наблюдается строгая упорядоченность взаимодействия, некая их «осмысленность». Ферменты узнают субстрат, структурные молекулы укладываются в агломераты, образуя клеточные структуры, антитела связывают антигены, гормон взаимодействует с рецептором и т. д.

Межмолекулярные взаимодействия осуществляются за счет слабых взаимодействий. Однако для того, чтобы эти взаимодействия были эффективными, необходимо образование множества связей. Слабые силы приобретают максимальные значения, если взаимодействующие группы находятся на соответствующих расстояниях друг от друга. Чтобы соблюсти указанные условия (расстояние и множественность связей), необходимо иметь две комплементарные поверхности. Таким образом, наличие комплементарных поверхностей лежит в основе избирательности взаимодействия биомолекул.

Итак, для понимания сущности избирательности взаимодействия следует помнить следующее:

1) молекулы взаимодействуют друг с другом, образуя связи разной силы;
2) чем прочнее сила связи возникает между молекулами, тем большая вероятность установления некой особой пространственной ориентации относительно друг друга;
3) наиболее прочная связь устанавливается между молекулами, имеющими комплементарные поверхности;
4) комплементарные поверхности обеспечивают образование максимального числа слабых связей, поэтому являются основой избирательности взаимодействия.

МОЖЕТ ЛИ БЕЛОК ВЫПОЛНЯТЬ РОЛЬ МАТРИЦЫ?

Поскольку белки из всех биомолекул являются самыми сложными, то они оказались первыми претендентами на роль матриц. Кроме того, белки были обнаружены в хромосомах и существовало предположение, что гены состоят из белков, а нуклеиновые кислоты выполняют вспомогательную структурную роль. От этой идеи впоследствии отказались, однако, почему все-таки белки не могут выполнять роль матрицы?

Если бы белок был матрицей, то непосредственно на нем не могло бы происходить узнавание однотипных боковых групп аминокислот. Во-первых, однозаряженные группы не притягиваются друг к другу, а наоборот, отталкиваются. Что касается неполярных групп, то они все способны взаимодействовать, но при этом не будет наблюдаться специфичности. К примеру, боковая группа аланина может притянуть к себе не только однотипную группу аланина, но также и валина, лейцина, изолейцина и др.

Можно предположить существование гипотетической белок-синтезирующей системы, которая в качестве матрицы использует молекулу белка (рис. 2). Для этого необходимо 20 ферментов, которые имеют две идентичные поверхности, комплементарные одной аминокислоте. С одной стороны фермента должен связываться очередной аминокислотный остаток белка-матрицы, с другой стороны — такая же свободная аминокислота. Одновременное узнавание остатка и аминокислоты должно быть сигналом для образования пептидной связи между очередной (свободной) аминокислотой и карбокситерминальной аминокислотой растущей полипептидной цепи синтезируемого белка. Если к этой модели добавить еще несколько ферментов, выполняющих сопутствующие функции, то она получилась бы не сложнее реально существующей белок-синтезирующей системы. Более того, существование такой системы привело бы к упрощению

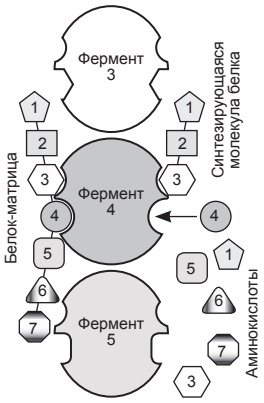


Рис. 2. Гипотетическая модель несуществующей белок-синтезирующей системы, которая использует молекулы белка в качестве матрицы. Существование такой системы невозможно из-за недостаточной специфичности ван-дер-ваальсовых взаимодействий

химической организации жизни, так как синтез белка и воспроизведение матриц обеспечивалось бы не двумя, а одним процессом. Тем не менее, такого «оптимального» механизма в природе не существует.

По мнению молекулярных биологов, для успешного функционирования такой гипотетической системы не хватит точности воспроизведения информации, что может привести к высокой степени мутирования. По различным оценкам частота ошибок при воспроизведении генетического материала не должна превышать 10^{-8}. Превышение этой цифры грозит элиминацией вида. В существующих биологических системах частота ошибок при репликации ДНК оценивается как 10^{-9}, что обеспечивает достаточную степень надежности воспроизведения генетической информации из поколения в поколение.

Точность распознавания ферментами близких по структуре аминокислот намного ниже необходимой для воспроизведения генетической матрицы. Фермент может ошибиться в распознавании аминокислот, различающихся в одну метиленовую группу ($-CH_2-$), например, таких пар, как валин–изолейцин или глицин–аланин, с частотой 10^{-6} и выше. Таким образом, белок не соответствует всем требованиям, предъявляемым к матрице, и поэтому не может выполнять ее роль.

ЦЕНТРАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДОГМА

В настоящее время известно то, что генетическая информация хранится в молекулах ДНК. ДНК способна к саморепликации, что обеспечивает наследование признаков в последующих поколениях. Реализация генетической информации осуществляется, главным образом, за счет двух основных механизмов — транскрипции и трансляции. ДНК служит матрицей для синтеза разных видов РНК, а информационная РНК, в свою очередь, служит матрицей для синтеза белка. Такое представление о потоке информации в биологических системах лежит в основе **центральной биологической догмы**. Ее можно выразить с помощью такой схемы:

$$\text{ДНК} \xrightarrow{\textit{транскрипция}} \text{РНК} \xrightarrow{\textit{трансляция}} \text{белок}$$

Однако механизмы наследования и реализации генетических программ выходят за пределы только лишь процессов синтеза РНК и белков.

Изучение генетических механизмов у вирусов показало, что хранение информации может осуществляться в виде РНК, но для процессов репликации, которая осуществляется в зараженных клетках хозяина, РНК-содержащим вирусам необходимо синтезировать ДНК. Этот процесс катализируется ферментом, получившим название **обратная транскриптаза (ревертаза)**. Для синтеза белка матрицей служит информационная РНК. Таким образом, в случае РНК-содержащих вирусов поток информации имеет следующий вид:

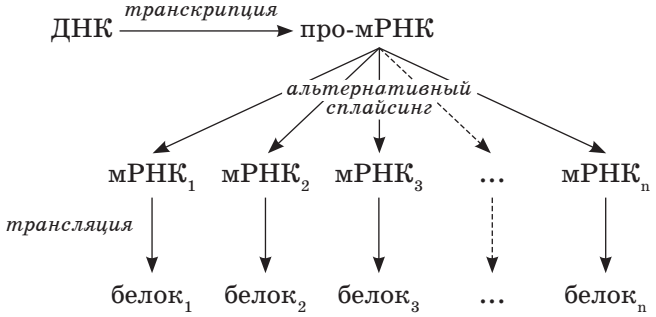
$$\text{РНК} \xrightarrow{\textit{обратная транскрипция}} \text{ДНК} \xrightarrow{\textit{транскрипция}} \text{РНК} \xrightarrow{\textit{трансляция}} \text{белок}$$

В отличие от бактерий эукариотические организмы в процессах синтеза белка не используют вновь синтезированную РНК.

После транскрипции предшественницы матричных РНК подвергаются процессингу, в ходе которого про-мРНК модифицируется. Ряд модификаций необходим для стабилизации зрелой мРНК и не затрагивает кодирующую область. Однако у большинства белок-кодирующих транскриптов помимо стабилизирующих модификаций происходит удаление части нуклеотидных последовательностей — в процессе сплайсинга из кодирующей области вырезаются интроны. Видоизмененная (зрелая) мРНК вовлекается в трансляцию. Предложенная далее схема не содержит упоминание о процессинге в целом, так как некоторые механизмы, входящие в это понятие, не влияют на смысловую (кодирующую) часть транскрипта.

ДНК —*транскрипция*→ про-мРНК —*сплайсинг*→ мРНК —*трансляция*→ белок

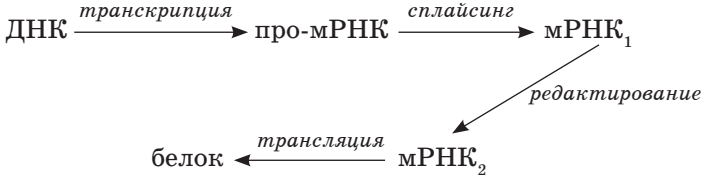
В последние десятилетия накопилось много сведений о широко распространенном в природе явлении, известном как альтернативный сплайсинг, при котором молекулы про-мРНК, транскрибированные с одного и того же гена, могут быть преобразованы в различные мРНК. Это достигается в том случае, если часть интронов остается в составе зрелой мРНК или, наоборот, удаляются некоторые экзоны. Также в ходе данного явления могут удаляться или появляться альтернативные стоп-кодоны, что отражается на длине кодируемого белка.



Продукты альтернативного сплайсинга могут кодировать белки с одинаковыми свойствами, но при этом с различной внутриклеточной локализацией. Кроме того, возможно образование белков, различающихся свойствами. Функциональная активность белковых продуктов может проявляться с различной эф-

фективностью, а порой белки приобретают совершенно отличные функции или преобразуются в функционально неактивные. Альтернативный сплайсинг дает огромные возможности не только для тонкой регуляции метаболических процессов, но и является важным регуляторным механизмом, контролирующим переключение организма от одной стадии развития к другой.

Не менее важное значение для посттранскрипционной модификации информации имеет редактирование РНК (РНК-эдитинг). В процессе созревания молекулы мРНК могут подвергаться изменениям путем удаления, добавления и ковалентной модификации отдельных нуклеотидов. Это приводит к тому, что транслируемая информация со зрелого РНК-транскрипта будет отличаться от той, которая закодирована на соответствующем участке ДНК. Эти различия могут заключаться в замене аминокислот, сдвиге рамки считывания, появлении или исчезновении в определенных местах транскрипта инициирующих и стоп-кодонов. Открытие РНК-эдитинга стало возможным благодаря развитию высокоразрешающих методов анализа нуклеиновых кислот. Это явление, как было выяснено, связано с абсолютно строгими модификациями, обеспечивается активностью специализированного ферментативного аппарата и обусловлено генетически. Кроме того, в настоящее время показано, что РНК-редактирование является одним из универсальных генетических процессов, который характерен для многих систематических групп организмов.



Процесс редактирования РНК, по всей видимости, также может иметь альтернативный характер, как и сплайсинг. В любом случае, если нередактируемая нуклеотидная последовательность не имеет смысла или содержит искаженный смысл, то каждый конкретный случай редактирования РНК предполагает наличие «ошибки» в геноме, причем этот же геном содержит информацию о том, как ее исправить.

КОНФОРМАЦИОННАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ БЕЛКОВ. ПРИОНЫ

Наследование признаков в биологических системах может осуществляться не только за счет транскрипции, трансляции и множественных механизмов модификации транскриптов. Существует также феномен эпигенетической регуляции генов, которая основана на наследовании клеточными клонами пространственной структуры хроматина. Это свойство определяет явление дифференциации клеток, которое принципиально важно для существования многоклеточных организмов, имеющих ткани с различными функциональными свойствами и строением.

На уровне хроматина информацию несет не только ДНК, но и белки. В настоящее время разрабатывается концепция эпигенетического кода, который содержит информацию о состоянии хроматина в клетках организма на разных стадиях развития (этот вопрос будет обсуждаться в разделе «Механизмы клеточной памяти»).

Известен еще один способ наследования — наследование конформации белков, который осуществляется без участия нуклеиновых кислот. В этом случае отдельный белок выступает в качестве генетического детерминанта. Явление наследования конформации белковых молекул стало широко известно после открытия инфекционных белков — прионов. Как оказалось, некоторые глобулярные белки могут в присутствии прионов изменять свою конформацию, приобретая при этом свойства конформационных матриц. Характерной особенностью белков, обладающих прионными свойствами, является наличие специфических аминокислотных повторов на **N-конце полипептидной цепи. Иными словами**, наследование конформационной структуры белков имеет определенные ограничения, поскольку зависит от их первичной структуры.

ОТКРЫТИЕ ПРИОНОВ: НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В середине 50-х годов американский биолог Даниель Карлтон Гайдушек изучал в Новой Гвинее болезнь куру («смеющуюся смерть»), распространенную среди местных племен, у которых до того времени сохранился ритуальный каннибализм. Симптомы этой болезни выражались в прогрессирующем нарушении координации движений, сопровождавшемся приступами беспричинного смеха. Заканчивалась болезнь летальным исходом. Исследования куру в племени форе показали, что эта болезнь имеет нейродегенеративную природу. Гистологическое исследование клеток спинного и головного мозга умерших от куру людей позволило выявить спонгиоформную дегенерацию, атрофию и утрату нервных клеток. В клетках были обнаружены бляшки, получившие название амилоидов, поскольку предполагалось, что они состоят из веществ углеводной природы. Позже было показано, что амилоиды состоят из белка, который организуется в фибриллярные тяжи. У больных не были выявлены воспалительные реакции. Болезнь куру была признана инфекционной, а причиной ее распространения оказался ритуальный каннибализм. В качестве основного профилактического мероприятия Гайдушеком было предложено правительству Новой Гвинеи добиться полного отказа местного населения от каннибализма. Действительно, таким способом удалось значительно улучшить эпидемиологическую ситуацию среди коренного населения Новой Гвинеи.

Нейродегенеративными заболеваниями, как оказалось, могут болеть не только люди, но и другие млекопитающие. В 1959 г. Уильям Хэдлоу обратил внимание на сходство симптомов куру и скрэпи овец. Кроме дегенерации нервной системы и сопровождающих ее функциональных нарушений, для обеих болезней характерен длительный инкубационный период, длящийся годами. Вскоре удалось установить возможность передачи инфекции между разными видами. Гайдушек продемонстрировал, что шимпанзе может быть инфицирована куру. Первые симптомы заболевания у зараженных обезьян появились через два года. Показано, что болезнь скрэпи овец передается мышам. За выдающиеся успехи в исследовании нейродегенеративных заболеваний Д. К. Гайдушек в 1976 г. был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине «за открытие новых механизмов происхождения и распространения инфекционных заболеваний». Вместе с тем,

понимание природы инфекционности нейродегенеративных заболеваний было достигнуто несколько позже.

В 60–70-х годах бытовала гипотеза о том, что переносчиком нейродегенеративных заболеваний является «медленный» вирус, чем и объясняли продолжительный инкубационный период. Но выделить этот вирус не удалось. Вместе с тем, были показаны необычные свойства инфекционного начала, которое оказалось устойчивым к ионизирующим излучениям и ультрафиолетовому свету. Со временем акцент в изучении нейродегенеративных заболеваний переместился на белоксодержащие амилоиды, а инфекционную природу заболеваний стали ассоциировать с белком, образующим тяжи в нервных клетках больных. Вскоре была выдвинута гипотеза о том, что в распространении инфекции участвует только белок. Эта гипотеза получила название «protein only», которое так и переводится с английского — «только белок». В 1982 году американский молекулярный биолог Стенли Прусинер (Stanley Prusiner) открыл инфекционный агент нового типа и дал ему название **прион**. Этот термин составлен из первых слогов в словах «*pro*tein *in*fection» (белковая инфекция). Вероятно, для большей благозвучности были переставлены гласные буквы, в результате чего и образовалось не «proin», а «prion». Иногда слово прион рассматривают как производное от других букв того же сочетания: «*pr*otein infect*ion*». В любом случае, слово «прион» обозначает «инфекционный белок».

В настоящее время известен целый ряд нейродегенеративных прионных заболеваний у человека (куру, болезнь Кройцфельда—Якоба, синдром Герштона—Штресслера—Шейнкера, семейная смертельная бессонница) и животных (скрэпи овец и коз, аналогичные заболевания оленей, норок, мышей, крыс, хомяков, кошек). Наибольшую известность эти заболевания получили из-за случаев инфицирования людей, употребивших в пищу мясо коров, больных губчатой болезнью мозга, или BSE (bovine spongiform encephalopathy). Случаи летальных исходов среди инфицированных людей и длительный инкубационный период развития болезни объясняют опасения, связанные с распространением эпидемии коровьего бешенства в ряде стран Западной Европы.

Любое прионное заболевание может иметь три варианта возникновения:

а) инфекционный — путем трансмиссии инфекционного агента;
б) наследственный — предрасположенность к заболеваниям вследствие структурной особенности и/или копийности

белка (наличие мутаций, ауторепликация инфекционного агента);

в) спорадический, то есть возникновение заболевания, казалось бы, без видимых причин, когда не наблюдается ни наследственной предрасположенности, ни инфекции, хотя в каждом таком случае не исключается возможность того, что инфекция была приобретена одним из двух указанных выше способов.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПРИОННЫХ БЕЛКОВ

Общие сведения о конформации белков

Белок — основная функциональная молекула живого организма. Белки определяют форму клеточных структур, а у животных — и форму самих клеток; осуществляют ферментативный катализ, выполняют функцию узнавания, участвуют в передаче сигналов и многое другое. Молекула белка в химическом отношении представляет собой последовательность аминокислот, связанных между собой пептидными связями. Нескончаемое многообразие белков определяется комбинацией из 20 видов аминокислот.

Благодаря слабым водородным взаимодействиям, между группами **–NH– и =C=O структурируются определенные участки** молекулы, образуя α-спирали и β-слои. Белок таким образом приобретает вторичную структуру. Несмотря на то, что одинарные ковалентные связи полипептидных цепей позволяют свободное вращение по месту любой из этих связей, молекула принимает достаточно стабильную конфигурацию.

Существует два основных класса белков: глобулярные и фибриллярные. Структура глобулярных белков поддерживается преимущественно за счет слабых взаимодействий внутри молекулы, тогда как фибриллярные белки принимают определенную трехмерную структуру, образуя не только внутримолекулярные, но и большое количество межмолекулярных связей. По этой причине фибриллярные белки тяготеют к образованию агрегатов и являются намного более прочными молекулами, чем белки глобулярные. В составе фибриллярных белков, как правило, много остатков пролина, из-за чего структура молекулы не стремится к образованию α-спиралей. Также эти белки обогащены остатками глицина.

Третичная структура глобулярных белков поддерживается за счет взаимодействия боковых групп. Главным образом, молекулу глобулярного белка стабилизируют гидрофобные группы, большая часть которых ориентируется внутрь молекулы. Кроме того, третичная структура поддерживается за счет немногочисленных солевых (между противоположно заряженными группами) и ковалентных **S–S-мостиков. Немаловажное значение для стабильности** молекулы имеет сочетание структурированных (α-спирали и β-слои) и неструктурированных участков. Как правило, глобулярный белок состоит из нескольких доменов — высоко структурированных участков. Домены связаны между собой относительно открытыми участками полипептидной цепи, большей частью неструктурированными.

Молекулы белка теоретически могут иметь множество возможных конфигураций, однако большинство из них будут нестабильными и поэтому короткоживущими. В конкретных условиях (температура, количественный и качественный состав ионов) существует одна трехмерная структура белка, которая отличается от других существенно меньшей величиной свободной энергии, а значит, самая стабильная. Конформацию белка можно даже предугадать по его первичной структуре. Теоретически это можно сделать при помощи компьютерной техники, хотя и проблематично из-за огромного числа возможных вариантов. С открытием белков-прионов стало ясно, что белок не обязательно должен иметь единственную стабильную конфигурацию. Предположим, белок имеет две возможные стабильные конфигурации, причем *состояние 1* обладает большим количеством свободной энергии и, соответственно, менее стабильное, чем *состояние 2* (рис. 3). С точки зрения термодинамики система всегда стремится к уменьшению свободной энергии. Но это не значит, что молекула белка, находясь в *состоянии 1*, сможет легко приобрести *состояние 2*. Чтобы совершить переход из одного состояния в другое, молекуле часто необходимо преодолеть промежуточные состояния, которые невозможно достичь без затраты дополнительной энергии. Если же применить энергию или снизить необходимую энергию перехода каким-то способом (к примеру, путем взаимодей-

Рис. 3. Энергетическое состояние белковой молекулы и ее конформация (условная схема):
1 и 2 — наиболее стабильные состояния, характеризующиеся низкими значениями свободной энергии

ствия белка с другими частицами), возможно осуществить данный переход.

Подобные процессы часто происходят в клетках. Главным образом, изменение конфигурации белка осуществляется за счет его взаимодействия с особыми белками-шаперонами, которые помогают белкам приобрести необходимую конфигурацию. Кроме того, в клетках под воздействием внешних условий могут происходить и неблагоприятные устойчивые изменения конформации белков, приводящие к потере функций и заболеваниям.

Структура и свойства прионов

Прионы амилоидов, как показали исследования, оказались чрезвычайно стабильными белками, причем они проявляют устойчивость к различным воздействиям. Прионы не теряли своих свойств после кипячения в течение 30–60 минут и 2-летнего высушивания. Активность прионов сохранялась после воздействия различными видами излучения (ультрафиолетового и гамма-излучения). Прионы оказались в 3 раза более устойчивыми к замораживанию, чем вирусы. Незначительное влияние оказывает на эти белки воздействие химическими агентами: спиртами, формальдегидом, кислотами. Устойчивы они также и к действию многих протеолитических ферментов, различным химическим и физическим воздействиям в дозах, при которых денатурировали практически все другие белки. Иными словами, прионы погибают последними из всего живого.

Изучение структуры белка, входящего в состав амилоидных тяжей нервных клеток больных людей, показало, что это сиалогликопротеид с молекулярной массой 34 кД, состоящий из 254 аминокислот. Подобный белок обнаружен у всех исследованных млекопитающих. В клетках здоровых людей и животных найдены растворимые белки с точно такой же первичной структурой, как и соответствующие прионы, но обладают эти белки иными свойствами и строением.

Человеческий белок, с которым ассоциируются нейродегенеративные заболевания, называют PrP. Ген *PRNP*, кодирующий PrP, картирован в коротком плече 20-й хромосомы. Прионный белок амилоидов обозначают PrP^{Sc} (от ***scrapie*** — название нейродегенеративного заболевания овец), а его нормальный растворимый клеточный аналог, неболезнетворный и неинфекционный белок, — PrP^{C} (от ***cellular***, то есть клеточный). Различаются эти белки характером укладки полипептидной цепи, то есть вторич-

ной и третичной структурой. Главное отличие состоит в повышении доли β-слоев у инфекционной формы белка (табл. 1).

Увеличение количества β-слоев определяет приобретение белком особой конформации, которая способствует образованию упорядоченных полимеров — фибриллоподобных агрегатов. **Фибриллоподобная структура таких агрегатов объясняет значительную устойчивость прионной формы белка к различным воздействиям.** В клеточной форме белок не образует полимерных структур и выполняет свои функции. Приобретая инфекционную форму, прионы ассоциируются друг с другом в белковые тяжи. Когда прионы попадают в клетку, они вызывают конформационные преобразования своих клеточных аналогов. При этом сами прионы служат конформационной матрицей. (Гипотезы о возможных механизмах прионизации будут рассмотрены в разделе «Представления о механизмах прионизации».) Вновь образованные прионы также обладают инфекционными свойствами. Зараженная клетка передает свойство прионизации последующим поколениям (клону). Таким образом, прионы являются генетическими детерминантами белковой природы.

Характерным структурным элементом прионов является N-терминальный участок молекулы, состоящий из пяти восьмипептидных повторов, обогащенных глицином, глутамином, тирозином и триптофаном. Этот участок определяет прионные свойства белка. Он является консервативным и имеется (с незначительными модификациями) у всех прионов:

Pro (Gln\His) Gly Gly Gly (Gly\–) Trp Gly Gln.

Иногда удается обнаружить различное количество октапептидных повторов. Некоторые формы нейродегенеративных заболеваний ассоциируются с увеличением числа этих повторов за счет дополнительных 2–9 повторов.

Функциональная роль клеточной формы белка PrP^C пока не ясна, но, по-видимому, он необходим для нормальной синаптической функции. Наиболее высокая концентрация PrP^C обнаружена в нейронах, но его могут синтезировать и другие клетки

Таблица 1. Наличие элементов вторичной структуры у разных форм прионного белка PrP

Форма белка	Обозначение	Структурные элементы	
		α-спирали	β-слои
Клеточная	PrP^C	42 %	3 %
Инфекционная	PrP^{Sc}	30 %	43 %

организма. Известно, что PrP^C осуществляет в клетке циклическое передвижение. Он синтезируется в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, попадает в аппарат Гольджи и переносится с помощью экзоцитоза на поверхность клетки, прикрепляясь к клеточной мембране с помощью гликозил-фосфатидил-инозитольного хвоста. После этого он переносится в клетку с помощью эндоцитоза, а затем — обратно на поверхность. Этот цикл осуществляется за 60 минут. Недавно было показано, что PrP^C может связываться с ионами меди. Предполагается, что такой комплекс, с помощью эндоцитоза попадая в клетку, затем диссоциирует и ион меди переносится из эндоцитозного пузырька внутрь клетки в цитоплазму. Существуют и другие предположения. Считается, что прионы принимают участие в межклеточном узнавании и клеточной активации. Также им приписывается функция подавления возрастных процессов, так как прионные заболевания по своим клиническим и морфологическим характеристикам сходны с геронтологическими заболеваниями.

ПРИОНЫ ДРОЖЖЕЙ

Механизмы прионизации у млекопитающих изучать чрезвычайно трудно, потому что инфекция, вызванная PrP^{Sc}, в мозговой ткани развивается очень медленно. Однако в последние годы проводились интенсивные поиски прионоподобных белков у других групп организмов. Понятно, что у организмов, не имеющих нервной системы, невозможно обнаружить нейродегенеративные заболевания. Вместе с тем, используя сведения о первичной структуре прионов млекопитающих, можно вести направленный поиск белков у других организмов. Действительно, белки со сходными структурными участками могут обладать подобными функциями. Кроме того, у ряда микроскопических грибов известны некоторые цитоплазматические детерминанты, наследование которых не связано с геномом. Такие объекты являются потенциальными носителями белков-прионов, так как подобные явления могут быть связаны с наследованием измененной структуры белков.

Открытие одного из таких белков связано с именем британского ученого Б. Кокса, который изучал явление супрессии узнавания стоп-кодонов в процессе трансляции белков у дрожжей. Он обнаружил, что данный феномен связан с инактивацией

факторов терминации, узнающих стоп-кодоны (или нонсенсы, то есть незначащие кодоны), в результате чего синтез белка на мРНК не прекращается по достижению рибосомами стоп-кодонов. Это явление получило называние **нонсенс-супрессии**, а гипотетический супрессор узнавания стоп-кодонов обозначили как **[PSI]-фактор**.

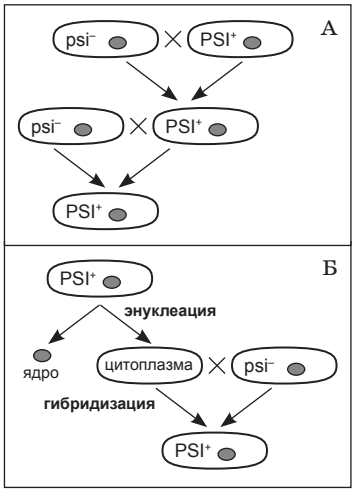


Рис. 4. Наследование цитоплазматического детерминанта [PSI]-фактора (нонсенс-супрессии):
А — наследование PSI не обнаруживает менделевского расщепления;
Б — PSI наследуется через цитоплазму

Инактивация белка, как известно, может быть вызвана двумя причинами: мутацией гена (изменением, соответственно, первичной структуры белка) или модификацией немутантного белка. Наследование признака, изучаемого Коксом, не обнаруживало менделевского расщепления и передавалось через цитоплазму (рис. 4-А). Инфекционность PSI-фактора можно показать, передавая при гибридизации только цитоплазму дрожжей, разрушив или удалив предварительно ядро (рис. 4-Б). При этом вместе с цитоплазмой передается и свойство нонсенс-супрессии.

Долгое время не удавалось понять физическую природу наследования нонсенс-супрессии. Только в 90-х годах прошлого века нашли объяснение этому явлению.

Молекулярный механизм нонсенс-супрессии

В 1995 году было показано, что фактор нонсенс-супрессии [PSI] является продуктом гена *SUP35* (от английского — *sup*pression), который оказался фактором терминации eRF-3. Этот белок состоит из трех доменов (рис. 5):

1) **N-концевой домен имеет характерные аминокислотные** повторы, обогащенные глицином (напоминающие повторы в белке PrP), и необходим для возникновения прионной конформации;
2) **С-концевой домен связан с функцией терминации трансляции**, очевидно, поэтому эволюционно консервативен;

3) **средний домен М обладает высоким зарядом и не имеет** никакой незаменимой функции.

N-концевой домен не является необходимым для терминации трансляции. Путем делеционного анализа показано, что удаление 50 аминокислот в этом участке не отражается на жизнеспособности клеток, но при этом белок теряет свойства приона.

Белок eRF-3 имеет два участка связывания с другим фактором терминации eRF-1 — продуктом гена *SUP45*. Один расположен в С домене, а второй — в N и М доменах. Оба белка составляют единый функциональный комплекс. Фактор терминации eRF-1 узнает все три стоп-кодона, а eRF-3 обладает GTP-азной активностью, которая зависит от его взаимодействия с рибосомой и eRF1, и обеспечивает гидролиз пептидил-тРНК.

Как и прионы млекопитающих, белок eRF3 может находиться в двух формах: клеточной и прионной. Прионная форма белка eRF3 определяет нонсенс-супрессию и наследуется цитоплазматически.

Если агрегаты прионизированного eRF-3 попадают в клетку, к ним присоединяется клеточная форма этого белка, а его конформация изменяется на прионную. Находясь в агрегированном состоянии, eRF-3 не может участвовать в механизме терминации. В результате стоп-кодоны не воспринимаются белок-синтезирующим аппаратом как сигнал терминации. Вместо прекращения синтеза происходит прочтение стоп-кодона как значащего, в синтезирующуюся полипептидную цепь встраивается аминокислота (чаще серин), и синтез продолжается дальше. Таким образом, зараженные клетки приобретают нонсенс-супрессорный фенотип.

В формировании образующихся белковых агрегатов участвует не только белок eRF-3, но и eRF-1, который не является прионом. Тем не менее, за счет взаимодействия двух факторов терминации eRF-1 тоже встраивается в агрегат. Эта особенность усиливает эффективность нонсенс-супрессии.

Впоследствии у дрожжей был обнаружен ряд прионных белков, причем большинство из них были открыты путем функционального анализа, как и PSI-фактор. Поэтому для клеточных форм мно-

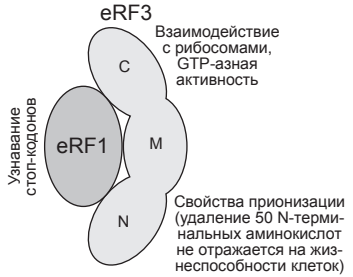


Рис. 5. Факторы терминации бактерий eRF3 и eRF1 и их свойства

гих дрожжевых прионов, в отличие от животных, известны выполняемые ими функции.

Итак, конформационная наследственность не является прерогативой млекопитающих и не ограничивается прионами, вызывающими нейродегенеративные заболевания. Явление конформационной наследственности имеет общебиологическое значение и, по всей видимости, имеет широкое распространение в живом мире. Извлекают ли организмы какую-то выгоду от конверсии прионов, или прионизация приносит только функциональные нарушения, которые приводят к неизлечимым заболеваниям и летальным исходам у млекопитающих, пока не известно.

ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ ПРИОНИЗАЦИИ

В настоящее время существует несколько предположительных моделей о механизме прионизации, который лежит в основе негенетического наследования конформационного состояния белков (рис. 6). Эти модели рассматривают два основных состояния белка: **S — растворимая форма и A — агрегатная. S-форма** соответствует клеточной форме белка, а A-форма — прионной. Существующие модели отличаются друг от друга, во-первых, по роли, которую играют инфекционные агрегатные комплексы в конверсии растворимого белка (S) в прионную форму (A), а во-вторых, по природе события, определяющего скорость процесса прионизации (назовем это событие скорость-лимитирующим этапом).

Мономер-направленная конверсия (*monomer-directed conversion* — **MDC). В русскоязычной литературе используется также** название **гетеродимерная модель.** Согласно этой модели, конформационная конверсия происходит в растворе и является скорость-лимитирующим этапом. Прионное состояние присуще мономеру белка, а превращение происходит, когда молекула клеточного белка связывается с мономером приона. После того, как белок приобрел прионную конформацию, пара диссоциирует, и две освободившиеся молекулы могут снова участвовать в инициации конформационных переходов и сборке агрегатов. Агрегация при этом рассматривается как вторичное явление, то есть образование полимерного комплекса рассматривается как следствие прионизации S-мономера.

Шаблонная сборка (*templated assembly* **— ТА), или полимеризационная модель.** Эта модель предполагает, что агрегация прионного белка неразрывно связана с изменением конформации, и превращение происходит непосредственно в результате присоединения клеточной формы к агрегату, то есть в процессе сборки. При этом А-комплекс служит шаблоном для конверсии S-мономера в А-форму. S-белок не способен к спонтанной прионизации. Таким образом, конформационная конверсия представляет собой скорость-лимитирующий этап, а сборка является причиной конверсии. Модель подтверждается опытами in vitro, которые показывают, что прионообразующими свойствами обладают не мономерные формы, а высокомолекулярные агрегаты.

Нуклеированная полимеризация (*nucleated polymerization* **— NP). Обе формы прионного белка (S и A) находятся в растворе** в равновесии, причем А-состояние является крайне редким и нестабильным. Скорость-лимитирующим событием в этой модели выступает не сама конформационная конверсия, а объединение существенного количества А-мономеров в стабильное ядро

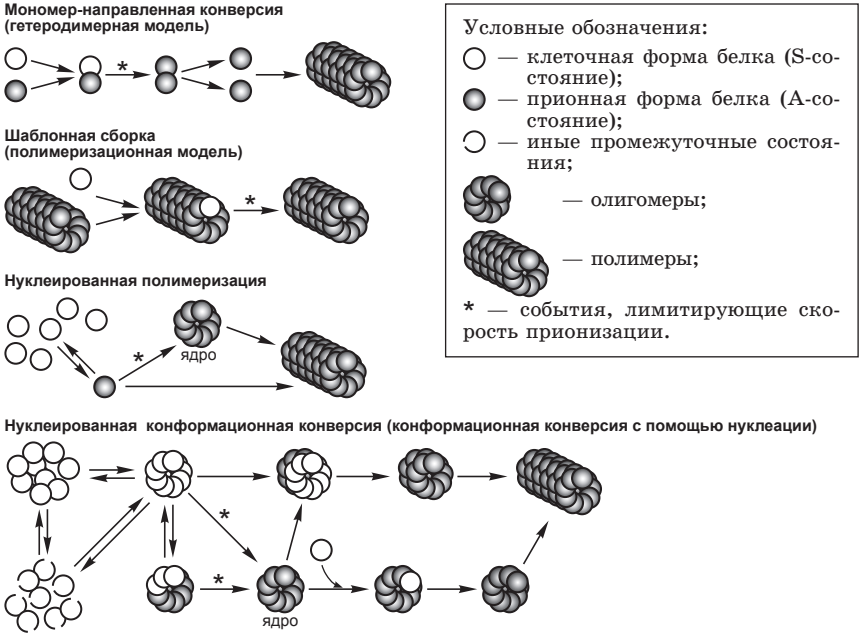


Рис. 6. Существующие модели прионизации (по Serio T. R., Cashikar A. G., Kowal A. S. et al., 2000 с изменениями)

(нуклеус). Интенсивность прионизации будет зависеть от того, насколько велики шансы для образования ядра, состоящего из А-компонентов. В дальнейшем А-мономеры, генерируемые равновесным переходом $S \rightleftharpoons A$, стабилизируются, присоединяясь к ядру.

Нуклеированная конформационная конверсия (*nucleated conformational conversion* **— NCC), или конформационная конверсия с помощью нуклеации.** Тщательное исследование механизма прионизации **NM-фрагмента фактора** нонсенс-супрессии SUP**35** дрожжей позволило выявить ряд динамических особенностей этого процесса. В 2000 году на основе результатов исследований была выдвинута еще одна модель прионизации, включающая аспекты моделей **TA и NP и дополненная новыми представлениями**. Как и в модели **TA, конформационная конверсия, согласно NCC, стимулируется полимерным А-комплексом при сборке** агрегата. Однако модель конформационной конверсии с помощью нуклеации уделяет большое внимание олигомерным структурам, образование которых имеет решающее значение для процесса прионизации.

Мономерный белок в S-форме пространственно нестабилен и может принимать огромное количество различных конформаций. Одна из них, даже относительно стабильная, может быть найдена только за очень продолжительное время, поэтому переход $S \rightarrow A$ на уровне мономеров практически не происходит, а гипотетическая вероятность такого перехода бесконечно мала. Белок в S-форме может находиться не только в виде мономеров (S-мономер), но и олигомеров (S-олигомер). Мономеры и олигомеры различной величины постоянно переходят друг в друга, и их соотношение находится в равновесии. Субъединицы, входящие в состав олигомеров, имеют значительно меньший набор возможных конформаций, по сравнению с мономерными формами, поэтому вероятность перехода компонентов S-олигомера в А-форму при взаимодействии с А-комплексом выше, чем у S-мономеров. При взаимодействии S-олигомера с прионным агрегатом, попавшим в клетку в результате инфицирования, может инициироваться переход его мономеров в А-форму. Вероятность этого события все еще невысока, так как S-олигомер может распасться на мономеры до осуществления $S \rightarrow A$ перехода. Если же переход произойдет, то наличие вновь образованного А-димера в составе S-олигомера повысит вероятность следующего $S \rightarrow A$ перехода. С каждым новым $S \rightarrow A$ переходом вероятность следую-

щего будет еще более высокая. Таким образом, в SA-олигомере постепенно увеличивается доля белка в А-форме. Процесс, в результате которого осуществляются последовательные переходы: S-олигомер → SA-олигомер → А-олигомер, называют созреванием «ядра». «Ядро» обладает наименьшей конформационной подвижностью и, соответственно, максимальной прионообразующей способностью. При взаимодействии с ним достаточно легко переходят в А-форму не только олигомеры, но и S-мономеры.

Модель конформационной конверсии с помощью нуклеации объясняет динамические особенности развития прионных заболеваний. Инкубационный период болезни может длиться несколько десятилетий, а с момента проявления первых симптомов наблюдается ее молниеносное развитие. Начальные стадии прионизации, согласно данной модели, протекают также гораздо медленнее, по сравнению с последующими.

Кроме этого, модель NCC **согласуется и с явлением видового барьера** в развитии прионных заболеваний. Видовой барьер наблюдается при передаче инфекции от животных одного вида к другому. Проявление первых симптомов болезни в таком случае наступает через длительное время. Но если от данного зараженного животного перенести инфекцию к другому того же вида, то инкубационный период сократится. При последующих пассажах инфекции в пределах одного вида период развития заболевания будет продолжать сокращаться до тех пор, пока не достигнет стабильного значения, характерного для данного вида.

Видовой барьер можно объяснить структурными различиями прионных белков у животных разных видов. Выше указывалось, что для всех прионов характерно наличие особых **N-терминальных** повторов, обеспечивающих этим белкам прионные свойства. Но в целом структура прионов у разных видов несколько различна. Чем бóльшая степень гомологии будет наблюдаться между прионами, тем успешнее протекают инициальные процессы прионизации. Структурные несоответствия, наоборот, затрудняют S→A переход. Отсюда, при трансмиссии прионного детерминанта от одного вида к другому, инкубационный период будет значительно длиннее, чем при инфицировании в пределах одного вида. В клетках животного, зараженного «чужим» прионом, в результате прионизации будут накапливаться «свои» прионы, поэтому при дальнейшем пассаже от этого животного очередному достанутся не только чужеродные прионы, но и прионы своего вида. При каждой последующей трансмиссии к очередному но-

сителю инфекции будет попадать все больше «своих» прионов, а скорость прионизации, следовательно, будет увеличиваться, пока не достигнет максимальной стабильной величины, характерной для данного вида.

Таким образом, видовой барьер объясняется ограниченной гомологией клеточной и инфекционной форм прионных белков, что обуславливает более низкую скорость образования зрелых «ядер» при взаимодействии этих белков.

Из всех описанных моделей прионизации наиболее соответствующей действительности, вероятно, является «конформационная конверсия с помощью нуклеации». Имеется значительное количество экспериментальных доказательств, полученных in vitro, указывающих на справедливость ряда положений этой модели. Однако точный механизм этого процесса in vivo предстоит еще выяснить. Существует много указаний на то, что в механизмах прионизации участвуют не только прионные белки. Значительный вклад в эти процессы вносят белки-шапероны, которые имеют свойства белок-ремоделирующих факторов.

Значение шаперонов в процессах прионизации

Эксперименты с очищенными прионными белками и их клеточными аналогами показывают, что наличие в системе только этих белков недостаточно для осуществления конверсии. Много данных указывают на участие в прионизации особых белков шаперонов, главной функцией которых является контроль правильной структуры белков. Шапероны способны связываться с белками и изменять их конформацию. Функционирование шаперонов требует затраты АТР, а также присутствия так называемых кошаперонов — белков, помогающих шаперонам осуществлять их функцию.

Было показано, что белок млекопитающих PrP^{C} не обращался в прионную форму, если к очищенному белковому препарату добавляли зрелые олигомеры приона PrP^{Sc}. Прионизация в этом случае или не происходит, или протекает настолько медленно, что практически не заметна. При добавлении бактериального шаперона GroEL и АТР наблюдали конформационные изменения в PrP (кошаперон GroES в данном случае не требовался). В другом эксперименте продемонстрировано, что поддержание нонсенс-супрессорного детерминанта [Psi^{+}] в клетках дрожжей требует определенной концентрации шаперона Hsp104. Более

того, данный шаперон специфически связывается с **eRF3** и влияет на изменение его конформации.

Не все шапероны в одинаковой степени влияют на конверсию белков. К примеру, дрожжевой шаперон Hsp104 усиливал конверсию PrP^{C} в прионную изоформу в том случае, если олигомеры PrP^{Sc} были частично денатурированы. Другие дрожжевые шапероны Ydj1, Ssa1 и 2, Hsp26 и Hsp90 никак не влияли на конверсию прионного белка млекопитающих.

Шапероны — белки, обладающие свойствами белок-ремоделирующих факторов. Их основная функция — создание условий, способствующих поиску оптимальной конформации белков. Являются обязательными компонентами белок-синтезирующих систем, обеспечивают укладку вновь синтезированных полипептидов. Известны также под названием белки теплового шока, так как они способны ренатурировать частично денатурированные белки. Экспрессия генов, кодирующих шапероны, стимулируется в стрессовых условиях. Шапероны также участвуют в регуляторных и транспортных механизмах.

В настоящее время можно считать доказанным, что для эффективной прионизации необходимо участие белков шаперонов. Однако при воздействии некоторых из них наблюдается противоположный эффект. Так, дрожжевой шаперон **Ssb (один из аналогов** шаперона млекопитающих Hsp70) при сверхэкспрессии не только не стимулировал агрегацию прионов, но и способствовал «вылечиванию» клеток. То есть, при повышении концентрации **Ssb в клетках происходила** элиминация детерминанта нонсенс-супрессии. В клетках, подверженных тепловому стрессу, многие шапероны, среди них **Ssa1 и Hsp104,** проявляют солюбилизирующую активность. Однако сверхэкспрессия обоих этих шаперонов, наоборот, сдвигает равновесие в сторону образования агрегатов. Оказалось, что **Ssa1** в определенной концентрации ингибирует способность шаперона Hsp104 разбирать белковые агрегаты.

Все известные данные о взаимодействии шаперонов и прионов позволяют сделать несколько выводов.

1) **Прионный белок является необходимым, но не достаточным** для наследования прионного состояния.
2) **Инфекционные свойства прионов зависят от взаимодействия** с шаперонами, которые способны изменять третичную структуру других белков.
3) **Не существует специализированных шаперонов, ответственных** за конверсию прионов.

4) **Действие шаперонов на состояние прионов может быть** противоположно направленным. Оно зависит от взаимодействия шаперонов и их концентраций.
5) **Инфекционная способность прионов зависит от состояния** клеток.

Таким образом, наличие прионного белка в клетке не является обязательным фактором прионизации его клеточных аналогов.

ДНК — ИДЕАЛЬНАЯ МАТРИЦА

СТРУКТУРА И КОМПАКТИЗАЦИЯ ДНК

Организация и типы двойных спиралей ДНК

Исследования структуры ДНК, активно проводившиеся в середине 20-го века, показали, что ее молекула состоит из двух полинуклеотидных цепей, закрученных в правильную двойную спираль. Полимерные цепи представляют собой последовательность четырех различных дезоксинуклеотидов (рис. 7), отличающихся друг от друга типом азотистого основания (аденин, тимин, гуанин, цитозин). Дезоксинуклеотиды соединены между собой фосфодиэфирными связями через 3′ и 5′ атомы остатка дезоксирибозы. Цепи ДНК являются **антипараллельными**, так как их фосфодиэфирные связи идут в противоположных направлениях, и **плектонемическими**, то есть могут быть разделены только путем раскручивания спирали. Две цепи удерживаются вместе при помощи водородных связей, которые образуются между парными азотистыми основаниями.

В молекуле ДНК наблюдается строгая специфичность спаривания оснований, которые составляют пары аденин–тимин и гуанин–цитозин, вследствие наличия комплементарных поверхностей у парных нуклеотидов и их способности образовывать 2 (А=Т) и 3 (Г≡Ц) водородные связи (рис. 8). **Водородные связи намного прочнее и специфичнее по сравнению с ван-дер-ваальсовыми, что позволяет молекуле ДНК быть идеальной матрицей, способной к репликации.** Обе цепи служат матрицей для синтеза цепей, и в результате репликации образуются две новые двуспиральные молекулы ДНК, каждая из которых состоит из одной материнской цепи и одной вновь синтезированной.

Вторичная структура ДНК, представляющая собой двойную спираль, может иметь различную плотность и направления за-

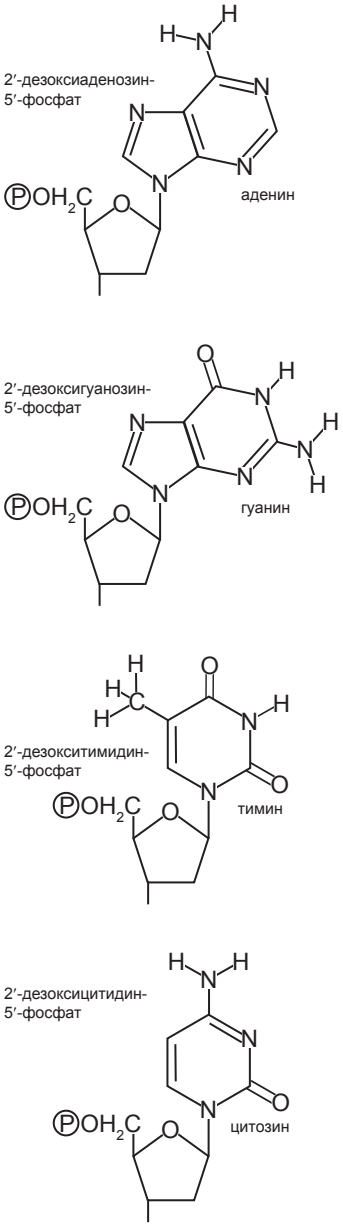


Рис. 7. Нуклеотиды, входящие в состав ДНК

крученности. Модель, построенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком, предполагала, что каждая пара оснований повернута вокруг оси относительно соседней пары на 36°, поэтому на один полный оборот спирали приходится 10 пар оснований. Спираль ДНК, согласно этой модели, является правозакрученной. Такая структура получила впоследствии название B-формы (рис. 9). Позже эта модель была несколько уточнена. Оказалось, что угол между соседними парами нуклеотидов несколько меньше предсказанной — 34,6°, а на один виток спирали приходится 10,4 пар оснований.

ДНК преимущественно находится в B-форме, однако может также приобретать формы **A, C, D**

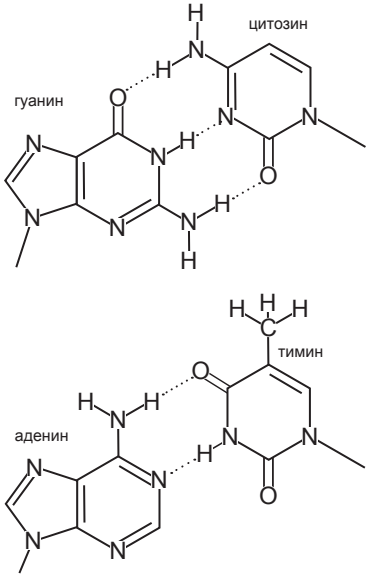


Рис. 8. Комплементарное соответствие парных азотистых оснований в молекуле ДНК

и **Е. Эти формы отличаются** плотностью спирали. А-форма спирали обладает наименьшей плотностью, то есть на один виток приходится наибольшее количество нуклеотидов. Остальные формы, наоборот, более плотные, чем В-форма. Форма спирали ДНК зависит от таких условий: влажности, наличия и концентрации различных ионов. Все указанные формы спирали — правовращающие. Однако ДНК может находиться и в виде левовращающей спирали, получившей название **Z-формы** (рис. 9). При организации третичной структуры ДНК некоторые участки двойной спирали находятся в суперспирализованном состоянии. Причем супервитки могут быть как положительными, так и отрицательными. Наличие любых супервитков часто рассматривают как форму запасания энергии, которая может использоваться в ряде процессов, требующих разделения цепей, к примеру, транскрипция или репликация. Отрицательные супервитки приводят к состоянию «недокрученности» ДНК. Это снижает напряжение скрученности и уменьшает угол вращения на пару оснований, а в некоторых случаях приводит к нарушению спаривания азотистых оснований. Крайним случаем «недокрученности» служит переход спирали в левозакрученное состояние. Левозакрученная спираль имеет наибольшее количество пар нуклеотидов на один виток, а фосфатнодезоксирибозный остов образует зигзагообразную линию, в отличие от гладко изогнутой линии в правовращающих спиралях (рис. 9). По этой причине левовращающая спираль получила название **Z-формы.**

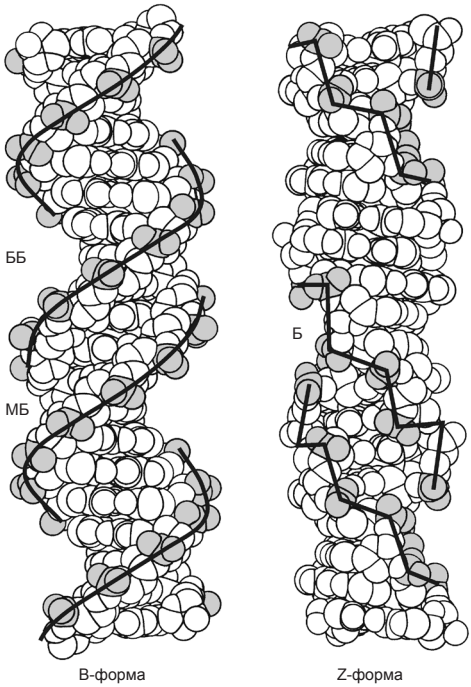


Рис. 9. Двойная спираль ДНК:
ББ — большая бороздка;
МБ — малая бороздка;
Б — бороздка

Компактизация ДНК прокариот

Несмотря на достаточно простое химическое строение, молекула ДНК приобретает очень сложную пространственную структуру. У бактерий молекула ДНК имеет обычно циклическую форму и организована в особый нуклеопротеиновый комплекс — **нуклеоид.** Он состоит на 80 % из ДНК, а остальную часть составляют белки. Нуклеоид может быть прикреплен к внутренней стороне мембраны за счет специальных белков в сайте начала репликации. Белки обеспечивают определенный способ укладки и компактизации ДНК. Особая организация нуклеоида позволяет достичь 1000-кратную степень компактизации ДНК, в результате чего она помещается в бактериальной клетке, занимая около 20 % ее объема. Бактериальный хроматин имеет три уровня компактизации.

Нуклеоид (от лат. nucleus — ядро и eidos — вид). ДНК-содержащая зона клетки прокариот. Нуклеопротеидный комплекс занимает центральную часть бактериальной клетки и имеет одну точку прикрепления к внутренней стороне мембраны.

Первый уровень. У бактерий нет гистонов, обеспечивающих образование регулярно расположенных нуклеосом, как у эукариот. В компактизации бактериальной ДНК участвуют гистоноподобные белки (HLP), среди которых преобладают HU и H-NS. Гистоноподобные белки не только участвуют в структуризации хроматина, но имеют важное значение в регуляции экспрессии генов, а также для процессов репликации и рекомбинации ДНК. Взаимодействие гистоноподобных белков с ДНК определяется ее первичной последовательностью. Гетеродимерный белок HU (10 кДа) обеспечивает отрицательную суперспирализацию ДНК. Белок H-NS компактизует ДНК, изменяет ее суперспирализацию и индуцирует изгибы. Считается, что основной функцией H-NS является не упаковка ДНК, а участие в глобальной регуляции экспрессии генов. Следует отметить, что гистоноподобные белки и гистоны эукариот не имеют гомологии.

Второй уровень компактизации осуществляется с участием группы белков SMC (structural maintenance of chromosomes). Белки SMC — крупные белки (>50 кДа), которые образуют V-образные гомо- и гетеродимеры. SMC являются гомологами миозина и выполняют основную механическую нагрузку в процессах конденсации хроматина. Совместно со вспомогательными белками

они участвуют в образовании стабильной повторяющейся структуры в виде отрицательных супервитков размером 10^3 п.н.

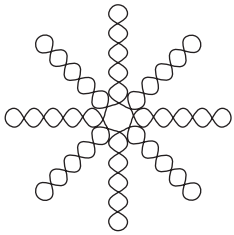


Рис. 10. Схематическое изображение доменной структуры бактериальной хромосомы (третий уровень компактизации)

Третий уровень представляет доменную структуру. Хроматин образует петли, концы которых фиксированы хроматиновыми белками (рис. 10). Внесение разрыва в молекулу ДНК при такой организации затрагивает только один домен и не влияет на другие участки. Бактериальная хромосома состоит из 50–200 доменов со средним размером около 10^4 п.н.

Высоко компактизованные домены (или петли) ДНК направлены внутрь нуклеоидной области, а раскрученные петли, на которых идет синтез РНК, направлены наружу нуклеоидной области и часто посредством белоксинтезирующей системы закрепляются на мембране.

Хроматин архей имеет признаки, свойственные и бактериям, и эукариотам. Размер и форма ДНК во многом сходна с бактериальной. С другой стороны, у архей (но не у всех) есть гистоны, которые на 30 % гомологичны эукариотическим H3 и H4. Существенным отличием являются более короткие N-концы молекул и меньшая молекулярная масса. Гомологи гистонов H2a и H2b у архей отсутствуют, поэтому гистоны не образуют октамерных нуклеосом, но тяготеют к формированию тетрасом. Как и у эукариот, гистоны участвуют в первом уровне компактизации хроматина. Вокруг тетрамера оборачивается двойная цепь ДНК (около 70 п.н.), образуя один правозакрученный виток. Существующие различия в структуре гистонов определяют несколько иной характер их взаимодействия с ДНК.

Хроматин (от греч. chroma — цвет). Нуклеопротеидный комплекс ядра эукариотических клеток. Состоит из ДНК, гистоновых и негистоновых белков и РНК. Образование хроматина обеспечивает компактизацию ДНК и регуляцию экспрессии генов.

Среди негистоновых белков, участвующих в компактизации хроматина архей, можно выделить ряд белков, которые помимо компактизации хроматина защищают его от тепловой денатурации. Некоторые из таких белков повышают температуру плавления ДНК на 40 °C.

Структура хроматина эукариот

В эукариотических клетках ДНК значительно больше и намного сложнее организована по сравнению с ДНК прокариот. Огромные размеры молекулы ДНК требуют ее тщательной упаковки. Целью компактизации является не только размещение ДНК в минимальном объеме, но и обеспечение функционального контроля генов, так как характер упаковки влияет на активность различных участков генома.

Хроматин в эукариотических клетках содержит бóльшее количество белков, чем хроматин бактерий. Белки составляют около половины всей массы эукариотического хроматина. Такое обилие белка обеспечивает высокий уровень компактизации ДНК и тонкую регуляцию активности экспрессии генов. Хроматиновые белки можно разделить на гистоновые и негистоновые.

Гистоны — консервативные структурные белки, несущие большое количество положительно заряженных аминокислотных остатков (лизина и аргинина). Существуют пять основных классов гистонов, которые обозначаются как **H1, H2a, H2b, H3, H4. Четыре из них (H2a, H2b, H3, H4) участвуют в образовании нуклеосом** — первого уровня компактизации хроматина (рис. 11, 12). Гистон H1 несколько отличается по структуре от других гистонов и участвует в поддержании второго уровня компактизации — хроматиновых фибрилл (рис. 13).

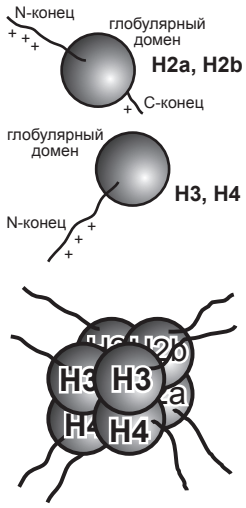


Рис. 11. Коровые гистоны и нуклеосомальный октамер

Нуклеосомы формируются комплексом гистонов, вокруг которого двойная цепь ДНК делает около двух витков. Комплекс гистонов представляет собой дископодобное тело, которое составляют восемь нуклеосомных гистонов (по два каждого из четырех типов). Гистоны нуклеосом взаимодействуют друг с другом гидрофобными участками полипептидных цепей, а положительно заряженные хвосты взаимодействуют с негистоновыми

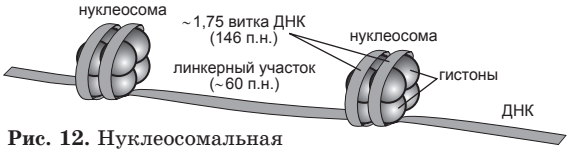


Рис. 12. Нуклеосомальная структура хроматина

хроматиновыми белками и ДНК. Участок ДНК, образующий витки вокруг корового гистонового комплекса, состоит из 146 пар нуклеотидов. Диаметр нуклеосомы составляет 11 нм. Между нуклеосомами находятся так называемые линкерные (то есть «связующие») участки ДНК. Они состоят приблизительно из 60 пар нуклеотидов. Нуклеосома и линкерный участок образуют в совокупности повторяющуюся единицу хроматина (рис. 11).

Уменьшение длины ДНК путем оборачивания вокруг гистоновых октамеров с образованием нуклеосом является довольно скромным, но существенным первым шагом в формировании высокоупорядоченных хроматиновых структур.

Целый ряд аминокислотных остатков гистонов подвергается посттрансляционной ковалентной модификации. В **N-концевых** доменах гистонов ацетилируются остатки лизина, метилируются остатки лизина и аргинина, фосфорилируется серин. На С-концевых участках гистонов **H2a и H2b возможно образование изо**пептидной связи между ε-аминогруппой лизина (соответственно 119 и 123) и концевой карбоксильной группой белка убиквитина. Состояние гистонов определяет степень компактизации отдельных участков хроматина. В последние годы стало ясно, что нуклеосомы имеют важное значение не только для поддержания структуры хроматина. Они участвуют также в регуляции генной экспрессии и обеспечивают клеточную память, передавая эпигенетическую информацию от одного поколения клеток к следующим (см. раздел «Гистоновый код»).

Хроматиновые фибриллы представляют собой определенный вид укладки нуклеосом. В организации этой структуры принимает участие гистон H1 (рис. 13). В отличие от других гистонов молекула H1 состоит из центральной глобулы, называемой кором, и двух вытянутых С- и **N-концевых участков. Глобулярный кор** связывается со специфическим участком нуклеосомы, **N-концевой** участок взаимодействует с линкерной последовательностью ДНК, а С-участок — с глобулярным кором гистона H1, связанного со следующей нуклеосомой. Для гистона H1 характерно кооперативное связывание, то есть он связывается с ДНК с более высокой вероятностью в присутствии других молекул

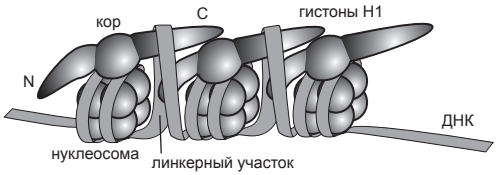


Рис. 13. Хроматиновые фибриллы

H1. Благодаря этому свойству гистоны H1 связываются с ДНК группами по восемь и более молекул. Диаметр образующейся структуры составляет около 30 нм. Однако структура хроматина не одинакова по всей длине. Высокоструктурированные участки периодически прерываются менее структурированными. Хроматиновые фибриллы, таким образом, представляют собой цепочки хроматиновых глыбок. Тонкие участки хроматина в большей степени доступны для ферментов и регуляторных белков. Именно эти районы совпадают с 5′-концевыми участками активных генов, откуда начинается синтез РНК.

Уровень компактизации различных участков хроматина весьма важен для экспрессии генов. Специализация клеток многоклеточного организма определяется тем, что хроматин в ядре этих клеток находится в различном состоянии. Экспрессируются гены, находящиеся в менее структурированных участках хроматина. Так, в В-клетках поджелудочной железы млекопитающих 5′-конец инсулинового гена легко идентифицируется, так как находится на участке с низким уровнем компактизации. В остальных типах клеток того же организма ген, кодирующий инсулин, находится в структурированном участке хроматина, поэтому неактивен. (Подробнее см. в разделе «Структура и функциональное состояние хроматина».)

Петельная организация является следующим этапом компактизации хроматина. Впервые такая структура была предсказана для хромосом типа ламповых щеток, характерных для ооцитов, а также для политенных хромосом слюнных желез насекомых. Хроматиновые структуры в этих клетках были хорошо видны на электронных микрофотографиях, потому что петли состояли из значительного количества цепочек ДНК. Позже было выяснено, что и у бактерий кольцевая ДНК, лишенная гистонов, тоже имеет петельную структуру. В настоящее время петельная организация хроматина считается характерной как для прокариот, так и для всех типов клеток эукариот.

Средний размер петлистых структур эукариот — хромомер — составляет 100–150 нм. Хромомеры между собой связаны участками нуклеосомного хроматина. Подобные розетковидные петлистые структуры — хромомеры — можно видеть при разрыхлении хромосом животных и растений. Такой уровень организации ДНК дает 600-кратную компактизацию. Размер отдельных петлевидных доменов часто совпадает с размером средних репликонов и может соответствовать одному или не-

скольким генам. У своих оснований петли ДНК связаны негистоновыми белками ядерного матрикса, в состав которых могут входить как ферменты репликации ДНК, так и транскрипции, а также некоторые специфические структурные белки. Такая петельно-доменная структура хроматина не только обеспечивает структурную компактизацию хроматина, но и организует функциональные единицы хромосом — репликоны и транскрибируемые гены. Отдельные участки хромосом в виде плотно упакованных петель, в которые входят теломерные и центромерные участки, закрепляют хромосомы на ядерной мембране.

На сегодня существуют весомые доказательства того, что все хромосомы имеют петельную структуру и представляют собой серию петельных доменов. В составе хромосом такие петельные домены надспирализованы и компактно уложены в кластеры. В местах активно работающих участков петли высвобождаются и раскручиваются, что демонстрируют электронномикроскопические наблюдения с политенными хромосомами и хромосомами типа «ламповых щеток». В процессе деления ядра хромосомы еще дополнительно конденсируются за счет дополнительного уровня спирализации, очевидно, с образованием спирали второго порядка, диаметр которой составляет около 2 мкм, что соответствует диаметру метафазной хромосомы. **Метафазная хромосома** (рис. 14) представляет собой самый высокий уровень компактизации хроматина эукариот.

Конденсация хромосом в делящейся клетке сопровождается фосфорилированием шести разных остатков серина в молекулах H1. Этот механизм, по-видимому, играет ключевую роль в конденсации хроматина в процессе митоза.

В составе хроматина обнаруживается значительное количество структурных белков, участвующих в поддержании определенного состояния.

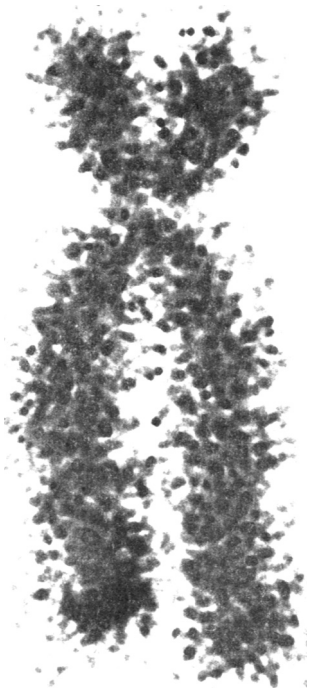


Рис. 14. Хромосома — структура, образующаяся в процессе митоза. Состоит из двух плотно упакованных сестринских хроматид

Гетерохроматиновые белки (например, HP1, белки Polycomb группы, хроматин-ремоделирующий комплекс NuRD) повышают уровень компактизации хроматина, образуя обширные области плотноупакованного гетерохроматина, тогда как хроматин-ремоделирующий комплекс SWI/SNF оказывает обратное действие. Взаимодействие всех этих белков и белковых комплексов с нуклеосомами зависит от состояния гистонов (ковалентной модификации). Существуют также данные о том, что в организации гетерохроматина принимают участие структурные РНК. Более подробно роль структурных белков и РНК будет обсуждаться в главе «Регуляция генной экспрессии эукариот».

БАЗОВЫЕ ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМОВ ВИРУСОВ, ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Молекулярная масса и длина молекул ДНК различных организмов сильно отличаются. Так, длина молекулы ДНК у наиболее мелких вирусов составляет от 0,4 до 1,0 мкм; размеры кольцевых ДНК пластид и митохондрий, а также ДНК многих вирусов лежат в пределах 5–100 мкм; бактерий — 1000–2500 мкм. Молекулярная масса этих молекул колеблется соответственно от 1000 кДа до 2–4 млн. кДа. Длина ДНК эукариот во много раз превосходит прокариотическую и достигает нескольких сантиметров, а молекулярная масса — 10^9–10^{11} Да.

Геном — это гаплоидный набор хромосом или одна молекула ДНК, несущая информацию о структуре макромолекул, необходимых для жизнедеятельности, т.е. «полную информацию об организме». Для гаплоидных организмов понятия **«геном»** и **«генотип»** идентичны. Геном включает гены и регуляторные элементы (незначащие последовательности), которые расположены линейно, однако, есть и такие, которые перекрываются. У некоторых вирусов (например, вирус гриппа) геном может быть фрагментирован, т.е. несколько фрагментов НК окружены одной оболочкой. В геномах многих организмов, как про-, так и эукариот, содержатся так называемые мобильные (мигрирующие) генетические элементы, способные изменять положение в геноме (транспозиция). Рассмотрим кратко особенности разных геномов.

Особенности геномов вирусов

1. Могут быть представлены одно- и двунитевыми молекулами как ДНК, так и РНК; однонитевые молекулы НК представлены или «минус», или «плюс» типом полярности; могут быть линейны, замкнуты в кольцо, фрагментированы, что более характерно для РНК-содержащих вирусов.
2. РНК-геномы подразделяют на несколько групп:
   — одноцепочечные геномы положительной полярности или (+)РНК, строение которых соответствует мРНК. Они могут непосредственно транслироваться на рибосомах хозяина;
   — одноцепочечные (−)РНК, последовательность которых комплементарна (+)РНК;
   — двухцепочечные РНК, которые являются сегментированными.
3. Обычно вирусный геном содержит небольшое количество генов, многие из которых частично или полностью перекрываются (высокая экономичность).
4. ДНК-геномы вирусов подразделяют также на несколько групп:
   — двухцепочечные простые линейные или замкнутые в кольцо ДНК;
   — одноцепочечные линейные или кольцевые ДНК.
5. У некоторых линейных двухцепочечных ДНК вирусов есть «липкие» концы — одноцепочечные концы, имеющие комплементарные участки.
6. Для некоторых вирусов характерно наличие генетической информации в обеих цепях: и матричной, и комплементарной ей, так что в одной части генома считывается информация с одной цепи, а в другой — с комплементарной ей.
7. Часто в состав нуклеиновой кислоты вирусов входят модифицированные основания (например, гидрокси- и метил-производные основных нуклеотидов).
8. Молекулы двухцепочечных НК вирусов обычно находятся в суперспирализованном состоянии.
9. Для многих вирусов растений характерна сегментированность генома, каждый сегмент которого одет отдельным капсидом.
10. Гены некоторых бактериофагов сгруппированы в опероны, что определяется механизмами регуляции экспрессии генов хозяина.

11. Хотя обычно геномы вирусов высоко экономичны, т.е. практически вся нуклеиновая кислота несет значащие последовательности, отдельным ДНК- и РНК-вирусам эукариот, как и их хозяевам, присуща интрон-экзонная структура генов.

Особенности геномов прокариот

Клетки бактерий могут содержать одновременно несколько разных генетических элементов, каждый из которых способен к автономной репликации. «Хромосома» многих бактерий — это двухцепочечная кольцевая молекула ДНК с молекулярной массой около $2{,}5 \times 10^9$ Да. Вся хромосома представлена одним репликоном, т.е. имеет один сайт инициации репликации. Кроме кольцевых могут быть и линейные геномы (однако их концы «закрыты» сами на себя или с помощью специальных белков), например, у *Streptomyces coelicolor*. Также геном некоторых бактерий может быть представлен несколькими элементами (чаще двумя «хромосомами»), например у *Rhizobium tumefaciens* — одна «хромосома» линейная, а другая — кольцевая. Иногда «гены домашнего хозяйства», которые обычно входят в состав «хромосом» бактерий, могут находиться в мегаплазмидах, которые вполне правомерно в таких случаях рассматривать как дополнительную хромосому.

У бактерий нет четко сформированного ядра, а генетическая информация в клетке представлена нуклеоидом, расположенным в цитозоле в виде четко отграниченной области, которая состоит в основном из ДНК, а также содержит РНК и белки. Основным отличием прокариот от эукариот является наличие внехромосомных структур, которые способны к автономной репликации — плазмиды. В целом основными особенностями геномов прокариот является:

1. Наличие автономно реплицирующихся структур в виде плазмид.
2. Организация генов в виде оперонов, которые собраны в отдельные регулоны.
3. В отличие от вирусов, в геноме бактерий есть гены, представленные несколькими копиями и собранные в группы, — это гены рРНК и тРНК.
4. Для бактериальных геномов также характерна большая, чем у вирусов, избыточность генома, т.е. наличие незначащих последовательностей, которые в основном являются регуляторными элементами.

5. Наличие мобильных генетических элементов (автономные генетические элементы — более корректный термин) — IS-последовательности и транспозоны, интегроны (In), интегрон-конъюгативные элементы (ICE), суперинтегроны, генетические острова (патогенности) (PAI или HPI) и кассеты (GC), а также мороны (moron).
6. Геном архей имеет значительные отличия от геномов бактерий, основным из которых является наличие интронов в генах, а также гистоноподобных белков, отсутствующих у бактерий.

Особенности геномов эукариот

Геномы эукариот организованы очень сложно, поэтому ограничимся описанием основных принципов организации:

1. Сложная организация систем регуляции;
2. Высокая степень избыточности эукариотических геномов, которая объясняется следующими причинами:
   — наличие повторов значащих и незначащих последовательностей в ДНК;
   — огромное количество регуляторных последовательностей, не несущих генетической информации;
   — наличие спейсеров, которые разделяют отдельные гены и группы генов;
   — наличие интронов и экзонов;
   — наличие большого количества неактивных участков ДНК — конститутивного гетерохроматина.
3. В эукариотических геномах, как и у бактерий, присутствуют мобильные генетические конструкции, которые, как считают, играют большую роль в регуляции.

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК БАКТЕРИЙ

Удвоение ДНК возможно после локального плавления молекулы, при котором на определенном участке происходит разделение комплементарных цепей. Это дает возможность использовать обе материнские цепи в качестве матрицы для синтеза дочерних. Собственно полимеризации цепей ДНК предшествует инициация репликации — сложный процесс, связанный с плавлением ДНК и со сборкой репликативной машины в точке начала репликации.

Инициация репликации бактериальной хромосомы

Репликация ДНК не может начаться в любой точке молекулы. В первичной структуре ДНК существуют определенные сигнальные последовательности, которые узнаются специфическими белками. Нуклеотидные последовательности, которые служат сигналом для инициации репликации, называют **точками начала репликации.** Геном *E. coli* реплицируется двунаправленно от одной точки начала репликации, получившей название локус *ori C*. Функциональная область локуса *ori C* содержит 245 пар оснований, которые включают четыре сайта по 9 нуклеотидов каждый. Инициация репликации начинается со взаимодействия белка dnaA с этими последовательностями. Точки начала репликации у бактерий и бактериофагов содержат две существенные области: **область узнавания**, которая связывает инициаторный белок (белки), и соседнюю **A–T-богатую область**, которая при связывании инициаторных белков обеспечивает разделение двух цепей ДНК так, что компоненты репликационной машины могут занять стартовое место. У бактерии *Salmonella typhimurium* точка начала репликации находится во фрагменте из 296 пар оснований. Сравнение этой последовательности с нуклеотидным составом локуса *ori C Escherichia coli* показало 86 %-ю гомологию. Анализ этих последовательностей выявил, что они содержат палиндромные участки. Палиндром представляет собой область с двойной симметрией. Осью симметрии является точка, относительно которой последовательность остается одинаковой при чтении в противоположных направлениях (рис. 15-А). Инвертированные повторы могут как примыкать друг к другу, так и быть разделенными несимметричной последовательностью. Участки повтора, находящиеся на одной цепи, являются взаимно комплементарными друг другу. Это определяет свойство инвертированных повторов влиять на вторичную структуру ДНК или РНК. За счет спаривания комплементарных пар одной и той же полинуклеотидной цепи возможно возникновение петель или шпилек.

Плавление ДНК — процесс денатурации ДНК, сопровождающийся разрывом водородных связей между парами нуклеотидов, в результате которого комплементарные цепи частично или полностью отделяются друг от друга.

Наличие множественных палиндромов определяет формирование сложной пространственной структуры в точке начала репли-

кации ДНК (рис. 15-Б). Такая структура существенно отличается по стабильности от обычной двойной спирали, и маловероятно, что она возникает спонтанно. Ее возникновению могут способствовать напряжения, связанные с отрицательной суперспирализацией ДНК, действие определенных инициаторных белков и последующая стабилизация другими специфическими белками. В конечном итоге вид структуры, формируемой в процессе репликации, может зависеть от взаимосвязи матрицы и репликативной вилки, от циркулярности или линейности матрицы, а также от количества функционирующих репликативных вилок.

Под влиянием внутриклеточных регуляторных сигналов через протеинкиназную систему активируются инициаторные белки, которые узнают и связываются со специфическими последовательностями в точках начала репликации ДНК. Связывание с точкой начала репликации происходит в присутствии АТР. Затем к этой области привлекаются иные компоненты репликативной машины: регуляторы и ферменты (ДНК-полимераза, ДНК-топоизомераза, ДНК-лигаза). Конечный ансамбль белков, обеспечивающий процесс репликации ДНК, получил название **реплисома**.

Образование реплисомы у *E. coli* начинается со взаимодействия активированных молекул белка dnaA в присутствии АТР с четырьмя специфическими сайтами, состоящими из 9 пар оснований в составе точки начала репликации и последующей олигомеризации этих белков с образованием 20–40-меров. Олигомеры

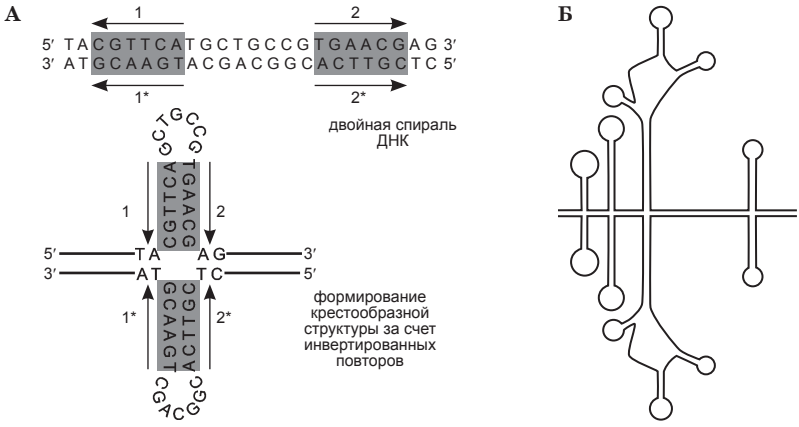


Рис. 15. Палиндромы (инвертированные повторы): А — структура палиндрома и его участие в поддержании вторичной структуры ДНК (стрелками и цифрами обозначены участки инвертированных повторов); Б — схематическое изображение гипотетической вторичной структуры ДНК в точке начала репликации

dnaA способствуют образовыванию комплексов, которые индуцируют плавление ДНК, а затем dnaA с помощью dnaC обеспечивают встраивание белка геликазы (dnaB) в расплетенную область ДНК. Белковый комплекс [dnaB–dnaC] обеспечивает формирование инициирующего «**репликационного глаза**», состоящего из нескольких сотен разделенных пар нуклеотидов. Постепенное увеличение размера «глаза» приводит к формированию θ-структуры. Важное значение геликаз, обеспечивающих разделение цепей ДНК, отражает то обстоятельство, что даже у такого простейшего одноклеточного организма, как *E. coli*, обнаружено более 10 различных ферментов с геликазной активностью.

Одноцепочечные участки «репликационного глаза» стабилизируются особыми SSB-белками, которые взаимодействуют с одноцепочечной ДНК. SSB-белки — это дестабилизирующие белки, обладающие свойством кооперативного связывания с одноцепочечной ДНК (рис. 16). Если одна белковая частица связывается с одной из цепей ДНК, то это в значительной степени повышает вероятность связывания с данной структурой других частиц белка. Связывание одноцепочечной ДНК SSB-белками предотвращает слипание различных участков этой цепи, в результате которого могут образоваться шпильки и петли, мешающие процессу репликации.

На этой стадии точка начала репликации практически подготовлена к синтезу РНК-праймера и последующему синтезу ДНК, который начинается с образования предзатравочного комплекса. Этот белковый ансамбль состоит из комплекса [dnaB — dnaC], с которым взаимодействуют четыре дополнительных полипептида: *n*, *n′*, *n″* и *i* (dnaT). Образование праймосомы завершается после добавления к предзатравочному комплексу специфического фермента — праймазы (dnaG), который синтезирует РНК-затравку. Завершающим этапом сборки реплисомы следует считать взаимодействие праймосомы с ДНК-полимеразой III. Для продолжения синтеза ДНК необходимо участие еще двух белков, двигающихся впереди репликативной вилки и выполняющих функцию геликаз — геликазы II и белка rep.

После плавления ДНК и сборки реплисомы каждая из цепей служит матрицей для синтеза дочерних молекул ДНК. Начало репликации приводит к образованию двух **репликационных вилок**, направленных в противоположные стороны (рис. 16).

Ферменты **ДНК-геликазы** специфически связываются с ДНК в месте ее раздвоения и совершают механическую работу — рас-

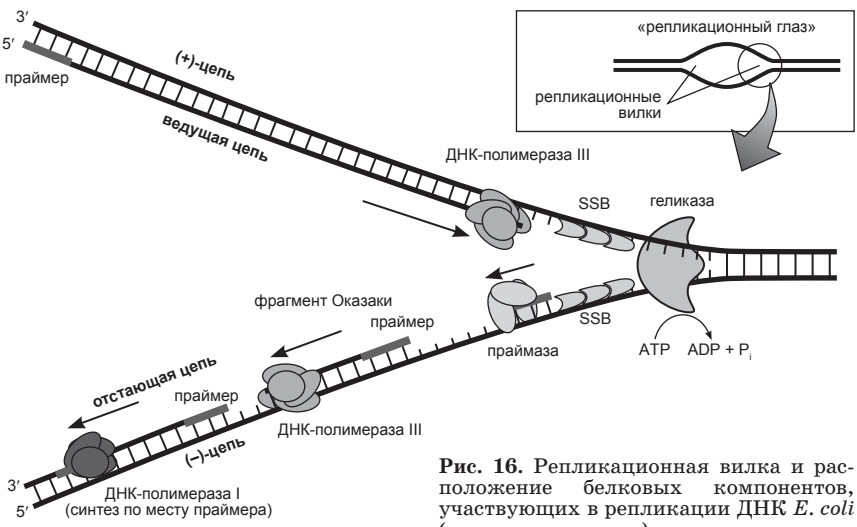


Рис. 16. Репликационная вилка и расположение белковых компонентов, участвующих в репликации ДНК *E. coli* (упрощенная схема)

кручивают ДНК, отделяя цепи друг от друга. На совершение работы тратится энергия АТР.

В процессе репликации ДНК участвует также еще одна группа ферментов, функцией которых является предотвращение спутывания ДНК. Их называют **топоизомеразами**. Различают два типа топоизомераз. Топоизомеразы **I вносят разрыв в одну из цепей ДНК**, а топоизомеразы **II разрывают одновременно обе цепи.** В механизмах репликации ДНК принимают участие топоизомеразы **I.**

Двойная цепь ДНК под действием геликазы в процессе репликации совершает вращение вокруг своей оси. При образовании репликационной вилки один оборот совершается на каждые 10,4 пар нуклеотидов. Это приводит к увеличению положительной суперспирализации, то есть создает напряжение в молекуле ДНК, что может привести к ее спутыванию. Возможность спутывания предотвращают топоизомеразы. По своей функциональной активности эти ферменты являются обратимыми эндонуклеазами. Они раскрывают одну цепь ДНК, образуя при этом ковалентную связь с одним из концов через фосфатную группу у 5′-атома дезоксирибозы. Интактная цепь протягивается через образованный разрыв, что способствует снижению механического напряжения (рис. 17). После ослабления напряжения связь в месте разрыва возобновляется.

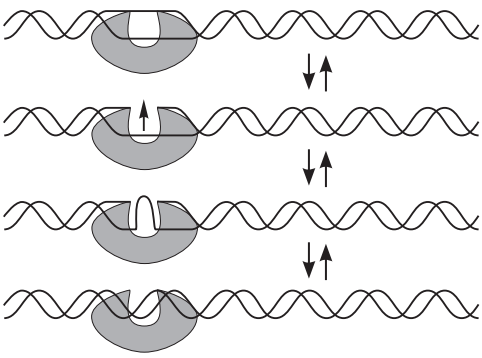


Рис. 17. Каталитическая активность эукариотической топоизомеразы I типа. Направление реакции (уплотнение или ослабление спирали) зависит от механического напряжения в молекуле ДНК. Топоизомераза I, выделенная из *E. coli*, релаксирует только отрицательно надспирализованную ДНК (на схеме сверху вниз)

Активность топоизомераз не требует затраты метаболической энергии, поскольку ковалентная связь, образующаяся между ферментом и 5′-фосфатной группой цепочки ДНК, обладает значительной энергией, так как в ней сохраняется энергия разорванной фосфодиэфирной связи. Фактически в этой реакции осуществляется перенос 5′-конца цепочки на фермент. Свободная энергия фосфодиэфирной связи и связи между цепочкой ДНК и топоизомеразой имеют близкие значения, что позволяет осуществлять реакцию переноса без использования дополнительной энергии.

Топоизомеразы II, в отличие от первого типа ферментов, вносят разрыв в обе цепи молекулы ДНК, а для их активности необходима затрата энергии в виде АТФ. Эти ферменты найдены у прокариот и эукариот. Существуют топоизомеразы II, релаксирующие как положительные, так и отрицательные суперспирали. У прокариот к такому типу относятся ДНК-гиразы. Они участвуют в топологической регуляции экспрессии генов путем создания определенных механических напряжений в молекуле ДНК за счет увеличения отрицательной суперспирализации молекулы ДНК (подробнее см. в разделе «Топологическая регуляция экспрессии бактериальных генов»). ДНК-гиразы у прокариот выполняют важную функцию при сегрегации кольцевых молекул ДНК при делении, так как расщепляют катенаны.

Инициация репликации ДНК плазмиды ColE1

Механизмы инициации репликации хромосомной и плазмидной ДНК могут существенно отличаться. Например, репликация плазмиды ColE1 начинается с транскрипции РНК, которая инициируется на расстоянии в 555 пар оснований против хода репликации от точки начала. Транскрипция продолжается через точку начала репликации. Фермент РНКаза H (название происходит от

слова Hybride — гибрид ДНК и РНК) отрезает транскрипт в точке начала репликации. При этом образуется 3′-ОН-конец, использующийся в качестве затравки для репликации ДНК.

Полимеризация цепей

Синтез дочерних цепей ДНК в репликационной вилке идет только лишь в направлении 5′⟶3′. Очередной дезоксинуклеотид присоединяется через α-фосфорную группу к гидроксилу 3′ атома дезоксирибозы последнего нуклеотида растущей цепочки (рис. 18). Поскольку две цепи ДНК противоположно направленные, то и синтез каждой дочерней цепи осуществляется в противоположных направлениях (рис. 16). Цепь ДНК, направленную 5′-концом в сторону репликационной вилки, называют положительной, или (+)-цепью, а вторую цепь — отрицательной, или (−)-цепью. Синтез цепи ДНК на матричной (+)-цепи протекает в направлении репликационной вилки непрерывно и начинается раньше. Цепь ДНК, синтез которой осуществляется на (+)-цепи, называют **ведущей**. Синтез на противоположно направленной (−)-цепи происходит от репликационной вилки, и прежде чем инициируется синтез ДНК должна раскрутиться на определенную длину, поэтому начало полимеризации на (−)-цепи запаздывает. В этом случае синтезирующуюся цепь называют **отстающей**. Кроме того, полимеризация такой цепи имеет прерывистый характер, то есть она синтезируется отдельными фрагментами, которые затем сшиваются между собой.

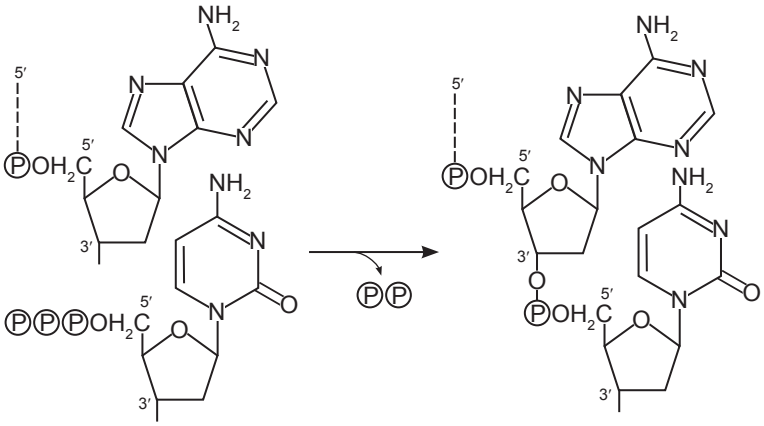


Рис. 18. Реакция присоединения нуклеотида к растущей цепи ДНК

Полимеризация нуклеотидных цепей осуществляется разными полимеразами. У бактерий известны три ДНК-полимеразы. **ДНК-полимераза I** в основном участвует в репарационном синтезе ДНК. В репликационном процессе она выполняет только дополнительную роль при синтезе отстающей цепи, вырезая праймеры и заполняя образовавшиеся бреши. Тем не менее, при репликации плазмиды колициногенности ColE1 эта ДНК-полимераза необходима для начала процесса репликации, образования D-петли и расщепления РНК-затравок. ДНК-полимеразы I обладают несколькими ферментативными активностями. Кроме полимеразной активности, данный фермент также обладает 5′- и 3′-экзонуклеазными активностями, которые используются для удаления ошибочно включенных в молекулу ДНК нуклеотидов.

ДНК-полимераза II обладает полимеразной и 3′-экзонуклеазной активностями. Это один полипептид с молекулярной массой 140 кДа. Данный фермент является также ферментом репарации.

ДНК-полимераза III является основным ферментом репликационного синтеза ДНК у *E. coli*. Она состоит из нескольких субъединиц (мол. масса около 500 кДа). Для образования комплекса ДНК-полимеразы **III с матрицей и затравкой необходима энергия** АТФ. Скорость синтеза ДНК данным ферментом при оптимальных условиях составляет около 1000 нуклеотидов за секунду. Полимеразную реакцию осуществляет в направлении 5′ → 3′, кроме того фермент обладает 3′ → 5′ и 5′ → 3′-экзонуклеазной активностями.

Субстратом для построения дочерних цепей ДНК выступают дезоксирибонуклеотидтрифосфаты. Эти же соединения являются и источником энергии, обеспечивающей синтез. Реакция присоединения нуклеотида к растущей цепи с образованием фосфодиэфирной связи между нуклеотидами может быть легко обращена, однако этого не происходит. Пирофосфат, выделяющийся в процессе полимеризации ДНК, расщепляется пирофосфатазой на два фосфата ($PP_i + H_2O \rightarrow 2\ P_i$), а поскольку продукт реакции удаляется из среды, равновесие реакции значительно смещается в сторону синтеза полимера.

В синтезирующуюся цепь ДНК встраиваются нуклеотиды, комплементарно соответствующие очередному нуклеотиду цепи-матрицы. Только лишь в случае комплементарного соответствия парных нуклеотидов ДНК-полимераза III **катализирует образование** фосфодиэфирной связи между дезоксирибонуклеотидом

и растущей цепью. Однако при спаривании нуклеотидов возможны ошибки. Азотистые основания нуклеотидов вследствие своей электронной структуры могут находиться в таутомерных формах. Это позволяет образовывать комплементарные пары между некомплементарными нуклеотидами. Например, цитозин и аденин не могут спариваться ввиду отсутствия комплементарных поверхностей. Тем не менее, цитозин может перейти в таутомерную структуру, которая позволяет ему образовать две водородные связи с аденином (рис. 19). Частота возникновения таутомерных форм нуклеотидов составляет 10^{-5}–10^{-4}. Такова же частота неправильного спаривания нуклеотидов при синтезе ДНК. Несмотря на это, процесс репликации ДНК отличается высокой точностью, и частота ошибок не превышает 10^{-9}.

Низкая частота ошибок полимеразной реакции определяется тем, что ДНК-полимераза кроме репликативной активности обладает еще и 3′-эндонуклеазной. Данная активность проявляется в том случае, если ДНК-полимераза находит ошибку на 3′-конце синтезируемой цепи. Время существования таутомерных форм оснований непродолжительно, поэтому «ложная» комплементарность оснований обнаруживается сразу же после включения «неправильного» нуклеотида в цепь. Пара некомплементарных оснований не соответствует пространственно реакционному центру фермента, что и стимулирует эндонуклеазную активность ДНК-полимеразы, которая направлена на отщепление последнего «неправильного» нуклеотида. После удаления некомплементарного нуклеотида полимераза совершает еще одну попытку включения очередного нуклеотида в синтезируемую цепочку. Можно сказать, что ДНК-полимераза «тестирует» корректность спаривания 3′-конечного нуклеотида и в зависимости от результата теста проявляет соответствующую активность:

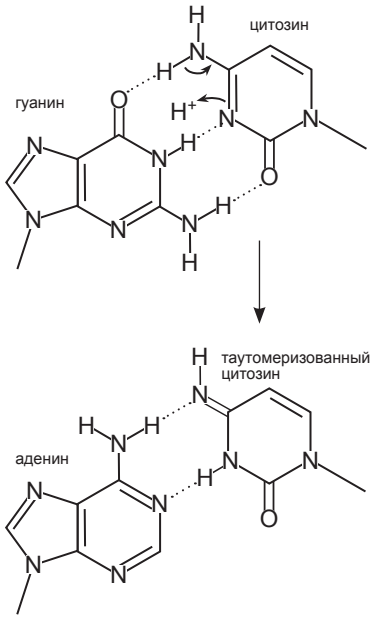


Рис. 19. Таутомеризация цитозина и образование неправильной пары

положительный ответ — продолжается синтез цепочки; отрицательный ответ — полимераза удаляет последний «неправильный» нуклеотид и лишь потом возобновляет синтез.

Таким образом, ДНК-полимераза является «самокорректирующим» ферментом. Данное свойство позволяет снижать частоту ошибки процесса полимеризации с 10^{-4} до 10^{-9}.

Интересно отметить тот факт, что свойство ДНК-полимеразы тестировать последнюю пару нуклеотидов и удалять «неправильные» нуклеотиды связано с двумя особенностями процесса репликации ДНК.

Во-первых, **синтез осуществляется в направлении 5′ → 3′.** В реакции полимеризации используется энергия расщепления фосфатной связи присоединяемого нуклеотида. Свободный 3′-конец растущей цепи ДНК не имеет фосфатной группы, поэтому отщепление «неправильного» нуклеотида принципиально не изменит конфигурацию 3′-конца цепи и будет узнаваться ДНК-полимеразой (рис. 20-А). К тому же для последующей попытки спаривания используется очередной нуклеозидтрифосфат, который выступает не только как строительный материал, но и источник энергии. Если бы синтез цепей ДНК проходил в направлении 3′ → 5′, то на 5′-конце растущей цепи находились бы три фосфатные группы. Отщепление же некорректного нуклеотида привело бы к изменению конфигурации, так как 5′-конец имел бы уже не три фосфатных группы, а всего лишь одну (рис. 20-Б). Конец цепи с измененным количеством фосфатных групп не узнавался бы ДНК-полимеразой, и синтез, соответственно, останавливался. В этом случае можно было бы предположить существование двух фосфорилирований исправленного 5′-конца. Однако это намного осложняло бы процесс репликации. Поэтому логично, что синтез цепей ДНК осуществляется в направлении 5′ → 3′.

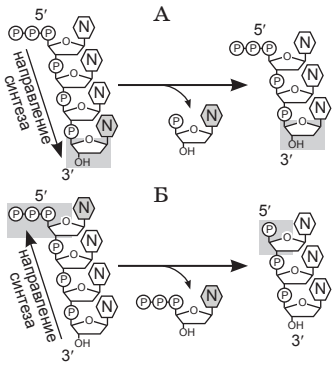


Рис. 20. Отщепление последнего нуклеотида синтезирующейся цепи ДНК;
А — при существующем направлении синтеза 5′→3′ после отщепления нуклеотида конфигурация 3′-конца не изменяется;
Б — при гипотетическом направлении синтеза 3′→5′ отщепление нуклеотида приводило бы к изменению конфигурации 5′-конца

Во-вторых, самокорректирующие свойства ДНК-полимеразы не

позволяют начать синтез новой цепи на матрице в отсутствии двух правильно спаренных нуклеотидов. Поэтому **для инициации полимеразной активности необходимо наличие затравки**. В роли затравки выступает **первичная последовательность** или так называемый **праймер** — небольшая цепочка РНК, длиной 10–60 нуклеотидов, комплементарная матрице. Для синтеза РНК не требуется затравка, так как ферменты, синтезирующие РНК, не тестируют правильность спаривания. Действительно, в РНК-транскриптах ошибки возникают намного чаще, чем в ДНК. Частота ошибок, возникающих при синтезе РНК и белка, может достигать 10^{-4}. Однако такая ошибка допустима, так как клетка может повторить синтез РНК и полипептидов неоднократно. Репликация ДНК требует высокой степени точности, поскольку в клетке осуществляется только один раз, и возникшая ошибка будет наследоваться дочерними клетками и их потомками. Накопление ошибок репликации подвергает большому риску жизнеспособность видов и даже их сохранность. РНК-праймаза подобно РНК-полимеразе катализирует синтез РНК, но использует одиночные цепи ДНК в качестве матрицы. РНК-праймаза не требует особых инициирующих последовательностей (затравки) и синтезирует лишь короткие РНК последовательности (несколько десятков нуклеотидов).

Итак, синтез ДНК начинается в точках инициации репликации после образования репликационного глаза. Синтез осуществляется в области двух репликационных вилок в двух противоположных направлениях. РНК-праймаза синтезирует короткий праймер на матричных (+)-цепях, после чего ДНК-полимераза **III**, используя праймер как затравку, начинает синтез ведущих цепей. Синтез отстающей цепи начинается с опозданием и протекает в направлении от репликационных вилок. Синтез протекает в той же последовательности: сначала синтезируется праймер, а затем — первый участок отстающей цепи ДНК. Синтезирующиеся фрагменты отстающей цепи получили название **фрагментов Оказаки**. У бактерий эти фрагменты состоят из 1–2 тысяч нуклеотидов, а у эукариот на порядок меньше — 100–200.

Через некоторое время, по мере раскручивания ДНК, РНК-праймаза начинает синтезировать новый праймер на некотором удалении от первого со стороны репликационной вилки. Синтез цепи ДНК протекает в сторону предыдущего праймера. Когда ДНК-полимераза **III, синтезирующая второй участок отстающей** цепи, достигает 5′-конец первого праймера, она уступает место

ДНК-полимеразе I. **Этот фермент продолжает синтез цепи** ДНК, одновременно удаляя нуклеотиды праймера.

После того как праймер полностью замещается цепью ДНК, процесс синтеза на этом участке отстающей цепи завершает ДНК-лигаза, соединяя конечную 3′-ОН-группу нового фрагмента с 5′-концевым фосфатом предыдущего (рис. 21). Лигазная реакция требует затраты энергии, которая поставляется в форме сопряженного гидролиза пирофосфатной связи **NAD**$^+$ (или ATP в животных клетках). Вначале ε-аминогруппа лизина ДНК-лигазы соединяется с аденозинмонофосфатом (AMP), **источником которого является NAD**$^+$ (или ATP), и переносит его на фосфатную группу 5′-конца. Таким способом на 5′-конце образуется ADP-группа. Затем гидролиз пирофосфатной связи сопрягается с конденсацией 5′ и 3′-концов фрагментов. Молекула AMP при этом выделяется.

Отличительной особенностью прокариотических ДНК-лигаз и эукариотических ДНК-лигаз I типа является их способность проявлять AMP-зависимую топоизомеразную активность, что придает этим ферментам большое значение при устранении топологических напряжений в новосинтезированных фрагментах Оказаки.

В соответствии с современными представлениями все белки, функционирующие в репликативной вилке, действуют не поодиночке, а образуют слаженно работающий огромный мультиферментный комплекс, получивший название реплисомы. Реплисома представляет собой комплекс высокого уровня организации, состоящий из праймосомо-праймазного комплекса, геликазы, ДНК-полимеразы III-холофермента и, возможно, гиразы.

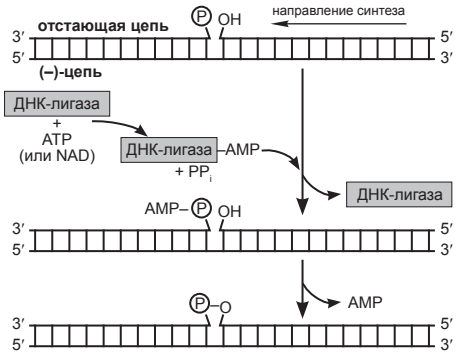


Рис. 21. ДНК-лигазная реакция

Реплисома может обеспечивать удлинение лидирующей цепи и одновременно инициацию праймерной РНК, а также достраивание ДНК при синтезе отстающей цепи. Эффективность репликации сильно возрастает вследствие тесного взаимодействия всех белковых компонентов реплисомы:

молекула праймазы (dnaG) непосредственно связана с ДНК-геликазой (dnaB), образуя на отстающей цепи структуру, называемую праймосомой, которая движется с репликативной вилкой и по ходу движения синтезирует РНК-праймеры. Молекула ДНК-полимеразы III (Pol III), работающая на отстающей цепи, также движется вместе с другими белками, синтезируя фрагменты Оказаки. Для этого, как полагают, цепь ДНК, служащая матрицей для синтеза отстающей цепи, должна складываться сама на себя (рис. 22). Благодаря этому все компоненты реплисомы, действующие в области репликативной вилки, объединяются в одну крупную структуру с молекулярной массой свыше 10^6 дальтон, и эта структура характеризуется однонаправленным движением. Рассматривается также гипотетическая модель репликации ДНК, в которой две реплисомы работают согласованно в двух вилках репликации, которые движутся в противоположных направлениях вдоль кольцевой хромосомы.

Почему праймаза не синтезирует ДНК?

Выше мы обсуждали вопрос, почему ДНК-полимераза не может синтезировать цепи ДНК без праймера. Однако остается вопрос, почему клетки не используют ДНК-праймазу вместо РНК-праймазы. Ведь в этом случае синтез ДНК мог бы быть более

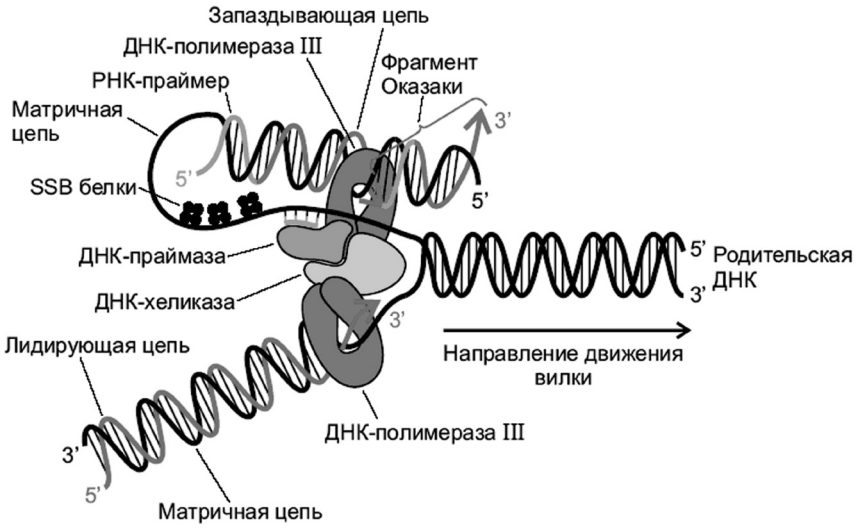


Рис. 22. Репликация ДНК — «модель тромбона» (по Russel, 1998)

экономичным, так как не пришлось бы удалять праймер. Дело здесь заключается в том, что если бы существовал фермент ДНК-праймаза, то он не обладал бы одновременно способностью начинать синтез праймера и тестировать правильность спаривания нуклеотидов, так как эти свойства являются взаимоисключающими. Таким образом, в праймерных участках частота ошибок достигала бы 10^{-5}–10^{-4}. При этом ДНК-полимераза не могла бы полностью проверить корректность спаривания в ДНК-праймере. Учитывая, что в эукариотических клетках фрагменты Оказаки повторяются, как правило, через каждые 200 нуклеотидов или меньше, а длина праймера достигает 60 нуклеотидов, то частота ошибок была бы в целом очень высокой. Во всяком случае, она намного бы превышала максимально допустимую ошибку для процесса репликации 10^{-8}. Этим можно объяснить невозможность существования и функционирования ДНК-праймазы.

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК ЭУКАРИОТ

Процессы удвоения ДНК у прокариотических и эукариотических организмов имеют общие принципы и в целом аналогичны. Однако у прокариот, вследствие более простой организации генома, репликация протекает с бóльшей скоростью — в синтезирующуюся цепь ДНК включается примерно 30 000–50 000 нуклеотидов в минуту. Размер генома эукариот намного превышает прокариотический, а скорость полимеризации у эукариот ниже на порядок. У млекопитающих она составляет около 3 000 нуклеотидов в минуту. Вероятно, это связано с тем, что удвоение ДНК у эукариот сопровождается сложными процессами, связанными с механическими и геометрическими изменениями структуры ДНК. Но, несмотря на это, репликация ДНК у эукариот имеет значительную обобщенную скорость за счет того, что в хромосомах одновременно функционируют многочисленные репликационные вилки (до нескольких десятков тысяч).

Количество точек начала репликации подсчитывают, исходя из средних размеров репликонов (расстояние между соседними точками начала репликации). Средний размер реплицирующихся единиц у разных таксономических групп эукариот составляет от 20 тысяч до 200 тысяч пар оснований. Учитывая размер генома, предполагают, что в гаплоидном геноме млекопита-

ющих количество репликонов составляет около 20 000–30 000, а у дрозофилы и *Saccharomyces cerevisiae*, соответственно, 3500 и 500.

Инициация репликации ДНК

Сайты начала репликации у эукариот содержат специфические структурно-функциональные элементы, необходимые для инициации репликации. У *Saccharomyces cerevisiae*, например, в точках начала репликации обнаружены два необходимых структурных компонента:

1) последовательность из 11 пар оснований (ACS), называемая элементом узнавания инициатора, которая входит в состав функциональной автономно реплицирующейся последовательности (ARS),
2) область, представляющая собой легко расплетаемый участок ДНК — DUE (DNA unwinding element).

Для функционирования точки начала репликации необходимы еще три последовательности, называемые B1, B2 и B3. Структурный элемент B3 представляет собой сайт взаимодействия с белковым ARS фактором 1, который действует одновременно как транскрипционный фактор. В точке начала репликации был обнаружен «глушитель» транскрипции, который необходим для инициации репликации и для репрессии транскрипции. Вероятно, что у эукариот в точках начала репликации действуют транскрипционные факторы (позитивно и/или негативно), которые приводят к раскрыванию DUE-элемента и последующему введению компонентов репликативной машины.

ДНК-полимеразы

В эукариотических клетках идентифицировано множество ДНК-полимеразных активностей, однако физические и функциональные свойства отдельных ферментов изучены менее детально, чем у соответствующих ДНК-полимераз прокариот.

Первый эукариотический фермент такого типа был выделен из тимуса теленка в 1960 году. До недавнего времени полагали, что эукариотические клетки содержат ДНК-полимеразы, относящиеся к трем классам: α, β и γ. Было известно, что ДНК-полимераза α, являясь ядерным ферментом, представляет собой единственную полимеразу, уровень которой существенно возрас-

тает в момент репликации хромосомной ДНК. Ее полимеразная активность связана с большим полипептидом, но она существует и функционирует как мультисубъединичный белок, аналогично холоферменту ДНК-полимеразы *E. coli*.

В настоящее время у эукариот обнаружено 7 типов ДНК-полимераз, которые обозначают греческими буквами — α, β, γ, δ, ε, ζ и η. Среди этих ферментов главенствующую роль в процессе репликации ядерной ДНК играют **ДНК-полимеразы δ и ε**. Эти полимеразы были открыты намного позже ДНК-полимераз α, β и γ. Трудность в обнаружении ДНК-полимераз δ и ε связана с тем, что активность обеих этих форм зависит от вспомогательных белков, входящих в состав функциональных комплексов этих ферментов.

В клетках дрожжей ДНК-полимеразы δ и ε, как и ДНК-полимераза α, абсолютно необходимы для репликации хромосомной ДНК. Холофермент ДНК-полимеразы δ осуществляет синтез лидирующей нити, а холофермент ДНК-полимеразы ε — синтез запаздывающей нити в репликативной вилке. Обе ДНК-полимеразы обладают 3′-экзонуклеазной активностью, необходимой для удаления неправильно спаренных нуклеотидов. Тем не менее, частоты ошибок при синтезе лидирующей и запаздывающей нитей отличаются.

ДНК-полимераза α состоит из нескольких субъединиц (500 кДа), одна из которых выполняет функцию РНК-праймазы, синтезируя короткие РНК-затравки — праймеры (около 10 нуклеотидов). Данный фермент необходим для формирования праймосомы и инициации репликации. Сначала ДНК-полимераза α инициирует синтез лидирующей цепи, а затем инициируется синтез фрагментов Оказаки. Уровень активности данного фермента увеличивается в S-фазу клеточного цикла.

ДНК-полимераза β представляет собой полипептид с молекулярной массой около 40 кДа и является главным ядерным ферментом репарации ДНК. Она достраивает короткие выломы в одной из цепей ДНК, используя вторую цепь в качестве матрицы.

ДНК-полимераза γ представляет собой репликазу митохондриальной ДНК. Небольшой фермент, состоящий из нескольких субъединиц (50 кДа).

ДНК-полимераза ζ (173 кДа) осуществляет синтез ДНК на поврежденной матрице при SOS-репарации.

ДНК-полимераза η (70 кДа) осуществляет синтез ДНК на поврежденной матрице.

Проблема концевой репликации

У прокариот ДНК кольцевая, то есть замкнутая, и отсутствие концов позволяет ДНК-полимеразам осуществлять репликацию по всей длине молекулы. Где бы ни находился праймер, он будет замещен соответствующими дезоксинуклеотидами. ДНК-полимеразы прокариот при синтезе любого участка цепи имеют возможность контактировать с ДНК, поскольку она не имеет концов. У эукариотических организмов, имеющих линейные молекулы ДНК, возникает **проблема концевой репликации**, которую также называют **«проблемой концевой недорепликации»**. Впервые на этот феномен обратил внимание в 1971 году А. М. Оловников. Тогда же он высказал гипотезу о том, что потеря концевых участков хромосом вследствие недорепликации приводит к старению клетки.

Синтез 5′-концевых участков ДНК невозможен, поскольку для инициации синтеза необходим праймер. В лучшем случае праймер может быть синтезирован на самом 3′-конце матрицы. Однако, по завершению репликации, этот праймер будет удален нуклеазами, а синтез цепи ДНК на его месте не произойдет из-за отсутствия затравки (рис. 23-А). Синтез в обратном направлении 3′ → 5′ также не осуществляется, что связано с самокорректирующими свойствами ДНК-полимеразы, которые обсуждались ранее. Поэтому неизбежно, что в результате репликации линейной молекулы ДНК дочерние цепи будут короче исходных матриц, причем материнские цепи будут выступать со стороны 3′-концов. Таким образом, после завершения полимеризации на 3′-концах матричных цепей остаются одноцепочечные неспаренные участки. Далее, с каждым циклом деления клетки, ДНК будет продолжать укорачиваться. Укорочение ДНК может привести к потере ряда важных генов, а соответственно — и к нарушению функционирования как отдельной клетки, так и организма в целом. Несмотря на такую опасность, укорочение ДНК в соматических клетках эукариотических многоклеточных организмов является нормальным процессом. Дифференцированные клетки, по сути, запрограммированы на ограниченное количество делений. Например, клетки новорожденного человека в культуре способны делиться 80–90 раз, а 70-летнего человека — только 20–30. Данный эффект непосредственно связан с укорочением ДНК. Однако существуют клетки, которые являются не стареющими. Это эмбриональные, стволовые и генеративные клетки. В этих клет-

ках существует механизм, который направлен на предотвращение укорочения ДНК, поэтому они, обладая способностью к неограниченному делению, никогда не теряют важных участков генома.

Преодоление проблемы укорочения ДНК у эукариот решается с помощью особого фермента **теломеразы**, который предотвращает этот процесс. Теломераза удлиняет 3′-конец хромосомы путем добавления к нему коротких тандемных повторов. Вторая нить удлиняется обычным образом с участием праймазы и ДНК-полимеразы. Таким образом, на концах хромосом у эукариот образуются многократно повторяющиеся последовательности. Концевой участок ДНК, содержащий эти повторы, называют **теломерой**. Строго говоря, теломера, как и хроматин в целом, представляет собой структуру, которая включает в себя не только собственно ДНК, но и белки (структурные, регуляторные и ферменты). Кроме того, часть теломеры представлена двойной комплементарной цепью, другая — 3′-концевая часть — одноцепочечная. Теломера, как ДНК-белковый комплекс, существует в виде довольно сложной третичной структуры. Но одной из наиболее важных характеристик является наличие многократных тандемных повторов. Интересно, что практически у всех исследованных орга-

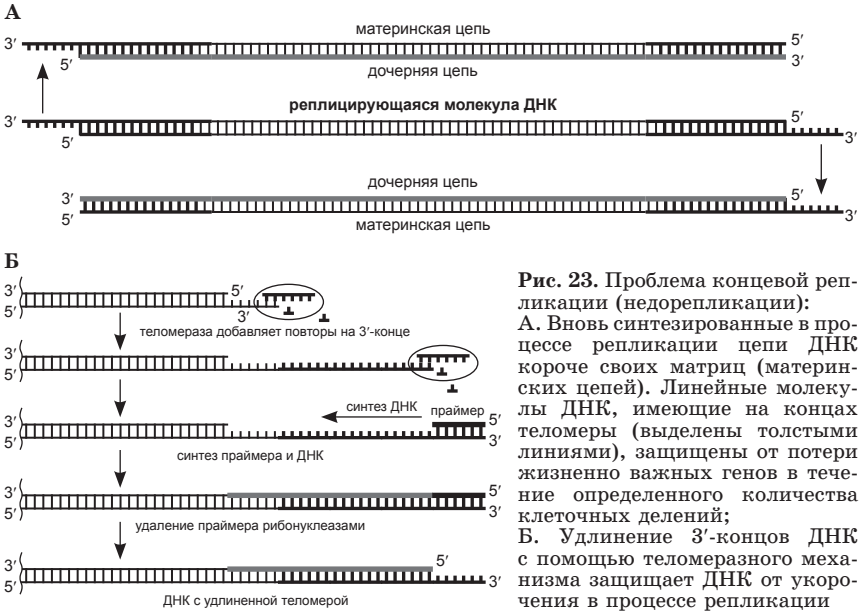


Рис. 23. Проблема концевой репликации (недорепликации):
А. Вновь синтезированные в процессе репликации цепи ДНК короче своих матриц (материнских цепей). Линейные молекулы ДНК, имеющие на концах теломеры (выделены толстыми линиями), защищены от потери жизненно важных генов в течение определенного количества клеточных делений;
Б. Удлинение 3′-концов ДНК с помощью теломеразного механизма защищает ДНК от укорочения в процессе репликации

низмов последовательности этих повторов очень близки и состоят из 6–8 нуклеотидов. Одна нить теломеры обогащена остатками гуаниловой кислоты, а вторая — цитидиловой. У позвоночных 3′-концы теломер содержат шестинуклеотидные повторы 5′–TTAGGG–3′, у всех наземных растений, а также у морских водорослей повторы состоят из семи нуклеотидов 5′–**TTTAGGG–3′**, а у одноклеточного простейшего ресничной инфузории *Tetrahymena* — 5′–**TTGGGG–3′**.

Фермент теломераза, добавляющий повторы на 3′-концах хромосом, представляет собой рибонуклеопротеид. Он состоит из нескольких субъединиц, основными из которых являются две: полипептид TERT и РНК TER.

1) **TER — РНК, которая выполняет роль** матрицы в механизме удлинения цепи ДНК. TER может быть различной длины, например, у человека она состоит из 450 нуклеотидов, у простейших — 150–200, а у дрожжей достигает 1300. В качестве рабочей поверхности используется, как правило, участок РНК, не превышающий по размеру двух повторов. Этот участок расположен на поверхности молекулы фермента в реакционном центре. Одна часть используется для взаимодействия с ДНК, а вторая служит матрицей для синтеза.
2) **TERT — каталитически активный полипептид, обладающий** свойствами обратной транскриптазы, которая осуществляет синтез цепи ДНК на РНК-матрице (TER).

В составе теломеразы обнаруживаются и другие частицы. Полный субъединичный состав этого фермента и функции этих субъединиц до конца не выяснены. Один из них — полипептид, получивший название TEP1, выполняет, вероятно, регуляторную функцию, поскольку в экспериментах in vitro активную теломеразу можно сконструировать без этой частицы. Предполагают также, что теломераза может содержать отдельные субъединицы, которые способствуют заякориванию фермента на теломере, обладают экзонуклеазными свойствами и др.

Механизм удлинения ДНК осуществляется следующим образом (рис. 23-Б). Теломераза находит 3′-конец теломерной ДНК и присоединяется к теломере за счет образования комплементарного комплекса одноцепочечного 3′-конца ДНК и TER. Затем обратная транскриптаза TERT, используя 3′-конец ДНК в качестве затравки, начинает удлинять 3′-конец цепи ДНК, используя в качестве матрицы TER. В клетках человека, как и у других млекопитающих, теломераза добавляет шестинуклеотидную пос-

ледовательность 5′–TTAGGG–3′. По завершению одной фазы удлинения теломераза перемещается на вновь синтезированный 3′-конец цепи ДНК и добавляет еще один повтор. Комплементарный 5′-конец ДНК синтезируется обычным способом с участием праймазы и ДНК-полимеразы. За один клеточный цикл теломераза наращивает от нескольких десятков до нескольких сотен нуклеотидов, что компенсирует возможные потери нуклеотидов в процессе репликации.

Активность теломеразы в клетках позволяет им делиться неограниченное количество раз, поэтому она необходима, главным образом, для одноклеточных эукариот (например, дрожжей). Поскольку клетки таких организмов являются «бессмертными», им всегда необходима теломеразная активность. У многоклеточных организмов дело обстоит иначе. Гены, кодирующие субъединицы теломеразы, есть абсолютно у всех эукариот. Однако проявляется теломеразная активность далеко не во всех клетках. Так, у большинства соматических клеток многоклеточных животных теломеразная активность отсутствует. Например, у человека в соматических клетках (кроме стволовых) репрессирован ген *TERT*, хотя экспрессия генов *TER* и *TEP1* имеет, по всей видимости, конститутивный характер. В половых и стволовых клетках, количество делений которых не ограничено, обнаруживается теломеразная активность. Более того, у животных, в том числе и у человека, теломеразная активность в клетке является признаком того, что она способна к неограниченному количеству делений. Деление клеток у многоклеточных организмов контролируется механизмом, который известен как «ворота клеточного деления». В норме в соматических клетках этот механизм репрессирован, но если в силу ряда причин (онкогены, облучение, заболевания и травмы) происходит активация «ворот клеточного деления», это может привести к неконтролируемому клеточному делению и образованию раковых опухолей. Поскольку деление клеток, как правило, сопровождается теломеразной активностью, теломераза в последнее время рассматривается онкологами и молекулярными биологами как основная мишень для борьбы со злокачественными опухолями.

В процессе развития эмбриона млекопитающих в клетках затухает активность теломераз, в то время как деление клеток еще продолжается. Поэтому у взрослых организмов длина хромосом всегда меньше, чем у более молодых, так как при каждом делении клетки линейная ДНК укорачивается. Именно поэтому овечка Долли, клонированная из клеток молочной железы 6-летней

овцы, родилась если и не 6-летней овцой, то состояние генома Долли не соответствовало состоянию геномов новорожденных представителей ее вида.

При отсутствии теломеразной активности длина молекул ДНК делящихся клеток млекопитающих неуклонно уменьшается в процессе репликации. Хромосомы человека, к примеру, при делении соматических клеток укорачиваются в среднем на 50–200 нуклеотидов, которые уже не возобновляются. Тем не менее, такие клетки не теряют жизненно важных участков генома.

Рост животных организмов, как правило, детерминирован, и соматические клетки в процессе жизни делятся ограниченное количество раз. От потери жизненно важных генов они защищены благодаря наличию теломер на концах хромосом. Эти структуры имеют достаточно большую длину, что позволяет осуществить некоторое количество репликаций без потери функций.

Итак, эукариоты имеют два способа защиты от потери жизненно важных участков генома в процессе репликации линейных молекул ДНК:

1) наличие на концах буферной зоны в виде многократно повторяющихся последовательностей (теломер), укорочение которой не сопровождается потерей важных транскрибируемых участков при ограниченном количестве клеточных делений;
2) функционирование теломеразного механизма, способствующего удлинению молекулы ДНК у бессмертных клеток.

ТИПЫ ГЕНОВ И ИХ СТРУКТУРА

Ген (от греч. genos — род, происхождение). Элементарная единица наследственности, представляющая собой фрагмент ДНК, кодирующий РНК или полипептидную цепь. Кодирующий участок гена ассоциирован с определенными регуляторными последовательностями, которые необходимы для реализации заложенной в нем информации. Как правило, любой ген связывают с определенным фенотипическим признаком, который, в свою очередь, является результатом сложного взаимодействия генов.

Согласно центральной биологической догме, информация, заложенная в ДНК (у РНК-содержащих вирусов — в РНК), реализуется в результате двух основных механизмов: транскрипции (синтез РНК) и трансляции (синтез белка). Генетический материал, представляющий собой последовательность нуклеотидов, имеет строгую организацию. Определенные участки матрицы служат матрицей для синтеза РНК разных видов. Один из видов РНК — матричные РНК, — в свою очередь, являются матрицами для синтеза полипептидов, который осуществляется на рибосомных комплексах. Для успешной реализации генетической программы необходимо функционирование разнообразных регуляторных механизмов, которые обеспечивают синтез определенного набора РНК и полипептидов, в требуемом для нужд клетки количестве. Регуляция механизмов синтеза РНК и белка чрезвычайно сложна и многоэтапна. Рассмотрение этого вопроса необходимо начать с материального обеспечения процесса. Первичная структура ДНК не только несет информацию о последовательности РНК и белков, но и содержит регуляторные участки, указывающие точки начала и конца синтеза, а также места связывания белков, модулирующих активность экспрессии генов.

Ген — это функционально неделимая единица генетического материала. Ген состоит из структурной и регуляторных частей. Регуляторные участки служат для инициации и терминации транскрипции, а структурная часть используется в качестве матричной

поверхности для синтеза РНК. Гены кодируют различные виды РНК — рибосомные, транспортные, малые, микроРНК и матричные (или информационные). Все виды РНК, кроме матричных, являются конечными продуктами синтеза, тогда как мРНК используются в качестве матриц для синтеза полипептидов.

Существует множество различных типов генов, отличающихся друг от друга строением и способом регуляции. В связи с таким разнообразием, могут возникнуть трудности с определением, что такое ген.

В 1957 году был введен термин **цистрон**, который обозначает генетическую единицу функции. Он был разработан на основе *цис/транс* теста (функциональный тест на аллелизм или тест на комплементацию) (рис. 24). Предположим, в геноме существуют две рецессивные мутации, нарушающие один и тот же признак. Если обе мутации находятся в одной из хромосом (в *цис*-положении), то проявляется дикий фенотип (рис. 24-А). Когда мутации находятся в разных хромосомах (в *транс*-положении), то возможны два варианта. Если мутации затрагивают участки генома, определяющие образование различных белков, взаимодействие которых способствует проявлению признака, то фенотип будет диким (рис. 24-Б). В таком случае говорят, что гены (дикого типа и мутантный) комплементируют друг друга. Если же комплементации не наблюдается, то обе мутации нарушают синтез одного продукта (рис. 24-В). Генетическую единицу, в пределах которой две мутации не могут комплементировать, назвали цистроном. Комплементация мутаций является при-

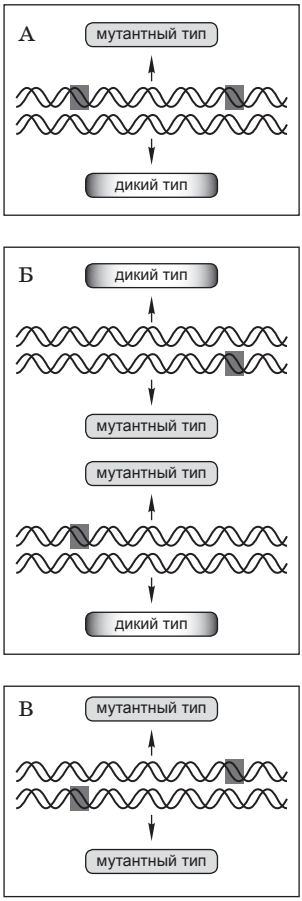


Рис. 24. Тест на комплементацию для выявления функциональной единицы цистрон:
А. Мутации в одной копии гена (*цис*-конфигурация). Проявляется дикий фенотип;
Б. Мутации в разных генах. В любом случае (при *транс*- и *цис*-конфигурациях) наблюдается комплементация и проявляется дикий фенотип;
В. Мутации в разных копиях одного гена (*транс*-конфигурация). Комплементации нет, проявляется мутантный фенотип

знаком того, что они принадлежат двум разным цистронам. Таким образом, под понятием цистрон подразумевают последовательность нуклеотидов, кодирующих одну полипептидную цепь. Однако подобное определение гена, вероятно, будет недостаточным.

Принципиальная возможность и частота экспрессии гена определяется разными факторами, но непосредственное регулирование синтеза РНК происходит через промотор. Также гену необходим участок, указывающий место прекращения транскрипции. Следовательно, в гене должны присутствовать регуляторные участки. Более того, мутации в промоторе, нарушающие его взаимодействие с регуляторными белками и РНК-полимеразой, могут привести к невозможности синтеза продукта гена. С этой точки зрения ген состоит из трех основных частей: промотора, структурного участка и терминатора. Тогда как определить генетическую структуру, в которой под контролем одного промотора осуществляется синтез нескольких полипептидов (или РНК)? Что в данном случае можно назвать геном: каждый из участков, кодирующих отдельную полипептидную цепь (или РНК), или всю генетическую конструкцию в целом?

Гены часто делят на моноцистронные и полицистронные, подразумевая под понятием «ген» участок ДНК, на котором под контролем одного промотора находятся одна или несколько кодирующих последовательностей. С другой стороны, в полицистронных генах каждый участок, кодирующий отдельную полимерную цепь, часто тоже рассматривают как ген. И в одном, и в другом случае нет грубых принципиальных ошибок. Чтобы избежать трудностей в использовании терминов, понятие «ген» чаще используется для обозначения моноцистронных генов или участка полицистронного гена, кодирующего отдельный белок или РНК. Для полицистронных генетических конструкций приняты особые обозначения. Таким образом, понятие **ген** можно считать эквивалентным понятию **цистрон**.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

Моноцистронный ген состоит из промотора, структурной части и терминатора (рис. 25-А). В состав промотора входят участки связывания РНК-полимеразы и регуляторных молекул. В зависи-

мости от типа генов, регуляторные участки могут находиться как до участков связывания РНК-полимеразы, так и после него (между участком связывания и структурным участком). Сайты связывания РНК-полимеразы и белков-регуляторов могут перекрываться, что важно для осуществления регуляции. Активаторные белки часто называют транскрипционными или *транс*-активными факторами. В свою очередь, нуклеотидные последовательности промотора, ответственные за связывание активатора, называют *цис*-активными элементами. Активаторы транскрипции связываются с *цис*-активными элементами промотора и способствуют посадке РНК-полимеразы на промотор, инициируя, таким образом, синтез РНК. Ингибиторы, наоборот, предотвращают это связывание, репрессируя транскрипцию. Существуют также регуляторы, имеющие вспомогательную роль, — они ослабляют или усиливают активность генов, которую обеспечивают основные регуляторы.

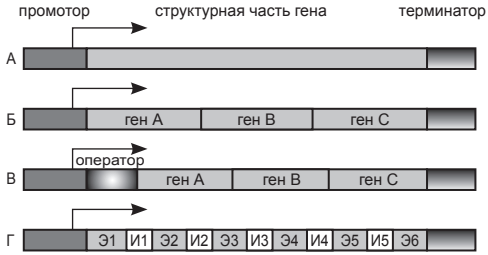


Рис. 25. Схема строения различных типов генов:
А — моноцистронный; Б — транскриптон; В — оперон; Г — прерывистый

Структурная часть моноцистронного гена кодирует одну РНК или полипептидную цепь. Пару нуклеотидов, с которой начинается синтез РНК, называют стартовой точкой, и ее номер принят за 1. Дальнейшая нумерация идет в направлении считывания информации. Все нуклеотиды промотора нумеруются от стартовой точки в обратном направлении и имеют отрицательные номера.

Заканчивается ген терминатором, который содержит последовательность, необходимую для прекращения транскрипции. Терминация процесса, как правило, требует активности дополнительных белков, останавливающих синтез РНК. Однако в ряде случаев необходимости в подобных белках нет.

Независимые гены по структуре чаще являются моноцистронными. Однако транскрипционная активность этих генов не регулируется. РНК-полимераза узнает сигнальную последовательность участка связывания и начинает синтез РНК. Никакие ограничения не препятствуют работе полимеразы. Независимые гены, таким образом, имеют конститутивную форму экспрессии, то есть РНК синтезируется всегда с определенной скоростью. Как

правило, такие гены кодируют регуляторные белки, участвующие в модуляции генной экспрессии. В геноме прокариот независимые гены часто располагаются в непосредственной близости от промотора, с которым связывается белковый продукт гена.

Транскриптон (транскрипционная единица или полицистронный ген) представляет собой группу следующих друг за другом генов, которые контролируются одним промотором (рис. 25-Б). После синтеза транскрипта происходит его созревание, в процессе которого образуются отдельные молекулы РНК. Большинство генов, входящих в состав транскриптонов, кодируют рибосомные и транспортные РНК. У эукариот транскриптоны кодируют также малые РНК, которые в составе рибонуклеопротеиновых комплексов участвуют в процессинге различных видов РНК. Гены, входящие в состав транскриптонов, как правило, кодируют РНК (реже — белки), функционально связанные друг с другом. Например, у эукариот один из транскриптонов кодирует 45S транскрипт, который после синтеза разделяется на три рРНК: 18S, 5,8S и 28S. Транспортные, 5S рибосомная, а также малые РНК кодируются тоже транскриптонами. (Более подробно о типах РНК и их функциональных свойствах см. в разделе «Синтез РНК».) У прокариот аналогичный транскриптон кодирует 16S, 23S и 5S рРНК, а также несколько тРНК. Гены, кодирующие транспортные РНК, располагаются, как правило, друг за другом в виде кластеров, причем синтез тРНК, входящих в состав кластера, контролируется одним промотором. В геноме *E. coli* обнаружен целый ряд транскриптонов, кодирующих не только тРНК, но и белки. Например, кластер *tyrU* включает в себя гены четырех тРНК (тРНК^{Thr}, тРНК^{Tyr}, тРНК^{Thr}, тРНК^{Gly}), а также ген *tufB*, который является одним из генов, кодирующих фактор элонгации **EF-Tu. Бактериальные** транскриптоны, имеющие оператор — особую структуру для связывания репрессора, — называют оперонами.

Оперон — это группа идущих друг за другом генов, которые контролируются одним промотором. Главной особенностью оперонов является наличие **оператора**, который находится между промотором и структурной частью (рис. 25-В). Оператор служит для связывания репрессора, ингибирующего синтез РНК. Области промотора и оператора обычно перекрываются, поэтому репрессор, находящийся на операторе, предотвращает не только движение РНК-полимеразы по оперону, но и связывание фермента с промотором. Опероны характерны исключительно для прокариотических организмов и поражающих их вирусов.

Прерывистые гены представляют собой чаще моноцистронные гены, кодирующие белки. Реже прерывистыми являются гены, кодирующие рибосомные и транспортные РНК. Гены, имеющие нетранслируемые участки, в большей степени характерны для эукариот, а в прокариотических геномах встречаются довольно редко. Также прерывистые гены обнаружены у вирусов, поражающих эукариотические клетки, например **SV40. Структурная** последовательность прерывистых генов состоит из **экзонов** и **интронов** (рис. 25-Г), причем белок кодируется, как правило, только экзонами. В процессе транскрипции синтезируется предшественник матричной РНК, который подвергается **сплайсингу**, в результате которого образуется мРНК, состоящая только из экзонных участков.

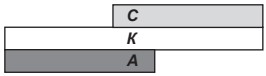
Некоторые прерывистые гены имеют один или два интрона. К примеру, гены, кодирующие α- и β-частицы гемоглобина у разных животных, содержат по два интрона. Ген овальбумина курицы имеет 8 интронов, а ген про-α2-коллагена — более 50. Интроны вырезаются при созревании мРНК и гидролизуются нуклеазами. Однако нередко интронные последовательности кодируют малые ядерные (мяРНК) или малые цитоплазматические РНК (мцРНК), которые участвуют в сплайсинге и модификации различных видов РНК, а также выполняют другие функции (этот вопрос обсуждается в разделе «Синтез, строение и функции малых РНК»).

Экзон — любой отдельный фрагмент прерывистого гена, который сохраняется в зрелой мРНК. Экзоны содержат кодирующие участки и регуляторные области, обеспечивающие регуляцию процессов трансляции.

Интрон — транскрибируемый участок гена, который удаляется из транскрипта в процессе сплайсинга. Интроны прерывистых генов могут содержать гены, кодирующие малые ядрышковые РНК.

У *Drosophila melanogaster* было обнаружено, что около двух третей генов, кодирующих 28S рРНК, прерываются интроном длиной 5 т.п.н. Однако считается, что для синтеза 28S рРНК используются только те гены, которые интронов не имеют. Интрон-содержащие гены рассматриваются как нефункционирующие. У ряда низших эукариот найдены гены, кодирующие рРНК и тРНК, содержащие интроны, которые удаляются из транскриптов путем сплайсинга.

Перекрывающиеся гены впервые были найдены у вируса ϕX174, поражающего *E. coli*. В 1977 году Сэнгер с сотрудниками обнаружили, что у этого вируса три гена К, С и А используют одни и те



ген *C*	AA **ATG A**GG A start arg
ген *K*	A A**AT GA**G GA asn gln
ген *A*	AA**A TGA** GGA lys stop

Рис. 26. Перекрывающиеся гены *C*, *K* и *A* у вируса ϕX174

же нуклеотидные последовательности, причем каждый из генов в общих участках кодирует разные аминокислоты (рис. 26). Точки, с которых инициируется транскрипция данных генов, занимают такое положение, что считывание нуклеотидной последовательности происходит со сдвигом рамки. Четыре общих нуклеотида (ATGA), используемых тремя генами, входят в состав триплетов, кодирующих или две аминокислоты (аспарагин и глутамин у гена K), или инициирующий кодон (метионин) и аргинин (ген C), или лизин и стоп-кодон (ген A).

Перекрывание генов позволяет использовать генетический материал с большой степенью экономности, однако, с другой стороны, это ограничивает варьирование последовательности в процессе эволюции, так как благоприятные или нейтральные мутации для одного гена могут сделать другой ген непригодным. Для вирусов наличие перекрывающихся генов позволяет использовать носитель генетической информации минимального размера. Кроме вирусов, перекрывающиеся гены обнаружены и у животных, но не в ядерном геноме, а в ДНК митохондрий. Митохондриальная ДНК (мтДНК) животных отличается от мтДНК растений и грибов значительно меньшими размерами. У животных она состоит из 14–42 т.п.н. (чаще 16–17), тогда как у растений ее размер колеблется от 180 до 2500 т.п.н. По этой причине организация мтДНК животных чрезвычайно экономна. Гены разделены короткими спейсерами (1–9 нуклеотидов). Многие митохондриальные гены примыкают вплотную друг к другу или даже перекрываются. Перекрывание генов в мтДНК может достигать от 1 до нескольких десятков нуклеотидов. Например, гены, кодирующие субъединицы митохондриальной АТР-азы *atp6* и *atp8*, у птиц и амфибий перекрываются на 10 п.н., у быка — на 40, у мыши — на 43, а у человека — на 46.

УЧАСТКИ УЗНАВАНИЯ И СВЯЗЫВАНИЯ

Инициация синтеза определенных видов РНК зависит от многих внешних и внутренних факторов и является намного более сложным и ответственным процессом, чем собственно синтез. Он

включает в себя узнавание РНК-полимеразой особых участков связывания на промоторе и взаимодействие полимеразного фермента с регуляторными белками, активирующими или предотвращающими начало транскрипции.

Промоторы всех генов содержат участки связывания РНК-полимеразы и факторов транскрипции. Исключение составляют гены эукариот, которые транскрибируются РНК-полимеразой III. Этот фермент узнает не нуклеотидные последовательности промотора, а специфические регуляторные белки, которые в олигомерной форме связываются с транскрибируемым участком гена.

Минимальная длина участка промотора, достаточная для создания необходимого сигнала, определяется размером генома. Чем он больше, тем длиннее должны быть участки узнавания. Более короткие участки могут встречаться чаще, в том числе — за пределами промоторов, и создавать ложный сигнал. Этим объясняется принципиальное различие между размером участков узнавания у прокариот и эукариот. У бактерий длина такого участка составляет 12 п.н., а в промоторах белок-кодирующих генов эукариот — не менее 16. И это при том, что в эукариотических промоторах присутствуют, как правило, множественные участки узнавания разных типов (см. далее), а в процессах инициации транскрипции существенное значение имеют транскрипционные факторы, которые обеспечивают дополнительную поверхность для связывания РНК-полимеразного комплекса. Транс-факторы используют собственные специфические участки узнавания в промоторах генов. В активации одного гена могут участвовать несколько транскрипционных факторов, каждый из которых связывается с ДНК в нескольких (не менее двух) высококонсервативных участках. Таким образом, реальный уровень специфичности взаимодействия РНК-полимеразы II с промоторами генов намного выше того, который позволяют достичь только лишь участки узнавания.

Участки связывания являются консервативными последовательностями и могут быть идентифицированы путем сравнения промоторных последовательностей различных генов. Однако участки связывания РНК-полимеразы I таким способом идентифицировать невозможно, поскольку она транскрибирует гены одного типа. Сигнальные последовательности для РНК-полимеразы I можно обнаружить только путем мутационного анализа.

Консервативные сигнальные участки промоторов, как правило, не являются непрерывными и представлены двумя более

короткими последовательностями, отделенными друг от друга участком, который не обладает специфичностью.

У прокариот РНК-полимераза взаимодействует с 60 нуклеотидными парами, однако консервативные участки прочного связывания представлены двумя областями по 6 п.н. Первый участок получил название **блок Прибнова**. Эта последовательность не является строго постоянной, но всегда сходна с последовательностью TATAAT. Как правило, именно такая последовательность довольно редкая, но в реально существующих блоках каждый из нуклеотидов встречается в указанном положении с большой вероятностью. Последовательность TATAAT, следовательно, является среднестатистической или канонической.

$$T_{80}\,A_{95}\,t_{45}\,A_{60}\,a_{50}\,T_{96}$$

(цифровые индексы показывают частоту встречаемости нуклеотида в определенном положении, маленькими буквами обозначены наименее консервативные основания)

Положение блока Прибнова в промоторах варьирует: от −14 до −5 (чаще от −14 до −8). Но поскольку центр участка находится примерно на расстоянии 10 п.н. от стартовой точки, его положение обозначают как −10.

В блоке Прибнова обращает на себя внимание то, что он состоит преимущественно из A=T пар. Энергия связи A=T пары в полтора раза меньше, чем у пары G≡C, **и следовательно, ее легче разорвать.** Не исключено, что блок Прибнова предназначен не только для узнавания, но также он важен для облегчения локального плавления ДНК и образования одноцепочечных участков. Даже несмотря на то, что пары G≡C **можно обнаружить в блоке,** количество A=T пар всегда остается превалирующим. Наличие максимального количества A=T пар в блоке Прибнова способствует более эффективной транскрипции. Вместе с тем, реально существующие промоторы часто содержат G≡C пары. К примеру, промотор *lac*-оперона дикого типа содержит последовательность TATGTT. **Мутация, в результате которой происходит замена** гуанина на аденин **(TATATT), приводит к увеличению степени** гомологии с канонической последовательностью блока Прибнова. Мутантный в области промотора *lac*-оперон обладает более высокой активностью экспрессии по сравнению с опероном дикого типа. Вероятно, подобная мутация не была отобрана в процессе эволюции, так как существующая эффективность транскрипции *lac*-оперона дикого типа является оптимальной.

Вторая консервативная последовательность в промоторах бактериальных генов локализуется в положении −35. Эта последо-

вательность не входит в область прочного связывания, однако она необходима для узнавания РНК-полимеразой. Эта последовательность имеет вид **TTGACA и детально описывается следующим образом:**

$$T_{82}\,T_{84}\,G_{78}\,A_{65}\,C_{54}\,a_{45}.$$

Участок в положении −35 часто называют **областью узнавания.** В ряде промоторов этой области не обнаружено. Вероятно, положение −35 определяет эффективность узнавания промотора РНК-полимеразой. Следует заметить, что в некоторых генах отсутствует и блок Прибнова. То есть, ни одна из консервативных областей не является абсолютно обязательной для инициации экспрессии, но большинство промоторов используют положения −10 и −35. Расстояние между этими положениями варьирует от 16 до 19 п.н. Промоторы, не имеющие этих областей, по-видимому, обладают другими способами узнавания.

Промоторы генов эукариот организованы намного сложнее. Но в целом эукариотические и прокариотические гены проявляют определенную гомологию в зоне инициации транскрипции. Во-первых, гомология обнаруживается в стартовой точке (синтез РНК начинается с пуринового основания), во-вторых, в участках связывания РНК-полимеразы. В промоторах эукариотических полипептид-кодирующих генов (промоторы класса II) выявлено большее количество различных участков связывания РНК-полимеразы. Некоторые из них близки по структуре подобным участкам прокариот. Однако у эукариот они несколько большего размера и находятся на большем удалении от стартовой точки и друг от друга.

Промотор класса II можно разделить на базальный (коровый), проксимальный и дистальный элементы. Классический базальный элемент промотора класса II содержит **ТАТА-бокс**, расположенный приблизительно за 25 пар оснований от участка старта транскрипции (−19...−27), и инициаторный элемент — специфическую нуклеотидную последовательность, находящуюся в районе старта.

ТАТА-бокс или **блок Хогнесса** состоит из 7 п.н. Среднестатистическая последовательность выглядит так:

$$T_{82}\,A_{97}\,T_{93}\,A_{85}\,(A_{63}\backslash T_{37})\,A_{83}\,(A_{50}\backslash T_{33}).$$

Этот участок, как и блок Прибнова, состоит преимущественно из A=T пар и фланкирован участками, обогащенными G и C.

G≡C пары в ТАТА-блоке встречаются очень редко. Значительное сходство этой последовательности с блоком Прибнова указывает на их аналогичные функции.

Проксимальные элементы располагаются в пределах 50–200 пар оснований от участка старта транскрипции и содержат сайты связывания белков — активаторов транскрипции.

Наиболее характерной для многих промоторов эукариот последовательностью является **СААТ-блок**, который находится в положении –75 (–70...–80). Более полный вид этой последовательности: **GGC(T)CAATCT. Еще на большем растоянии от стартовой** точки находится GC-блок (GGCCGG).

Промоторы эукариот содержат различные комбинации промоторных элементов, причем ни один из них не является универсальным, то есть не характерен абсолютно для всех генов. Существуют неканонические промоторы класса II, не содержащие ТАТА-доменов. Некоторые промоторы имеют более одной копии CAAT или GC. Предполагается, что домен CAAT играет существенную роль в инициации транскрипции, а ТАТА и GC-блоки выполняют вспомогательную роль. Блок Хогнесса у ТАТА-содержащих генов играет принципиальную роль в процессах плавления ДНК в области промотора.

Дистальные элементы, представляющие собой **энхансеры**, могут располагаться на произвольном расстоянии в любой ориентации по отношению к участку старта транскрипции.

Энхансеры представляют собой совокупность коротких последовательностей ДНК, которые состоят из отдельных элементов (модулей), включающих от 50 до 1500 пар нуклеотидов. Энхансеры содержат сайты связывания факторов транскрипции, благодаря чему участвуют в сборке сложных белковых комплексов, которые обеспечивают высокоспецифические белок-белковые взаимодействия с компонентами преинициаторного комплекса и передачу регуляторных сигналов РНК-полимеразе II. Энхансеры не являются обязательными для экспрессии генов, однако повышают эффективность транскрипции в десятки и сотни раз.

Локализация энхансеров не является однозначной. Они могут располагаться за пределами гена как с 5′-, так и с 3′-конца, а также обнаруживаются в составе интронов. Так, у гена альбумина энхансер находится перед промотором, у генов иммуноглобулинов — в интронах самого гена, а у гена плацентарного лактогена человека — на 3′-фланге гена.

Характерным свойством энхансера являются способность осуществлять регуляторное действие на промотор на больших расстояниях от него (более 60 т.п.н.).

Еще одной важной характеристикой энхансера является его способность активировать любой промотор, расположенный сравнительно недалеко. Эффект регуляции достигается тем же путем, что и регуляция проксимальными элементами промоторов — путем сборки на последовательностях энхансера белкового комплекса и его взаимодействия с основным транскрипционным комплексом посредством белок-белковых взаимодействий.

Контрольные области генов часто содержат множественные автономные энхансерные модули. Каждый из этих модулей предназначен для выполнения определенных функций. Он может активировать ген на определенной стадии развития или в определенном типе клеток. Отдельный ген может таким образом содержать множество энхансерных модулей, каждый из которых вносит свой вклад в пространственную и временную регуляцию экспрессии гена. Часто энхансеры содержат те же модули, что и проксимальные элементы промотора.

Таким образом, энхансер — это генетический цис-элемент, обладающий усиливающим транскрипцию действием, которое практически не зависит от расположения элемента относительно контролируемого им гена. По ряду причин энхансер не всегда можно рассматривать как дистальный регуляторный элемент конкретного гена, а скорее, как самостоятельную регуляторную единицу, контролирующую группу близлежащих генов.

Район действия энхансера ограничивают специальные пограничные элементы, которые назвали **инсуляторами**, или изоляторами. Инсуляторами называются регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором, если находятся между ними. Внедряясь между энхансером и промотором, инсулятор блокирует способность энхансера активировать транскрипцию с данного промотора. Этот элемент действует как нейтральный, т.е. не участвующий в активации или репрессии транскрипции, элемент, предотвращающий распространение как позитивной, так и негативной информации от энхансера. Инсуляторы не влияют непосредственно на активность энхансера и промотора, т.е. промотор может быть активирован любым другим энхансером, а энхансер может активировать любой другой промотор.

СИНТЕЗ РНК

РНК представляет собой одинарную полинуклеотидную цепь, состоящую из четырех типов нуклеотидов, которые включают в качестве азотистых оснований аденин, уридин, гуанин, цитозин (рис. 27). В отличие от ДНК, РНК содержит уридин вместо тимина, а в состав мономеров входит рибоза вместо дезоксирибозы. Все молекулы РНК синтезируются на ДНК-матрице — этот процесс называется **транскрипцией**. Многие РНК синтезируются в виде предшественников, а затем подвергаются процессингу (созреванию). Существует несколько типов РНК, которые различаются между собой, главным образом, по функциональному значению, а также по размеру и первичной структуре. Для клеточных организмов можно выделить 6 типов РНК.

1. **Матричные (**мРНК**)** или информационные (иРНК) — служат матрицей для синтеза белка.
2. **Рибосомные (**рРНК**)** — входят в состав субъединиц рибосом и определяют их свойства.
3. **Транспортные (**тРНК**)** — связывают аминокислоты и участвуют в синтезе белка.
4. **Малые некодирующие РНК (**≈40–200 н.**)**: малые ядерные (мяРНК), малые ядрышковые (мякРНК) и малые цитоплазматические (мцРНК) — входят в состав рибонуклеопротеиновых комплексов. Основная функция ядерных и ядрышковых — участие в процессинге разных видов РНК. Малые цитоплазматические выполняют регуляторную роль.
5. **Структурные — большие некодирующие РНК.** Участвуют в поддержании структуры гетерохроматина. Большинство из них являются транскриптами сателлитиной ДНК (sat-транскрипты). К этому же типу можно отнести РНК, кодируемые генами *Xist* и *Tsix*, локализованными в Х-инактивационном центре Х-хромосомы.
6. Малые интерферирующие или **микроРНК (**miРНК **и** siРНК**,** а также их аналоги piРНК, tasiРНК и др.) участвуют

в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции генов. Имеют очень низкую молекулярную массу — большинство видов состоят из 20–22 н., piРНК около 30 н.

У РНК-содержащих вирусов РНК, подобно ДНК, является местом хранения генетической информации. Вирусные РНК могут составить еще один (седьмой) тип.

Синтез РНК у прокариот и эукариот в общих чертах сходен, но существуют и достаточно характерные отличия. Так, у прокариот синтез всех видов РНК осуществляется одной РНК-полимеразой, тогда как эукариоты содержат три различных фермента. РНК-полимераза I **участвует в синтезе 45S-транскрипта,** предшественника рибосомных РНК (18S, 5,8S и 28S); РНК-полимераза II синтезирует матричные РНК и sat-**транскрипты; РНК-полимераза** III — транспортные, рибосомную 5S, малые и микроРНК. Кроме того, малые и микроРНК могут синтезироваться и РНК-полимеразой II, так как они часто кодируются в интронах и 3′-нетранслируемых областях белок-кодирующих генов.

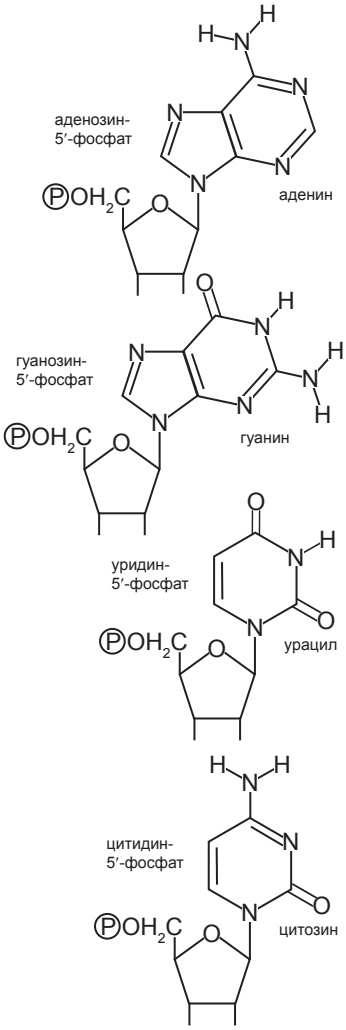


Рис. 27. Нуклеотиды, входящие в состав РНК

СИНТЕЗ РНК В *E. COLI*

Синтез РНК происходит в три этапа: инициация, элонгация и терминация. Все они осуществляются с участием РНК-полимераз. Фермент, который обеспечивает только лишь полимеризацию РНК, не может быть достаточным для инициации и терминации

синтеза. Инициация и терминация — это процессы, требующие дополнительной активности. Поэтому компоненты РНК-полимеразы, обладающие полимеразной активностью, являются частью более сложного комплекса, участвующего в транскрипции.

Инициация транскрипции

РНК-полимераза бактерий осуществляет синтез абсолютно всех видов РНК. В клетках *E. coli* присутствует около 7000 молекул РНК-полимеразы, причем одновременно в реакциях полимеризации участвуют от 2000 до 5000 молекул в зависимости от функциональной активности клетки. Фермент, который способен только осуществлять полимеризацию, называют минимальным (или **кор-ферментом**). Он состоит из четырех полипептидов — 2 α, β и β'. Для инициации транскрипции необходим σ-фактор, который участвует в распознавании промотора. Структуру, состоящую из пяти субъединиц (2 α, β, β' и σ), называют **полным ферментом (холоферментом)**. Холофермент имеет молекулярную массу 480 кД и состоит из кор-фермента, который катализирует реакции полимеризации, и σ-частицы, участвующей в инициации транскрипции. Графически структуру холофермента принято записывать в таком виде: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Для узнавания промоторов большинства генов используется основной σ^{70}-фактор, контролирующий гомеостатические функции (в нормальных условиях). Бактериальные клетки синтезируют также множество альтернативных σ-факторов, которые активируют от нескольких до сотен специфических генов в стрессовых условиях или в ходе жизненного цикла.

Бактериальная РНК-полимераза взаимодействует с ДНК за счет электростатических сил, причем минимальный фермент связывается с ДНК практически в любой точке. Случайная последовательность, с которой связывается РНК-полимераза, называется **слабым участком связывания**. В таких участках двойная цепь ДНК не раскрывается и комплекс ДНК–фермент остается закрытым (рис. 28). Полупериод диссоциации этого комплекса составляет около 60 минут, константа связывания — $2 \cdot 10^{-11}$ М.

Присоединяя σ-фактор и формируя холофермент, РНК-полимераза принципиально изменяет характер взаимодействия с ДНК. Сродство к слабым участкам связывания (к случайным последовательностям ДНК) резко снижается — примерно в 10^4 раз. Константа связывания достигает $2 \cdot 10^{-7}$ М, а полупериод существо-

вания комплекса не превышает одной секунды. Однако при этом холофермент, благодаря σ-фактору, приобретает способность узнавать специфические участки связывания. Причем прочность образованной связи между холоферментом и специфическим участком промотора во много раз превышает прочность связи кор-фермента со слабым участком связывания. Константа ассоциации составляет примерно 10^{-14} М, а полупериод жизни — несколько часов. Прочность образованного **закрытого двойного комплекса** зависит от конкретного промотора и может варьировать в значительных пределах ($\pm 10^2$).

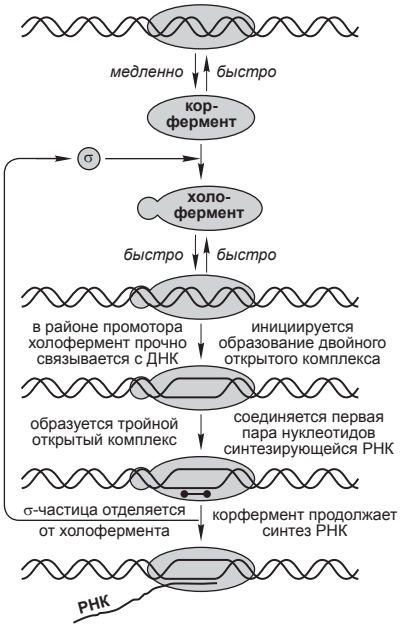


Рис. 28. Инициация транскрипции у прокариот

Минимальный фермент не может эффективно находить промотор, так как прочность его связывания с любым участком ДНК довольно высокая. Холофермент может часто менять случайные места связывания, и это позволяет ему быстро находить промотор. Кроме σ-факторов в инициации транскрипции принимают участие различные коактиваторные белки, которые взаимодействуют с определенными регуляторными участками матрицы и субъединицами холофермента. К таким активаторам можно отнести белки, активирующие катаболитные гены или БАК (см. также раздел «Контроль экспрессии лактозного оперона *E. coli*. Позитивная индуцибельная регуляция»). БАК и другие активаторы обеспечивают дополнительные сайты связывания РНК-полимеразы в области промотора гена, облегчая процесс инициации транскрипции.

После формирования закрытого двойного комплекса с участием холофермента σ-фактор контактирует с ДНК в области начального плавления. На небольшом участке в пределах комплекса происходит плавление ДНК. Раскрывается участок протяженностью 12–17 пар нуклеотидов. Так, закрытый двойной комплекс преобразуется в **открытый двойной комплекс.** Через

непродолжительное время (около 0,2 с) происходит включение двух первых нуклеотидов с образованием фосфодиэфирной связи между ними, а несколько позже — отщепление σ-частицы. Синтез большинства РНК, как правило, начинается с пуринового основания — аденина или гуанина. Инициация транскрипции заканчивается образованием **открытого тройного комплекса**, в который входят минимальный фермент, ДНК и синтезирующаяся РНК. Высокое сродство минимального фермента к ДНК в присутствии новосинтезированной РНК еще увеличивается.

Участок матрицы, контактирующий с РНК-полимеразой, составляет около 60 пар нуклеотидов, из которых 12–17 находятся в одноцепочечном состоянии. В процессе синтеза РНК двойная цепь ДНК со стороны, где происходит включение нуклеотидов в растущую цепь РНК, расплетается, открывая новые неспаренные нуклеотиды матрицы, а с другой стороны, по мере движения полимеразы, ДНК восстанавливает двойную спираль. Часть новосинтезированной молекулы РНК (около 12 последних включенных в цепь нуклеотидов) находится в состоянии гибрида ДНК–РНК, остальная часть вытесняется и находится в свободном состоянии.

Синтез РНК, как и синтез ДНК, осуществляется в направлении 5′→3′. Субстратами и источниками энергии выступают нуклеозидтрифосфаты. Для инициации синтеза нет необходимости в наличии затравки.

Типы и структура терминаторов

Завершается синтез РНК, когда РНК-полимераза достигает особой структуры — терминатора. В результате терминации завершается включение новых нуклеотидов в цепь РНК и диссоциирует гибрид ДНК–РНК. В бактериальных клетках найден белковый фактор терминации. Он получил название **ρ-белок** (или **ρ-фактор**, 55 кД). Однако не все терминаторы функционируют в присутствии ρ-фактора. По этому признаку в бактериальных генах различают ρ-зависимые и ρ-независимые терминаторы (рис. 29).

Изучение последовательностей терминаторов разных типов показывает, что для всех характерно наличие инвертированных повторов (палиндромов) в 3′-концевой области. Однако палиндромы терминаторов не имеют каких бы то ни было консервативных последовательностей. Единственная гомология была обнаружена

в ρ-независимых терминаторах — после палиндрома у них всегда имеется небольшой отрезок, состоящий из нескольких аденозинов, количеством не менее четырех. Инвертированный повтор находится перед реальной точкой терминации и поэтому транскрибируется. На 3′-конце синтезированной РНК, то есть в области, соответствующей инвертированным повторам терминатора, образуется типичная вторичная структура в виде шпильки. В случае ρ-независимых терминаторов на 3′-конце РНК после шпильки имеется небольшой отрезок из остатков уридинфосфатов, состоящий, как минимум, из 4 нуклеотидов. Аналогичное строение вторичной структуры 3′-конца РНК и отсутствие гомологии у ρ-независимых терминаторов наводят на мысль, что **для процессов терминации определяющим является не первичная структура терминатора, а вторичная структура, которую принимает 3′-конец вновь синтезированной РНК.**

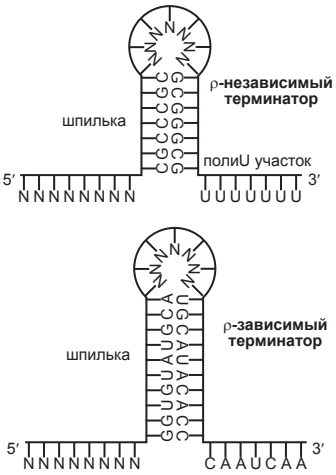


Рис. 29. Структура РНК в области терминатора

Механизмы терминации

Для прекращения транскрипции генов, имеющих ρ-зависимые терминаторы, необходима каталитическая активность ρ-белка. Фактор терминации ρ приобретает активную форму в тетрамерной форме. Активность ρ-белок начинает проявлять при наличии свободного 5′-конца синтезирующегося полирибонуклеотида длиной не менее 50 нуклеотидов. Фактор ρ взаимодействует с 5′-концом синтезирующейся РНК и затем продвигается по ней, используя энергию гидролиза фосфатных связей нуклеозидтрифосфатов. Фактор ρ двигается в одном направлении с РНК-полимеразой и догоняет ее только в случае вынужденной задержки полимеразы. Шпильки, которые образуются на 3′-концах синтезирующихся РНК, заставляют РНК-полимеразы двигаться медленнее или даже останавливаться. На обычном терминаторе полимераза останавливается примерно на 60 с. Этого времени

достаточно, чтобы ρ-фактор догнал РНК-полимеразу и стимулировал завершение транскрипции.

На ρ-независимых терминаторах РНК-полимераза после синтеза палиндромной и полиуридиновых областей высвобождает РНК и отделяется от матрицы без дополнительных вспомогательных факторов. Это является следствием того, что ДНК–РНК гибрид **dA–rU характеризуется слабыми комплементарными взаимодействиями** и легко разрушается. Задержка РНК-полимеразы в области шпильки в ρ-независимом терминаторе благоприятствует высвобождению РНК из комплекса **dA–rU.**

Полиуридиновая область РНК соответствует A=T обогащенной области ДНК. Следует обратить внимание, что для терминации, как и для инициации, важное значение имеют участки, в которых легче осуществляются процессы плавления ДНК.

Синтезированные мРНК у бактерий, как правило, не подвергаются процессингу и могут использоваться в качестве матриц для синтеза полипептидов еще до завершения синтеза самой РНК. Одновременное протекание процессов транскрипции и трансляции характерно для прокариот, и это свойство может использоваться для регуляции экспрессии генов (см. в разделе «Контроль экспрессии триптофанового оперона *E. coli*» — «Аттенуация»).

ТРАНСКРИПЦИЯ БЕЛОК-КОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ У ЭУКАРИОТ

Синтез РНК у эукариот организован, в целом, сложнее, чем у прокариот. Усложнение заключается, прежде всего, в том, что в синтезе РНК участвуют три вида РНК-полимераз, которые транскрибируют определенные типы генов. Во-вторых, все этапы транскрипции протекают с участием многокомпонентных белковых комплексов. В-третьих, матричные РНК подвергаются сложному процессингу, в ходе которого вырезаются интроны, а 3′- и 5′-концы молекулы модифицируются. Процессинг рибосомных и транспортных РНК имеет примерно одинаковый уровень сложности у эукариот и прокариот. И наконец, эукариоты синтезируют целый спектр низкомолекулярных РНК (малых и микроРНК), которые выполняют разнообразные функции в клетке.

Компоненты преинициаторного комплекса

Инициация транскрипции белок-кодирующих генов в эукариотических клетках происходит в результате сборки преинициаторного комплекса в области промотора. Преинициаторный комплекс состоит из нескольких групп компонентов:

1) собственно РНК-полимеразы;
2) общих факторов транскрипции (GTFs — *general transcription factors*: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF и TFIIH);
3) специфических транскрипционных активаторов;
4) факторов, опосредующих взаимодействие между компонентами преинициаторного комплекса.

Совокупность факторов последней группы называют также **Mediator**-комплексом или опосредующим комплексом. Мультибелковый Mediator-комплекс включает до 20 субъединиц. Он не имеет специфичности к определенным генам, но и не является универсальным подобно общим факторам транскрипции. Предполагается, что в разных типах клеток качественный и количественный состав субъединиц комплекса различается.

Для инициации транскрипции с промотора класса II in vitro достаточно наличия основных компонентов преинициаторного комплекса — общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II. Уровень транскрипции, обеспечиваемый этими белками, называют базальным. Базальный уровень транскрипции обычно очень низкий. Это объясняется, во-первых, невысокой стабильностью минимального преинициаторного комплекса, а во-вторых, in vivo этот эффект определяется также наличием негативных регуляторов инициации транскрипции и особенностями структуры хроматина. Такие препятствия преодолеваются с помощью активаторов транскрипции, взаимодействующих как с ДНК в районе промотора, так и с базальными факторами, входящими в состав преинициаторного комплекса.

Транскрипционные активаторы можно разделить на два основных типа.

Первый — это ДНК связывающие регуляторы. Они связываются с проксимальными или дистальными элементами промотора, а также с компонентами преинициаторного комплекса.

Регуляторы второго типа не связывают ДНК и взаимодействуют непосредственно с компонентами преинициаторного комплекса. Большинство из этих активаторов взаимодействуют с TBP, входящим в состав TFIID. Их называют **факторы, ассоциирован-**

ные с TBP (TAF's). Остальные активаторы (не взаимодействующие с TBP) называют **non-TAF коактиваторами.**

Специфические активаторы и опосредующие факторы обеспечивают дополнительные участки связывания компонентов преинициаторного комплекса с промотором и друг с другом. В результате повышается стабильность комплекса и усиливается его связь с промоторной частью гена. Следует также учесть, что многие факторы являются антагонистами репрессоров транскрипции, поскольку конкурируют с ними за одни те же участки связывания ДНК и белков. В последнее время показана еще одна важная роль дополнительных факторов транскрипции. Некоторые из них обладают гистон-модифицирующей активностью. Деметилирование и ацетиливание специфических аминокислотных остатков гистонов обеспечивает ремоделирование определенных участков хроматина, что приводит к стимуляции сборки преинициаторного комплекса (см. далее разделы «Ремоделирование хроматина» и «Роль модификации гистонов в инициации транскрипции»).

Инициация транскрипции белок-кодирующих генов

Инициация транскрипции с промоторов класса II регулируется на уровне сборки мультибелкового преинициаторного комплекса в районе промотора. В зоне корового элемента промотора последовательно собираются общие факторы транскрипции (инициаторные факторы), называемые TFII (Transcription Factors of RNA polymerase II). Из них только TFIID непосредственно взаимодействует с промоторной областью ДНК. Остальные факторы удерживаются в составе преинициаторного комплекса посредством белок-белковых взаимодействий.

Начальным этапом инициации транскрипции является специфическое связывание TFIID с ДНК. В основе этого события лежит специфическое взаимодействие TATA-связывающего компонента TFIID — TBP (TATA Binding Protein или TATA-связывающий белок) с ДНК в области TATA-блока.

TATA-связывающий белок представляет собой внутримолекулярный димер, каждый мономер которого построен из пяти антипараллельных β-тяжей и двух α-спиралей. По форме TBP напоминает седло, вогнутая часть которого сформирована восемью антипараллельными β-тяжами и отвечает за взаимодействие с малой бороздкой ДНК. От «седла» по обеим сторонам

ДНК спускаются две белковые петли, напоминая стремена. Выпуклая часть седла сформирована четырьмя α-спиралями, линкерным участком и неконсервативным N-концевым участком. Эта часть отвечает за белок-белковые взаимодействия, осуществляемые в рамках TFIID и преинициаторного комплекса.

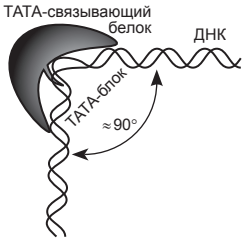


Рис. 30. Взаимное расположение ТАТА-связывающего компонента TFIID и ДНК в момент взаимодействия

После вхождения TBP в малую бороздку ДНК и узнавания ТАТА-бокса происходит сиквенс-специфическое формирование водородных связей между молекулой белка и соответствующим участком ДНК. В результате взаимодействия TBP с промотором происходит изгиб ДНК примерно на 90 градусов (рис. 30). Такая деформация облегчает локальное плавление ДНК (расхождение двух цепей) в районе ТАТА-блока. Во-вторых, это событие стимулирует сборку преинициаторного комплекса (сборка вокруг изгиба обеспечивает лучшую компактизацию комплекса), помогает приблизить к преинициаторному комплексу удалённо связанные транскрипционные факторы, а также позиционирует ДНК таким образом, что с ней могут связываться новые факторы базальной транскрипции.

Дальнейшая сборка преинициаторного комплекса происходит в следующем порядке (рис. 31). С TBP-TATA комплексом связывается инициаторный фактор TFIIB, который привлекает к промотору преформированный комплекс РНК-полимеразы II с фактором TFIIF. С TFIIF связывается инициаторный фактор TFIIE, а с ним — фактор TFIIH. На этом формирование преинициаторного комплекса заканчивается.

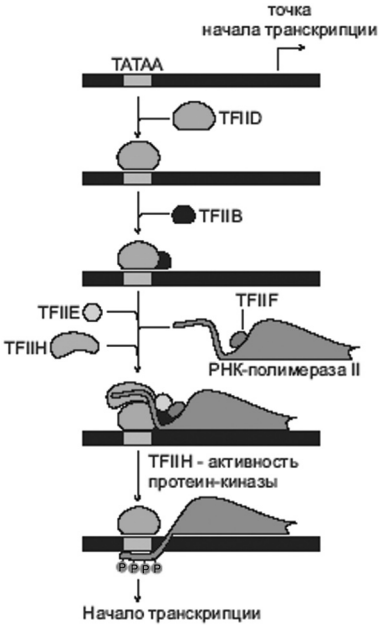


Рис. 31. Инициация транскрипции белок-кодирующих генов у эукариот — последовательность сборки минимального преинициаторного комплекса (по Alberts et al., 1994)

Фактор TFIIH обладает киназной активностью, которая стимулируется после вовлечения TFIIH в преинициаторный комплекс. TFIIH фосфорилирует С-концевой домен большой субъединицы РНК полимеразы II. Одновременно с этим событием хеликаза АТФ-зависимо расплетает двойную спираль ДНК в районе старта транскрипции. Таким образом, формируется «открытый» комплекс.

После этого РНК-полимераза начинает синтез РНК и покидает промотор. Преинициаторный комплекс, выполнивший свои функции, распадается на компоненты. С коровым элементом промотора в течение некоторого времени после инициации транскрипции остаётся связанным фактор TFIID, который может принять участие в новом раунде инициации.

Полимеризация пре-мРНК

РНК-полимеразы эукариот представляют собой сложные полисубъединичные комплексы. Все РНК-полимеразы (I–III) имеют некоторую гомологию с бактериальными ферментами. По степени гомологичности субъединицы можно разделить на три группы.

1) Две самые большие субъединицы каждого из ферментов, структурно и функционально гомологичные, субъединицам β и β′ РНК-полимеразы *E. coli*. Данные субъединицы и их гомологи представлены во всех трех эволюционных доменах — Bacteria, Archaea и Eucarya.
2) Вторую группу составляют две субъединицы, аналогичные бактериальной субъединице α (в РНК-полимеразы II — Rpb3 и Rpb11, а в РНК-полимеразах I и III гомологичные им по структуре субъединицы Rpc40 и Rpc 19). Сходство между прокариотическими и эукариотическими субъединицами ограничено в рамках так называемого α-мотива. Функциональная роль гетеродимеров Rpc40-Rpc19 и Rpb3-Rpbl1 сходна с ролью гомодимера α_2 в бактериальном ферменте.
3) К третьей группе относят остальные субъединицы, которые называют малыми. Среди малых субъединиц пять (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 и Rpc10) являются общими для трех РНК-полимераз. Кроме этого, каждая РНК-полимераза содержит специфичные субъединицы. Малые субъединицы эукариотических РНК-полимераз не имеют гомологов в РНК-полимеразах бактерий, но для большинства из них есть гомологи в соста-

ве РНК-полимераз архей, причем структурная консервативность, по крайней мере, для субъединицы Rpb10, дополняется и функциональным родством.

РНК-полимераза II имеет 12 субъединиц. Дополнительные субъединицы эукариотических ферментов, по-видимому, необходимы для сложной сети белок-белковых взаимодействий с факторами транскрипции. Вариации по индивидуальным белкам каждого из трех типов ферментов могут быть связаны с их специфичностью по отношению к разным факторам транскрипции и, соответственно, разным группам генов. Две наибольшие субъединицы РНК-полимеразы II **формируют активный центр** ферментативного комплекса. Активный центр располагается на поверхности фермента. На нем удерживается локально разделенная двойная цепь ДНК, одна из нитей которой выступает матрицей для синтеза РНК. Субъединицы РНК-полимеразы II формируют пору, которая пронизывает фермент от активного центра до противоположной стороны. Через эту пору в активный центр поступают соответствующие нуклеотидтрифосфаты, необходимые для синтеза РНК. В процессе реакции полимеризации происходит отщепление пирофосфатов, а нуклеотиды (нуклеотидмонофосфаты) присоединяются к 5′-концу синтезирующейся молекулы. Одиночная цепь ДНК-матрицы и комплементарно соответствующий ей вновь синтезированный участок молекулы РНК существуют некоторое время в виде гетеродуплекса ДНК–РНК. По мере синтеза РНК 3′-конец этой молекулы отделяется от матрицы, а затем восстанавливается двойная спираль ДНК. Синтезированная часть молекулы РНК покидает фермент через выходную бороздку, расположенную на поверхности молекулы фермента.

Терминация транскрипции пре-мРНК

Терминация транскрипции у эукариот происходит за пределами собственно гена в области спейсера. Нуклеотидные последовательности зон терминации, прилежащих к разным генам, содержат ряд гомологичных областей, однако природа сигналов терминации еще недостаточно изучена. У эукариот обнаружены факторы терминации транскрипции, необходимые для освобождения РНК-полимераз из транскрипционных комплексов на терминаторах. Функционирование факторов терминации сопровождается, как правило, расщеплением АТР.

Факторы терминации связываются с ДНК в зоне терминации транскрипции, обеспечивая остановку элонгирующих РНК-полимераз и последующее освобождение РНК из транскрипционных комплексов. Это в значительной степени упрощенная схема терминации транскрипции, поскольку факторы терминации тесно взаимодействуют с различными функциональными белками и ферментами, участвующими в синтезе и процессинге РНК. Например, терминация синтеза пре-мРНК РНК-полимеразой II осуществляется в присутствии сложного белкового комплекса, в который помимо основного фактора терминации входят белки, обеспечивающие процессинг 3′-концевых последовательностей. Этим можно объяснить тот факт, что для осуществления корректной терминации синтеза большинства предшественников мРНК необходимо наличие сайта полиаденилирования. Удаление сайта полиаденилирования приводит к нарушению терминации — транскрипция не прекращается в зоне терминации, а продолжается дальше.

После терминации транскрипции специфическая фосфатаза дефосфорилирует большую субъединицу полимеразы, восстанавливая способность полимеразы инициировать транскрипцию.

ПРОЦЕССИНГ РНК

Практически все вновь синтезированные РНК являются предшественниками функционально активных РНК и требуют соответствующей ферментативной доработки. Исключение составляют матричные РНК бактерий, которые используются для синтеза белка еще до окончания транскрипции. Отсутствие процессинга бактериальной мРНК, по всей видимости, является причиной ее относительной нестабильности. Процессинг РНК приводит не только к возможности выполнения ими специфических функций, но и к повышению стабильности видоизмененных молекул РНК. Изменение РНК путем модификации нуклеотидов и/или их включение в рибонуклеопротеиновые частицы делает РНК менее узнаваемыми и доступными для неспецифических рибонуклеаз.

Созревание РНК, в ходе которого из про-РНК образуются активные РНК, называют **процессингом**. Процессинг включает в себя:

— разрезание предшественника;
— тримминг фрагментов (удаление концевых нуклеотидов);
— модификация нуклеотидов;
— добавление, удаление или замена нуклеотидов (РНК-редактирование);
— вырезание интронов (сплайсинг).

Осуществляя специфические реакции, ферменты, участвующие в процессинге, ориентируются не только по нуклеотидным последовательностям РНК, но также по ее третичной структуре и по связанным с ней молекулам. Предшественник РНК в свободном виде, как правило, не подвергается процессингу, так как не узнается соответствующими ферментами. Если свободная РНК будет связана модифицирующим ферментом, то катализируемые им реакции будут обладать низким уровнем специфичности. Решающее значение для реакций процессинга имеют малые РНК и структурные белки, которые вместе с транскриптом-предшественником формируют рибонуклеопротеиновые (РНП) частицы.

Ферменты, осуществляющие последовательные процессы синтеза РНК и их созревания, входят в состав сложных РНП, которые взаимодействуют друг с другом. Так, ферменты, осуществляющие кэпирование, сплайсинг и полиаденилирование, связаны с РНК-полимеразным комплексом. Это позволяет процессирующую активность специфически направлять на транскрипты, синтезируемые РНК-полимеразой II. Каждая модификация созревающей РНК, как правило, важна для последующих изменений. Например, наличие кэпа необходимо для вырезания интронов, полиаденилирования 3′-конца предшественника, а также для транспорта зрелой мРНК из ядра в цитоплазму и последующей трансляции.

ПРОЦЕССИНГ мРНК ЭУКАРИОТ

В ядре эукариотических клеток образуется большое количество предшественников мРНК, которые отличаются от самих матричных РНК нередко существенно бóльшим размером. Размеры предшественников варьируют в значительных пределах, поэтому они получили название **гетерогенной ядерной РНК** (гяРНК). Большая часть гяРНК не выходит за пределы ядра и полностью в нем разрушается. Если первичные транскрипты могут содержать 50000 нуклеотидов и более, то средний размер зрелых мРНК не превышает, как правило, 1500.

Процессинг гяРНК происходит последовательно по мере синтеза предшественника. Модификация 5′-конца (кэпирование) протекает после того, как синтезирующаяся РНК достигает длины около 25 нуклеотидов. Затем вырезаются интроны. После синтеза участка транскрипта, содержащего сигналы полиаденилирования, происходит специфическое разрезание РНК и добавление полиаденозинового фрагмента на образовавшийся свободный 3′-конец путем последовательного присоединения остатков адениловой кислоты.

Кэпирование

Модификация 5′-конца синтезирующейся РНК называется **кэпированием**. Ферменты, осуществляющие кэпирование, связываются с фосфорилированным С-концевым доменом РНК полимеразы II в процессе формирования преинициаторного комплекса.

Первый нуклеотид, который включается в РНК при транскрипции, имеет пуриновую природу. Чаще это аденозин, но может быть и гуанозин. Первый пуриновый нуклеотид на 5′-конце транскрипта имеет три фосфорные группы. После появления свободного одноцепочечного фрагмента (примерно 25 нуклеотидов) от 5′-трифосфатной группы специфической фосфатазой отщепляется γ-фосфат (рис. 32). Затем гуанилилтрансфераза переносит остаток GMP от GTP на β-фосфат первого нуклеотида синтезирующегося транскрипта. Предварительно фермент присоединяет GMP через α-фосфорную группу, отщепляя пирофосфат (PP_i). В результате 5′-концевой гуанозин и пурин будут связаны трифосфатной связью 5′–5′. После присоединения гуанилатного остатка происходит метилирование концевого гуанозина по N7 соответствующей N-метил-трансферазой с образованием 7-метилгуанозина (me^7G).

В состав 5′-концевых нуклеотидов могут быть введены другие метильные группы (рис. 33). Например, возможно метилирование остатков рибозы в положении 2′-О следующих за me^7G двух нуклеотидов. Перенос метильной группы осуществляется 2′-О-метил-трансферазой. Для того, чтобы различать степень метилирования 5′-конца мРНК, разные типы кэпов обозначаются с индексами 0, 1 или 2. Кэп с одной метильной группой (в me^7G) называют **кэп 0**, с двумя — **кэп 1**, с тремя — **кэп 2**. Кэп 0 характерен для низших одноклеточных эукариот. Большинство высших эукариот содержат кэп 1. У некоторых высших эука-

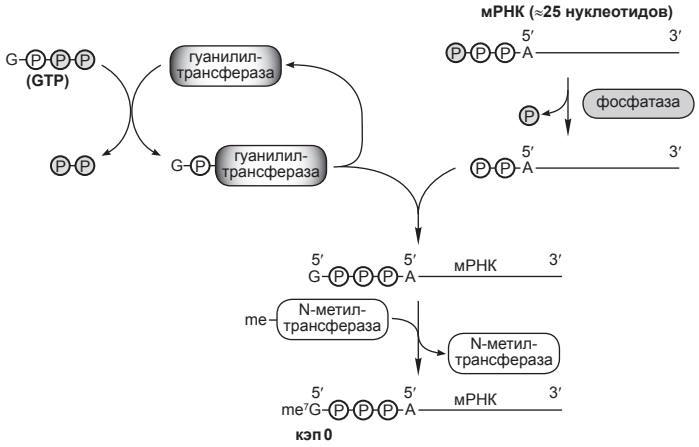


Рис. 32. Механизм кэпирования про-мРНК

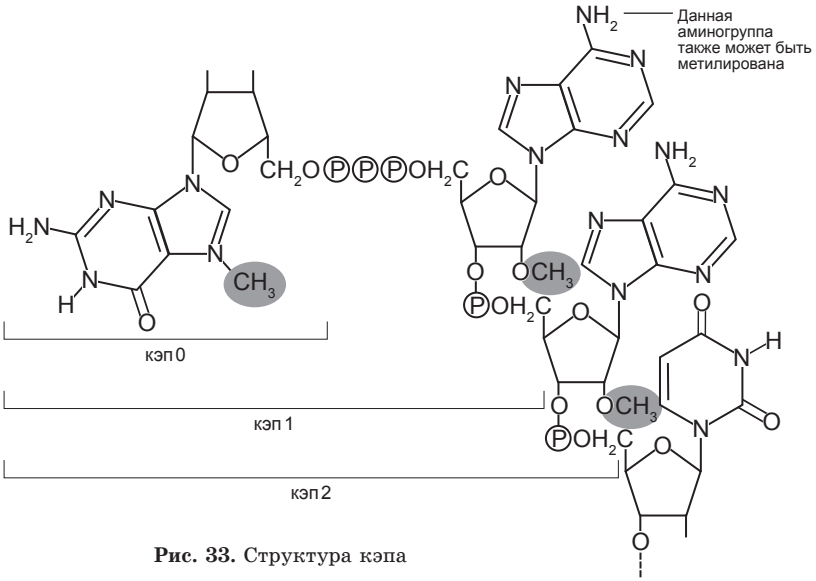


Рис. 33. Структура кэпа

риот 10–15 % фракции мРНК имеют кэп 2. В редких случаях во втором основании добавляется еще одна метильная группа. Она присоединяется к аминогруппе первого аденозина. Одним из условий метилирования является наличие у этого нуклеотида метила в положении 2′-О. Катализирует перенос фермент 2′-О-метиладенозин-N^6-метил-трансфераза. Считается, что кэпированный 5′-конец обеспечивает взаимодействие мРНК с рибосомами, способствуя формированию полирибосомных структур.

У других видов РНК также модифицируется 5′-конец молекулы. Но для них характерна другая структура кэпа. Например, у зрелых малых ядерышковых РНК к 5′-концу также присоединен гуанозин посредством 5′–5′-трифосфатной связи. Но в отличие от мРНК кэп мякРНК трижды метилирован: один раз по N7 и дважды по N2. Предполагается, что кэп такого вида необходим для предотвращения вовлечения мяРНК в трансляцию, а также для транспорта собранных мяРНП-частиц в ядро.

После кэпирования предшественника мРНК к его 5′-концу присоединяется кэп-связывающий комплекс, состоящий из двух специфических белков. Наличие кэпа необходимо для стимуляции последующих механизмов процессинга, транспорта зрелой мРНК в цитоплазму, трансляции, а также для защиты мРНК от деградации.

Сплайсинг

Сплайсингом называется механизм, в процессе которого интроны вырезаются из про-мРНК. Маркерами для ферментов сплайсинга служат границы интронов. Левый 5′-конец интрона называют донорным участком (D), а 3′-конец — акцепторным (A). В различных генах границы интронов имеют сходные первичные структуры, которые можно обобщить в виде канонической (среднестатистической) последовательности.

Экзон ↓ Интрон ↓ Экзон

$$5' \ldots A_{64}G_{73}G_{100}T_{100}A_{62}A_{68}G_{84}T_{63} \ldots 6Py_{74-87}NC_{65}A_{100}G_{100}N \ldots 3'$$

Наиболее консервативными являются пары нуклеотидов, находящиеся на 5′- и 3′-концах интронов: 5′ **GT...AG** 3′. Универсальность последовательности границ интронов позволяет унифицировать процессы сплайсинга.

Значительная часть прерывистых генов эукариот имеет несколько интронов. Их донорные и акцепторные участки можно обозначить с индексом, который соответствует номеру интрона, начиная с 5′-конца РНК: D_1, A_1; D_2, A_2; D_3, A_3; ...; D_n, A_n. В процессе сплайсинга интрон образует петлю, благодаря сближению донорного и акцепторного участков. Затем интронная последовательность вырезается, а границы двух соседних экзонов сшиваются. Теоретически любая пара донорных и акцепторных участков интронов могут сблизиться и образовать петлю, в которую будут входить и интроны, и экзоны. Поэтому донорные и акцепторные участки одного интрона должны соответствовать друг другу (D_1–A_1, D_2–A_2, D_3–A_3 и т. д.), чтобы не произошло вырезания не только интрона, но и экзона.

Сплайсинг — процесс удаления интронов из молекулы предшественника мРНК и объединения экзонов, в результате которого образуется зрелая мРНК. У некоторых организмов есть интронсодержащие гены, кодирующие транспортные и рибосомальные РНК, предшественники которых также подвергаются сплайсингу.

Правильность вырезания интронов контролируется на уровне рибонуклеопротеиновой частицы. Свободная гяРНК не является мишенью для ферментов сплайсинга. Удаление интронов осуществляется только из гяРНК, входящей в состав рибонуклеопротеиновой частицы. По ходу транскрипции образующаяся

РНК взаимодействует со специфическими ядерными белками и мяРНК. Малые ядерные РНК имеют односпиральные участки, комплементарные границам интронов. Связывание мяРНК с D- и А-участками интронов происходит последовательно в каждом интроне по мере их появления. В результате гяРНК приобретает особую трехмерную структуру в составе РНП частицы, благодаря которой соответствующие границы интронов сближаются друг с другом. Рибонуклеопротеиновую частицу, участвующую в сплайсинге, называют **сплайсосомой**.

Сплайсинг осуществляется в две стадии. Каждая стадия сопровождается расщеплением транскрипта по границе экзон-интрон. Первое расщепление происходит по левой границе интрона (рис. 34). В результате левый экзон будет иметь линейную форму, а правая часть молекулы (правый экзон и интрон) приобретает форму петли. Петля поддерживается за счет ковалентной связи, которая образуется между 5′-концевым фосфатом интрона с 2′-атомом рибозы аденина, который входит в состав особой консервативной последовательности интрона. Эта последовательность имеет вид **CTGAC и находится на расстоянии примерно** в 30 нуклеотидов от правой границы интрона. Данный участок называют сайтом ветвления. Второе расщепление, по правой границе интрона, сопряжено с переносом свободного 3′-конца левого экзона на 5′-конечный фосфат правого экзона. Вырезанный интрон со временем приобретает линейную форму и расщепляется нуклеазами или подвергается дальнейшему процессингу, если содержит гены малых РНК. Образование фосфодиэфирной связи при формировании интронной петли, вероятно, связано с тем, чтобы изолировать 5′-концевой фосфат интрона. Это необходимо для повышения эффективности сплайсинга.

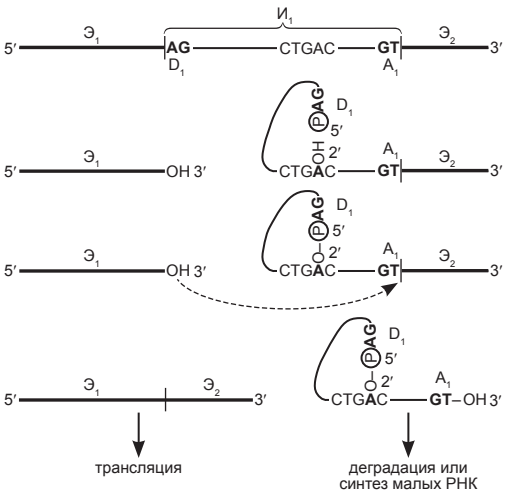


Рис. 34. Механизм сплайсинга про-мРНК. $Э_1$, $Э_2$ — экзоны, $И_1$ — интрон

Значение сплайсосомы в механизме сплайсинга

В процессе сплайсинга сплайсосома значительно изменяет свою структуру. Эти структуры называют комплексами с определенными индексами. Каждый из этих комплексов характеризуется определенным набором функциональных молекул (белков и РНП) и, соответственно, активностью.

Сборка сплайсосомы инициируется в результате связывания U1 мяРНП с синтезирующимся транскриптом (рис. 35). U1 мяРНП узнает и связывается с 5′-границей сплайсинга (и возможно 3′-границей). Консенсусные последовательности, обозначающие границы интронов у высших эукариот, низкоинформативны, поэтому для корректного узнавания сайтов сплайсинга

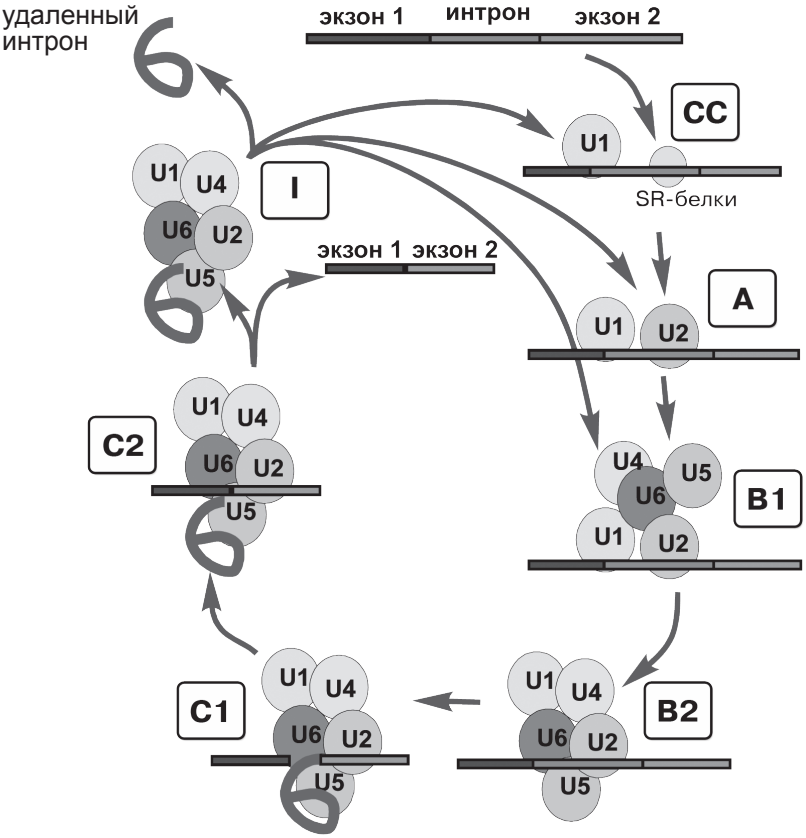


Рис. 35. Цикл работы сплайсосомы (упрощенная схема)

используются множественные сайты узнавания. Важными участками связывания транскрипта с функциональными белками является сайт ветвления и полипиримидиновая последовательность, предшествующая 3′-границе. Образующаяся структура получила название **комплекса, определяющего вырезание интрона** или **комплекс СС** (commitment complex). В формировании сплайсосомы могут также принимать участие специфические активаторы (SR-белки), которые взаимодействуют с пре-РНК внутри экзонов. Считается, что R-белки способствуют посадке U1 мяРНК на пре-мРНК.

Далее комплекс СС переходит в **комплекс А** (рис. 35). Белок, связанный с сайтом ветвления, вытесняется другим белком. В результате этих взаимодействий с сайтом ветвления связывается U2 мяРНП.

Следующий комплекс В1 образуется после присоединения к сплайсосоме крупного рибонуклеопротеида, содержащего 3 мяРНК: U4, U5 и U6 (рис. 35). В этой РНП две мяРНК U4 и U6 образуют дуплекс за счет многочисленных комплементарных взаимодействий. В дальнейших событиях из этих двух мяРНК принимает участие только U6 мяРНП. Значение U4 мяРНП заключается в связывании функционально активных участков U6 мяРНП.

Переход комплекса В1 в комплекс В2 отмечается значительными конформационными перестройками сплайсосомы (рис. 35). U1 мяРНП теряет связь с 5′-границей сплайсинга, уступая место U5 мяРНП. U6 мяРНК высвобождается из дуплекса и образует связи с 5′-границей сплайсинга и U2 мяРНП. Важную роль в формировании комплекса В2 играют белки, ассоциированные с U5 мяРНК. Они способствуют расплетанию дуплекса U4–U6 мяРНК и образованию контакта между U6 мяРНК и 5′-границей сплайсинга. Также эти белки необходимы для связывания консервативной шпильки U5 мяРНК с обеими границами интрона. В результате указанных преобразований дуплекс U2 и U6 связывает участок ветвления и 5′-границу сплайсинга. U5 мяРНК дополнительно фиксирует 5′-границу так, что оказывается возможной нуклеофильная атака 2′-ОН аденозина, участвующего в образовании интронной петли, на межнуклеотидную связь 5′-границы интрона.

В результате этой атаки образуется 2′–5′-связь между 5′-концевым нуклеотидом интрона и аденозином сайта ветвления и высвобождается 3′-гидроксил 5′-концевого экзона. Основную

роль в катализе этого процесса играют не белки, а сплайсосомная РНК. Образование петли и освобождение 3′-гидроксила левого экзона сопровождает переход сплайсосомы в комплекс С1 (рис. 35). Далее происходит подстановка 3′-границы сплайсинга в активный центр сплайсосомы. Выбор 3′-границы сплайсинга и ее корректная подстановка в активный центр контролируется множественными белковыми факторами. Особую роль в позиционировании 5′- и 3′-границ сплайсинга играет консервативная шпилька U5 мяРНК.

На завершающей стадии сплайсинга осуществляется атака 3′-гидроксила левого экзона на межнуклеотидную связь между интроном и правым экзоном. В результате экзоны оказываются соединенными, а интрон — вырезанным в виде лассообразной структуры (рис. 35). Вырезание интрона и лигирование экзонов приводит к образованию комплекса С2.

Высвобождение интрона и лигированных экзонов завершается формированием последней структуры в цикле сплайсинга — комплекса I (рис. 35). После этого происходит разборка сплайсосомы. Данный процесс не происходит спонтанно, а контролируется специфическими белками. При разборке сплайсосомы восстанавливается U4/U6 гетеродимер, для чего нужна активность дополнительного белкового фактора. Не все белки, входящие в состав сплайсосомы, покидают мРНК после сплайсинга. Некоторые остаются связанными с мРНК в ядре и участвуют в экспорте сплайсированной мРНК. Другие переносятся с мРНК в цитоплазму, где контролируют целостность мРНК при ее трансляции.

Необычные интроны

Кроме интронов, содержащих канонические последовательности (GT–AG), существует небольшая группа интронов с другими обрамляющими последовательностями: AT-AC. Эти интроны вырезаются при помощи специального набора мяРНК, похожих на мяРНК, участвующих в вырезании классических интронов. Количество AT–AC интронов на два порядка меньше, чем обычных интронов. Не понятно, зачем возник этот второй тип интронов и какую роль он играет в жизни клетки.

Альтернативный сплайсинг

Феномен **альтернативного сплайсинга**, при котором некоторые экзоны могут вырезаться, а интроны, наоборот, оставаться в составе зрелой мРНК, связан с активностью дополнительных

регуляторных молекул. Состав данных регуляторов варьирует в широких пределах и зависит от возраста организма, типа клеток и их функционального состояния. В специфических условиях клетка способна синтезировать определенные изоформы белков благодаря функционированию механизмов альтернативного сплайсинга. Наличие таких изоформ для значительного количества белков свидетельствует о том, что данный механизм у высших эукариот является распространенным явлением. В настоящее время альтернативный сплайсинг можно рассматривать скорее как норму, а не редкое явление.

Альтернативный сплайсинг представляет собой один из тотальных механизмов регуляции, который используется в самых разнообразных проявлениях жизнедеятельности эукариот. Ниже приведены несколько примеров использования альтернативных белков в ряде механизмов у животных и растений.

Изменение локализации белкового продукта. В ряде случаев альтернативный сплайсинг приводит к образованию нескольких различных белков, которые имеют сходные свойства, но различную локализацию. То есть, модификация белков в данном случае заключается в формировании участков, ответственных за взаимодействие с мембранами определенных клеточных компонентов, а функциональная часть белка остается неизменной. В качестве примера можно привести ген фибронектина человека. Альтернативный сплайсинг позволяет клеткам синтезировать 20 различных молекул белков, мало отличающихся друг от друга функционально, но имеющих при этом различную внутриклеточную локализацию. Другой пример — растительный фермент аскорбат-пероксидаза. В хлоропластах растений встречаются четыре изоформы этого фермента. Одна из них связана с тилакоидными мембранами, а остальные локализуются в строме хлоропластов.

Настройка механизмов регуляции активности. При альтернативном сплайсинге возможно образование функциональных белков, имеющих различные способы регуляции. В хлоропластах растений синтезируются две изоформы большой субъединицы ключевого фермента фотосинтеза РБФК (рибулозобисфосфаткарбоксилазы). Обе формы РБФК обладают сходной активностью, но имеют различие в способах регуляции. Активность РБФК, как и многих других ферментов цикла Кальвина, регулируется тиоредоксином *f*. Модуляция активности РБФК осуществляется через большую субъединицу фермента, однако только одна

из ее альтернативных изоформ способна взаимодействовать с тиоредоксином *f*. В тиоредоксин-регулируемой РБФК содержится большая субъединица, полипептидная цепь которой несколько длиннее альтернативной формы со стороны С-терминальной части молекулы. Именно этот участок содержит два дополнительных остатка цистеина, которые обеспечивают способность молекулы реагировать на уровень восстановленности тиоредоксина *f*. Интересно, что тонкая настройка альтернативного сплайсинга транскрипта так же зависит от условий освещения, как и состояние тиоредоксина *f*.

Модификация свойств молекул. Одним из уникальных случаев является альтернативный сплайсинг предшественника мРНК, транскрибированного с гена, который кодирует K^+-каналы у птиц. В клетках птиц возможно образование 576 альтернативно сплайсированных форм K^+-каналов. В сенсорных клетках среднего уха птиц осуществляется синтез целого набора K^+-каналов, причем в специфическом градиенте, соответствующем чувствительности сенсоров. Считают, что градиентное распределение этих молекул обеспечивает восприятие сенсорными клетками звуков определенной частоты.

Переход к очередной фазе онтогенеза. Альтернативный сплайсинг как средство изменения свойств белка широко распространено у различных групп организмов. Если же альтернативно сплайсируются продукты генов, кодирующих регуляторные белки или транскрипционные факторы, то в этих случаях альтернативный сплайсинг может выступать в качестве основного механизма контроля онтогенетического развития. Примером этого может служить один из механизмов перехода растений к репродуктивной фазе развития. Ключевой регулятор цветения FLC репрессирует инициацию цветения, поэтому кодирующий его ген *FLC* в процессе индукции должен быть репрессирован. Существует несколько различных механизмов репрессии *FLC*. Один из них осуществляется через регуляторный белок **FCA, который** является транскрипционным регулятором. Транскрипт **FCA** альтернативно сплайсируется в четыре изоформы (α, β, γ, δ), и только одна форма **FCA**γ кодирует функционально активный белок FCAγ. Когда растение находится в вегетативной фазе развития, в апикальных меристемах могут синтезироваться все изоформы FCA, **кроме** γ. Однако наступление индуктивных условий стимулирует образование **FCA**γ, что способствует репрессии *FLC* и инициации механизмов цветения.

Полиаденилирование

Большинство матричных РНК эукариот имеют на 3′-конце фрагмент, состоящий из 100–200 остатков аденина. Этот участок не кодируется геном, а вводится в молекулу РНК посттранскрипционно ферментом poly(A)-полимеразой (рис. 36). В 3′-концевой области пре-мРНК высших эукариот есть две последовательности, определяющие место разрезания и последующего полиаденилирования: последовательность AAUAAA и GU-богатая область. Наличие 5′-концевого кэпа и ядерного кэп-связывающего комплекса также способствует полиаденилированию.

После завершения процесса сплайсинга и синтеза участка мРНК, содержащего сигналы полиаденилирования, происходит разрезание мРНК. Сигналы полиаденилирования (AAUAAA и GU) связываются соответствующими белковыми факторами, которые направляют активность специфического эндонуклеазного комплекса. Разрезание синтезирующейся мРНК осуществляется между AAUAAA и GU-богатой последовательностями на растоянии 11–30 нуклеотидов после последовательности AAUAAA. После разрезания РНК poly(A)-полимераза начинает медленное наращивание полиаденилата путем последовательного присоединения аденозильных остатков. Когда длина полиадениловой цепочки позволит связывание первой молекулы ядерного polyA-связывающего белка, полиаденилирование вступает в быструю процессивную фазу. После того, как длина polyA-хвоста достигнет порядка 200 нуклеотидов, poly(A)-полимераза прекращает работу. На этом процессинг мРНК заканчивается.

Наличие полиаденилированного 3′-конца мРНК, с которым связаны множественные молекулы ядерного polyA-связывающего белка, необходимо для выведения сплайсированной целостной мРНК из ядра в цитоплазму.

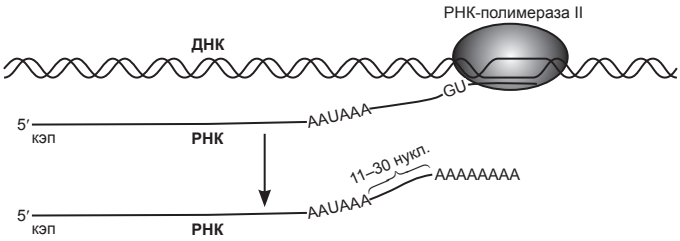


Рис. 36. Полиаденилирование эукариотической мРНК

ПРОЦЕССИНГ тРНК У ПРОКАРИОТ

У бактерий тРНК синтезируются в виде предшественников, имеющих дополнительные нуклеотиды на 5′- и 3′-концах. Кроме того, первичные транскрипты тРНК могут содержать от одной до шести молекул тРНК. Часть молекулы предшественника приобретает ту же пространственную структуру, что и зрелая тРНК (рис. 37).

В созревании тРНК принимают участие несколько ферментов. Образование 5′-концов катализируется ферментом РНКазой Р. Эта эндонуклеаза состоит из белка и РНК, которая необходима для функциональной активности. РНК узнает последовательность тРНК и обеспечивает правильную ориентацию фермента для осуществления специфического расщепления. Помимо этого, РНК, вероятно, вместе с белком, формирует активный центр фермента.

РНКаза Р расщепляет молекулу предшественника по сайтам между 5′-лидерными последовательностями и межцистронными областями. После действия РНКазы Р образуются отдельные молекулы с правильным 5′-концом и с лишними нуклеотидами со стороны 3′-конца, которые отщепляются на следующем этапе экзонуклеазами. Дальнейшие события зависят от типа предшественника тРНК. Два типа отличаются друг от друга наличием тринуклеотида ССА на 3′-конце. У тРНК I **типа лишние нуклеотиды** удаляются по одному с 3′-конца РНКазой **D, пока фермент не** достигнет ССА-последовательности. В тРНК II **типа после отщепления** нуклеотидов с 3′-конца осуществляется РНК-редактирование, в процессе которого добавляется триплет ССА. Добавление нуклеотидов контролируется тРНК-нуклеотидилтрансферазой.

СПЛАЙСИНГ тРНК И рРНК У НИЗШИХ ЭУКАРИОТ

Сплайсинг тРНК дрожжей

В геноме дрожжей около 400 генов кодируют транспортные РНК, причем 1/10 часть генов содержит один интрон. Изучение последовательностей интронов показало, что никакой канонической последовательности узнавания сайтов сплайсинга в этих генах не существует. Особых индивидуальных сайтов тоже нет, так как сплайсинг всех тРНК осуществляется одним набором

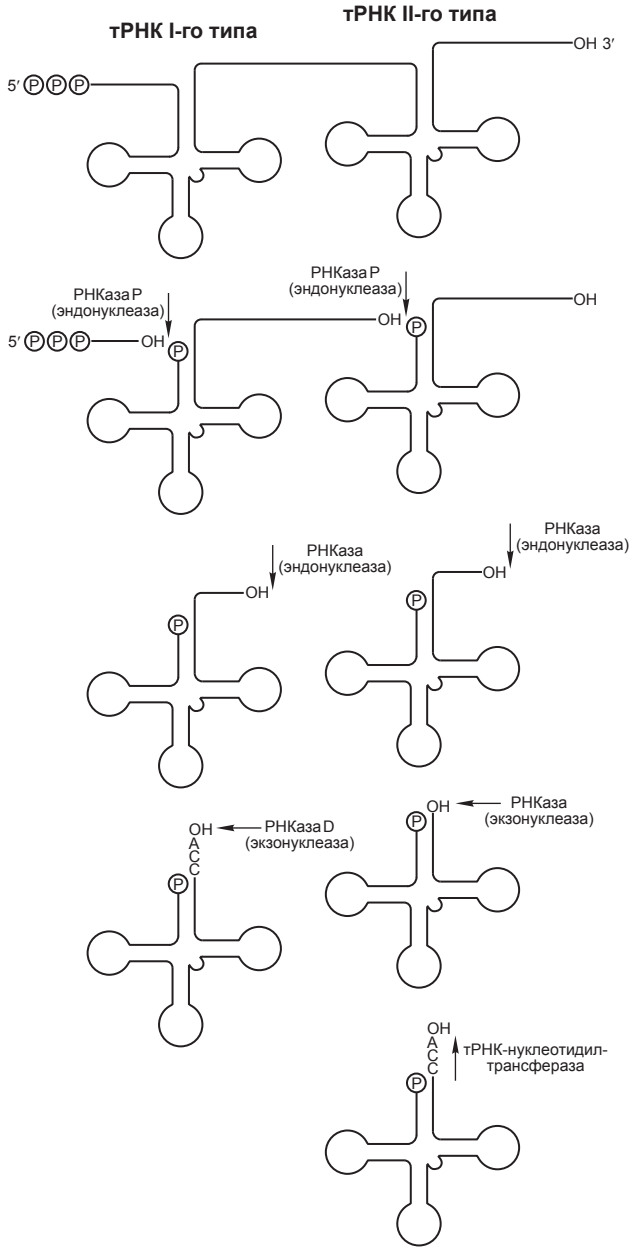


Рис. 37. Процессинг тРНК в клетках *E.coli*

ферментов. Все тРНК дрожжей, имеющие прерывистое строение, содержат интрон в 3′-области антикодоновой ветви, причем часть последовательности интрона комплементарна антикодону. Эта особенность приводит к тому, что антикодоновая ветвь предшественника тРНК удлиняется, а петля формируется за счет 5′-части интрона (рис. 38). Остальная часть молекулы про-тРНК ничем не отличается от зрелой тРНК. Следовательно, для сплайсинга имеет решающее значение не последовательность нуклеотидов, а пространственная структура молекулы.

На первом этапе сплайсинга нуклеазы разрезают тРНК по границам интрона, причем в обоих местах расщепление фосфорноэфирной связи происходит с 3′ стороны фосфатной группы, то

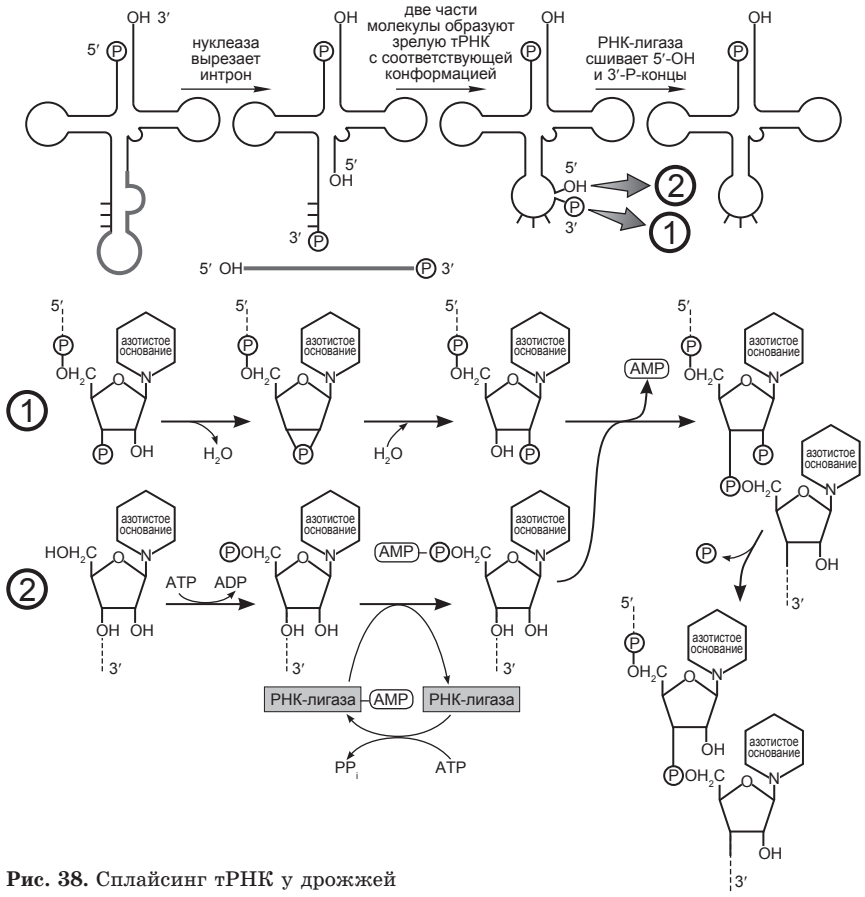


Рис. 38. Сплайсинг тРНК у дрожжей

есть между фосфатом и 5′-атомом нуклеотида. Таким образом, в области разрезов 3′-конец будет содержать фосфат, а 5′ — гидроксил.

3′-Фосфатная группа формирует циклический фосфат, образуя фосфоэфирную связь с 2′-гидроксилом. Затем фосфодиэфирная связь раскрывается с образованием 2′-фосфатной группы и 3′-гидроксила. С другого конца разреза 5′-ОН-группа фосфорилируется в киназной реакции с затратой АТР. В результате этих реакций образуется 5′-фосфатная и 3′-гидроксильная группы, которые необходимы для осуществления лигазной реакции. Фосфат в положении 2′ служит, по-видимому, маркером сайта сшивания.

РНК-лигазная реакция несколько напоминает ДНК-лигазную реакцию, происходящую при сшивании фрагментов Оказаки в процессе репликации ДНК. Активация РНК-лигазы происходит молекулой АТР. В результате активации выделяется пирофосфат, АМР ковалентно связывается с ε-аминогруппой лизина фермента. Аденилированная РНК-лигаза переносит АМР на 5′-фосфатную группу с образованием 5′–5′ фосфатной связи. Расщепление этой связи сопрягается с образованием фосфодиэфирной связи между 5′-фосфатом и 3′-гидроксилом. Оставшийся фосфат у 2′-атома удаляется фосфатазой.

Сплайсинг рРНК у *Tetrahymena thermophila*

Предшественник 26S рРНК у ресничной инфузории *Tetrahymena thermophila* представляет собой 35S-транскрипт, который содержит интрон. Сплайсинг этой РНК интересен тем, что он может осуществляться in vitro без белка только лишь в присутствии катионов и GTP. Причем требование GTP определяется не энергетическими потребностями. Для протекания реакции необходима 3′-ОН-группа гуанина, поэтому GTP может быть заменен на GDP или GMP. Конечный 5′-концевой фосфат интрона в процессе разрыва фосфодиэфирной связи переносится на 3′-гидроксил гуанозинфосфата (рис. 39). Затем освободившаяся 3′-конец левого экзона переносится на 5′-конечный фосфат правого экзона с образованием фосфодиэфирной связи. Линейная молекула вырезанного интрона, содержащая гуанозин, через некоторое время образует циклическую молекулу, благодаря переносу фосфатной связи от гуанозина на свободный 3′-конец интрона. Гуанозин при этом высвобождается. Самым удивительным в реакции сплайсинга рРНК у *Tetrahymena thermophila* является то, что 35S-пред-

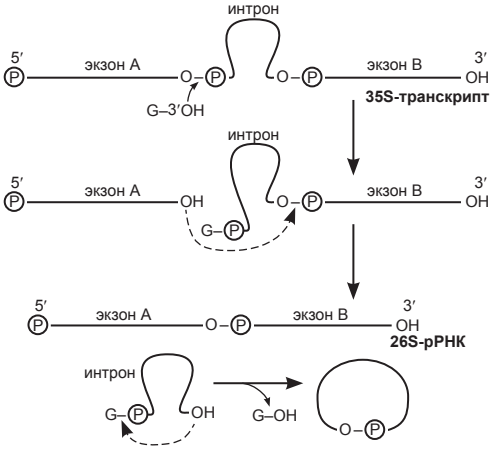


Рис. 39. Сплайсинг рРНК у *Tetrahymena thermophila*

шественник обладает каталитическими свойствами. РНК при создании третичной структуры формирует реакционный центр, способный взаимодействовать с субстратом и снижать энергию активации. В данном случае субстратом является сама РНК.

Способность РНК влиять на катализ была также обнаружена при изучении свойств РНКазы Р *E. coli*. Рибонуклеаза Р катализирует расщепление тРНК. Она состоит из полипептида массой 20 кД и малой РНК (375 нуклеотидов). Предполагалось, что РНК, входящая в состав РНКазы Р, выполняет вспомогательную роль, обеспечивая взаимодействие с комплементарными участками тРНК. Однако оказалось, что РНК фермента выполняет ведущую роль в реакциях расщепления тРНК. Более того, увеличение концентрации ионов Mg^{2+} приводит к тому, что РНК может катализировать реакцию без участия белкового компонента.

СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ МАЛЫХ РНК

В эукариотических клетках содержится большое количество малых ядерных (мя), ядрышковых (мякРНК) и цитоплазматических РНК (мцРНК). Их количество на одну клетку может достигать 10^5–10^6. Размер малых РНК составляет в среднем 100–300 нуклеотидов, а в целом их размеры могут варьировать от нескольких десятков до 400 нуклеотидов. По размеру малые

РНК соизмеримы с 5S **(120 п.н.) и 5,8S (160 п.н.)** рРНК, а также с тРНК (около 80 п.н.). Несмотря на размеры, эти виды РНК не относят к малым вследствие их особых функций. К малым цитоплазматическим РНК относят молекулы с широким диапазоном молекулярной массы. Среди них РНК с очень низкой массой — 20–30 п.н. Эти молекулы логично выделить в отдельный класс низкомолекулярных РНК. Большинство из таких РНК отличаются типичным строением, способом образования и функциями. Они будут рассмотрены в отдельном разделе «Малые интерферирующие РНК».

Малые ядерные РНК

Малые ядерные РНК (мяРНК) локализуются в ядре эукариотических клеток и участвуют в таких важных процессах, как сплайсинг пре-мРНК, расщепление полицистронных мРНК, регуляция факторов транскрипции и др.

Малые ядерные РНК имеют специфическую пространственную структуру, которая во многом зависит от наличия значительного количества палиндромных последовательностей. За счет комплементарного взаимодействия палиндромных участков формируются шпильки и петли, а каждая индивидуальная разновидность мяРНК приобретает уникальную структуру. Вторичная структура мяРНК U1 (рис. 40), выделенная из клеток человека, состоит из шпильки, у 3′-конца молекулы и крестообразной структуры, расположенной ближе к 5′-концу. Два структурных элемента соединены коротким односпиральным участком. На 5′-конце молекулы находится функционально активный одноцепочечный участок, который необходим для взаимодействия с РНК-мишенями. U1 мяРНК, по-видимому, одна из наиболее просто устроенных мяРНК.

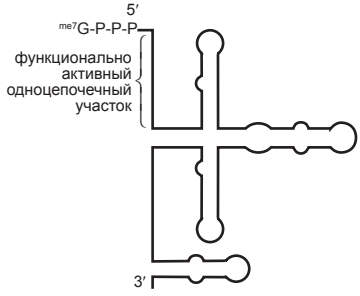


Рис. 40. Схематическое изображение строения малой ядерной РНК человека U1

Особенностями малых ядерных РНК является наличие большого количества уридиновых нуклеотидов. Зрелые молекулы мяРНК на 5′-конце имеют триметилированный кэп: один раз по N7 и дважды по N2 гуанозина (см. раздел «Кэпирование»).

Транскрипция мяРНК осуществляется РНК-полимеразой II или РНК-полимеразой III.

Все мяРНК не существуют в свободном виде и всегда ассоциированы со специфическими белками, с которыми они формируют малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы (мяРНП).

В составе мяРНП малые ядерные РНК U1, U2, U4, U5, U6 принимают участие в сплайсинге предшественника матричных РНК (см. раздел «Сплайсинг»). Из пяти мяРНК, участвующих в сплайсинге, только U6 транскрибируется РНК-полимеразой III и не имеет кэп-структуры. Остальные мяРНК синтезируются РНК-полимеразой II и имеют триметилированный кэп.

7SK РНК, обнаруженная у многих позвоночных, была описана еще в середине 1970-х годов, но ее функция была выяснена совсем недавно. Оказалось, что она принимает участие в ингибировании активности фактора элонгации транскрипции P-TEFb. Причем 7SK РНК взаимодействует только с активной (фосфорилированной) формой P-TEFb.

U7 мяРНК участвует в созревании гистоновых мРНК в S-фазу. Существует две группы гистоновых генов: кластеризованная и диспергированная. Первая активна только в S-фазу клеточного цикла, вторая обеспечивает текущие потребности в гистонах. Все 5 гистоновых генов объединены в кластеры, которые расположены в хромосоме тандемно и повторяются многократно (более 35 раз). Кластерные гены не имеют интронов, а их пре-мРНК не полиаденилируется. Этот кластер у эукариот транскрибируется как единое целое, а мяРНК U7 участвует в «нарезании» полицистронной РНК гистонов на отдельные мРНК.

Малые РНК также могут входить в состав различных ферментов. Например, фермент теломераза содержит короткий полирибонуклеотид (TER), служащий РНК-матрицей для синтеза цепи ДНК (см. раздел «Проблема концевой репликации»).

Малые ядрышковые РНК

Локализация и функции малых ядрышковых РНК (мякРНК) ассоциированы с ядрышком. Основная их функция — постранскрипционная модификация рибосомных РНК, но открыты мякРНК, функция которых не связана с рРНК.

По особенностям структуры мякРНК мало чем отличаются от малых ядерных. Молекулы мякРНК содержат много палиндромов, необходимых для формирования третичной структуры.

Неспаренные участки мякРНК используются для связывания с субстратом.

Синтез. Гены, кодирующие многие малые ядрышковые РНК, локализуются в интронах прерывистых генов, поэтому синтез этих мякРНК зависит от экспрессии генов-хозяев. Как правило, белковые продукты таких прерывистых генов функционально связаны с мякРНК. Например, у многих генов-хозяев, кодирующих рибосомные белки, в интронах кодируются мякРНК, принимающие участие в процессинге рРНК. Гены малых ядрышковых РНК могут также входить в состав транскрипционно независимых генетических единиц и экспрессироваться от своих собственных промоторов. Синтез интронных мякРНК осуществляется РНК-полимеразой **II, а** мякРНК, имеющие собственный промотор, синтезируются РНК-полимеразой **III. Существенные** различия по локализации генов малых ядрышковых РНК наблюдаются между животными и грибами, с одной стороны, и растениями — с другой.

У животных и дрожжей большинство генов малых ядрышковых РНК располагаются внутри интронов (рис. 41-А). Однако ряд мякРНК, такие как **U3, U8 и U13 (рис. 41-Б), кодируются** отдельными генами с собственным промотором. Особняком стоит ген позвоночных *UHG*, кодирующий в интронах 10 мякРНК U22–**U31 (рис. 41-В). Продукт** сплайсинга транскрипта этого гена не имеет рамки считывания и не используется для синтеза белка. Получается, что ген *UHG* существует для продукции десяти мякРНК, а для чего нужно сшивать участки РНК, разделяющие

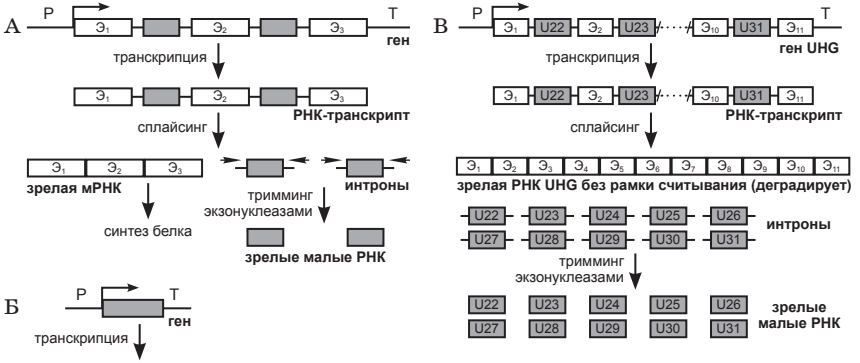


Рис. 41. Синтез малых ядерных РНК у животных:
А — малые РНК кодируются в интронах прерывистых генов;
Б — малые РНК кодируются собственными генами;
В — процессинг UHG

гены мякРНК, в настоящее время точно не известно. Вероятно, сплайсинг некодирующих участков необходим для того, чтобы изолировать их свободные 5′-фосфатные и 3′-гидроксильные группы.

Процессинг интрон-кодируемых мякРНК является в основном зависимым от сплайсинга. Интроны высвобождаются в ходе сплайсинга, а затем лишние интронные последовательности удаляются экзонуклеазами в процессе тримминга.

Большинство растительных малых ядрышковых РНК, в отличие от животных и дрожжевых, кодируются кластерами генов (рис. 42-А, Б). Причем кластеры генов, как правило, составляют транскрипционную единицу с собственным промотором, но некоторые кластерные гены мякРНК располагаются в интронах генов-хозяев. В любом случае растительные малые ядрышковые РНК первоначально синтезируются полицистронно, а затем индивидуальные РНК образуются в процессе эндонуклеазных реакций. Растительный ген, кодирующий мякРНК **U14, кластеризуется** и транскрибируется в виде полицистронного предшественника. Затем между копиями **U14 эндонуклеазы делают разрезы,** а экзонуклеазы удаляют лишние нуклеотиды, фланкирующие мякРНК.

У животных до настоящего времени полицистронных генов мякРНК обнаружено не было, а в дрожжах был обнаружен тандем из двух генов мяРНК **snR190 и U14.**

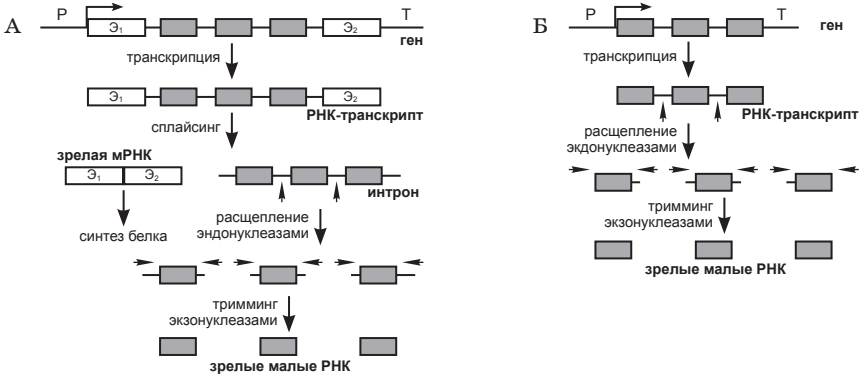


Рис. 42. Синтез малых ядерных РНК у растений:
А — кластеры генов, кодирующих малые ядерные РНК, локализуются в интронах прерывистых генов;
Б — кластеры малых ядерных РНК находятся под контролем собственного промотора

Растения содержат существенно большее количество мякРНК по сравнению с животными и грибами. Этот факт связывают с полиплоидностью генома растений. Кроме эукариот мякРНК были обнаружены также у ряда архей, например, *Sulfolobus solfataricus* и *Pyrococcus abyssi*.

Функции. Существуют большие группы мякРНК, имеющих сходные структурные элементы и свойства. Наиболее важными группами мякРНК являются C/D и H/ACA мякРНК. Названия этим мякРНК даны по названию основных консервативных мотивов — boxC/D и boxH/ACA.

К группе C/D мякРНК относятся **U3, U8, U13, U14 и другие**. В составе РНП они участвуют в метилировании рРНК. Молекулы этих мяРНК содержат две филогенетически консервативных последовательности — **boxC (UGAUGA) и boxD (CUGA). Эти последовательности расположены возле 5′** и 3′ концов молекулы, соответственно, и обычно фланкируются терминальными инвертированными повторами. Стебельковая структура **C/D мякРНК, сформированная спаренными основаниями** инвертированных повторов, действует как связывающий сайт для ряда белков, стабилизирующих мякРНК в рибонуклеопротеиновой частице. Также C/D мякРНК связывается с обильным ядерным белком фибриллярином, который, как оказалось, взаимодействует с box C/D-специфическими белками. Значение C/D мякРНК заключается в указании сайтов метилирования рибозы по 2′-атому. 10–20 нуклеотидов мякРНК, смежные с **boxD (CUGA), комплементарны соответствующему** участку рРНК. Сайт метилирования — нуклеотид рРНК, комплементарный пятому нуклеотиду мякРНК от **boxD с 5′** стороны (рис. 43).

Представители другого класса — H/ACA мякРНК — характеризуются структурой, состоящей из двух стебельково-петельных структур, которые формируются в 5′ и 3′ доменах мякРНК (рис. 44). Стебле-петли отделяются односпиральным участком, который содержит консервативную последовательность **boxH (ANANNA),** а последовательность ACA расположена на 3′ одноцепочечном участке молекулы. Оба бокса необходимы для накопления мякРНК этого типа в ядре и формирования сайтов связывания для ряда белков малых ядерных рибо-

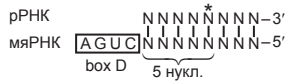


Рис. 43. Участие малых РНК boxC/D в метилировании рибозы нуклеотидов рРНК. Сайт метилирования указан звездочкой (по Kiss-Laszlo Z. et al., 1996)

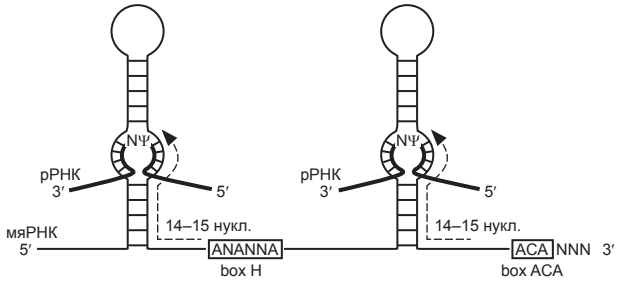


Рис. 44. Участие малых РНК box H/ACA в псевдоуридилировании нуклеотидов рРНК. Сайт псевдоуридилирования обозначен символом Ψ (по Ganot P., Bortolin M.-L., Kiss T., 1997 с изменениями)

нуклеопротеиновых частиц. В H/ACA мякРНК короткие последовательности, комплементарные рРНК, находятся в одноцепочечных участках внутренних петель обоих стебельково-петельных структур. При комплементарном спаривании рРНК и мякРНК в каждой из внутренних петель образуется два спаренных участка, между которыми остаются два неспаренных нуклеотида рРНК. Нуклеотид, расположенный с 5′-стороны рРНК, является сайтом псевдоуридилирования. Псевдоуридилирование — это один из способов РНК-редактирования, в процессе которого исходный нуклеотид замещается на псевдоуридин (рис. 45).

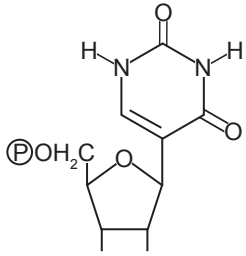


Рис. 45. Псевдоуридин

Малые цитоплазматические РНК

Малая цитоплазматическая РНК входит в состав сигнал-распознающей частицы (SRP), которая связывает сигнальный пептид (около 30 аминокислотных остатков) синтезирующихся белков эндоплазматического ретикулума. Как и цитоплазматические белки, белки ЭПР начинают синтезироваться в цитоплазме. После синтеза сигнального пептида, который приобретает характерную пространственную структуру, он связывается SRP. Синтез белка при этом приостанавливается. Комплекс SRP–рибосома–мРНК–пептид связывается SRP-рецептором, расположенным на шероховатом ЭПР, после чего комплекс рибосома–мРНК–пептид отсоединяется от SRP и связывается с мембраной ЭПР, на которой возобновляется синтез белка.

Малые интерферирующие РНК

В течение нескольких последних лет было открыто значительное количество РНК с чрезвычайно низкой молекулярной массой — малые интерферирующие РНК. Эти низкомолекулярные РНК нельзя расценивать как продукт деградации РНК с более высокой молекулярной массой по двум причинам. Во-первых, образование этих РНК строго регулируется, во-вторых, они выполняют конкретную регуляторную роль.

Сейчас подобные РНК разделяют на четыре класса: miРНК, siРНК, tasiРНК и piРНК. Все они выполняют функции, связанные с репрессией экспрессии генов (преимущественно на уровне трансляции), но различаются по механизму действия и способу образования. Исходя из свойств, все эти РНК можно называть интерферирующими, то есть вмешивающимися, поскольку они регулируют экспрессию генов, «вмешиваясь» в процессы трансляции, и контролируют срок существования транскриптов. Наиболее полно изучены интерферирующие РНК классов miРНК, siРНК, которые будут описаны ниже.

miРНК

Впервые miРНК были обнаружены при изучении развития личинок нематод в начале 1990-х годов. Выделенные две коротких 22-нуклеотидных РНК (*lin-4* и *let-7* РНК), как было выяснено, связывали определенный вид мРНК, предотвращая их трансляцию. Функции этих микроРНК ассоциировались с контролем скорости развития нематод. Впоследствии было показано, что *let-7* РНК широко распространена среди животных, обладающих билатеральной симметрией (включая человека). В 2001 году выяснили, что две РНК, первоначально выделенные из личинок нематод, являются членами большого класса некодирующих РНК, состоящих в среднем из 21–24 нуклеотидов. Эти РНК получили название **микроРНК** (miРНК или miRNA). В настоящий момент miРНК обнаружены не только у животных, но также у растений и грибов.

МикроРНК у многоклеточных эукариот представлены в большом разнообразии. По некоторым оценкам, животная клетка содержит более тысячи индивидуальных видов miРНК, тогда как общее количество молекул может превышать 50 тысяч на клетку. Различные виды miРНК не имеют никаких общих тенденций строения, однако интересно, что 5′-концевой нуклеотид у подав-

ляющего большинства miРНК и у растений, и у животных представлен уридином. Кроме того, следует отметить чрезвычайную консервативность микроРНК. Так, у человека идентифицировано более 200 генов, кодирующих микроРНК, и почти все они практически абсолютно сходны с аналогичными генами мышей, а с генами рыб имеют 80 %-е сходство. Высокая степень консервативности микроРНК свидетельствует об их чрезвычайной функциональной значимости.

Синтез и процессинг. Все miРНК кодируются собственными генами (семейства *miR*). Гены miРНК представлены самостоятельными транскрипционными единицами или собраны в кластеры. Около половины известных miРНК млекопитающих кодируется интронами генов белков и интронами и экзонами генов нкРНК. Несколько генов miРНК обнаружено в 3′-нетранслируемых областях генов, кодирующих белки. В этом случае образование мРНК и miРНК — альтернативные процессы. Не зависимо от локализации генов, miРНК всегда транскрибируются в виде длинных кэпированных и полиаденилированных предшественников.

Часть нуклеотидной последовательности генов miРНК представлена инвертированными повторами (рис. 46-А). Нуклеотиды

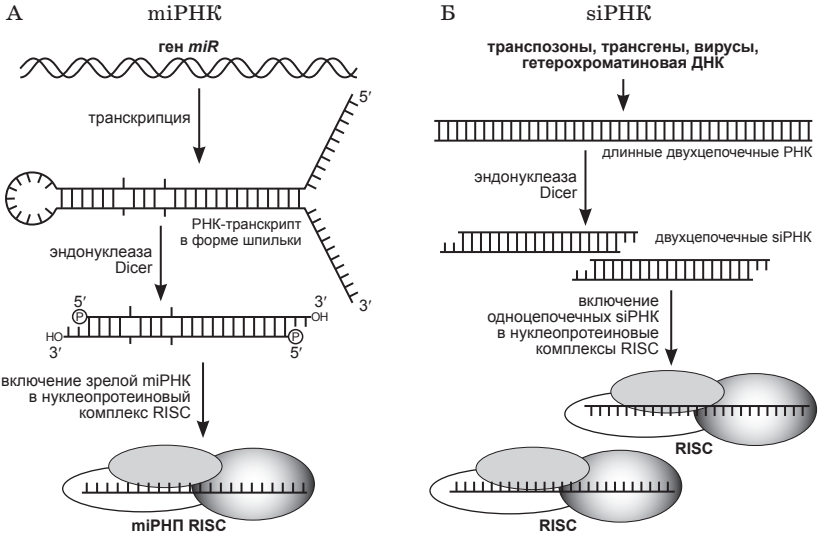


Рис. 46. Синтез микроРНК (по Bartel B., Bartel D. P., 2003 с изменениями)

повторов не обязательно должны полностью соответствовать друг другу, тем не менее, в результате транскрипции образуется предшественник, принимающий форму шпильки за счет взаимодействия комплементарных нуклеотидов повторов. Шпилька вырезается из первичного транскрипта ядерной эндонуклеазой Drosha. Образованная шпилька (pre-miРНК) при участии белка Exportin5 переносится в цитоплазму и подвергается действию эндонуклеазы Dicer. Ферменты Drosha и Dicer обладают свойствами РНКазы III, то есть специфичны к двуцепочечной РНК. Эндонуклеаза Dicer вырезает из шпильки короткий двуцепочечный участок РНК. На концах образованной двуцепочечной РНК находятся 5′-фосфаты и 3′-гидроксилы, причем на 3′-концах каждой цепочки выступают по 2 неспаренных нуклеотида. Дуплекс miРНК сохраняется до того момента, когда зрелая одноцепочечная miРНК включается в рибонуклеопротеиновый комплекс — RISC (*RNA-induced silencing complex*, или РНК-индуцируемый репрессирующий комплекс). Основным компонентом комплекса RISC является белок семейства Ago, который ассоциирует с дуплексом miРНК и осуществляет его разрушение. В результате miРНК остается в составе RISC, а комплементарная цепь деградирует. Зрелые miРНК могут происходить как из 3′, так и из 5′-плеча предшественника, но у каждого конкретного вида miРНК только из одного. Таким образом, функционально активной является только одна из двух комплементарных цепочек, а вторая после разделения дуплекса деградирует. Фрагмент предшественника, соответствующий той цепочке двойной РНК, которая разрушается, то есть не выполняет никаких функций, принято обозначать со звездочкой и называть miРНК* фрагментом.

Функции. МикроРНК являются регуляторными молекулами. Они участвуют в посттранскрипционной репрессии генов (**PTGS** — *posttranscriptional gene silencing*), значительно снижая или отменяя полностью трансляцию соответствующих матричных РНК (рис. 47). Способ действия зависит от степени комплементарности miРНК с мРНК-мишенью. Высокая степень соответствия, как правило, определяет разрушение мишени. Для всех эукариот показано, что основная функция микроРНК — участие в репрессии трансляции путем разрезания определенных мРНК (рис. 47-А).

МикроРНК комплементарна участку мРНК-мишени, который расположен примерно в средней части молекулы мишени. В составе рибонуклеопротеинового комплекса RISC miРНК связыва-

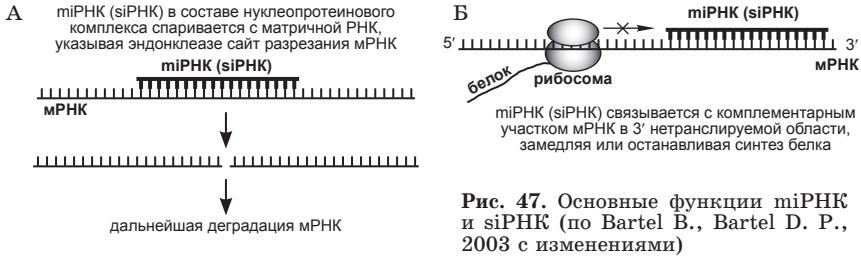


Рис. 47. Основные функции miРНК и siРНК (по Bartel B., Bartel D. P., 2003 с изменениями)

ется с мРНК и указывает сайт, по которому эндонуклеаза Ago вносит разрыв в молекулу матричной РНК. Обычно мишень разрезается между нуклеотидами, которые расположены напротив 10-го и 11-го нуклеотидов miРНК. Далее остатки мРНК разрушаются другими нуклеазами. Напомним, что нуклеаза Ago участвует также в деградации miРНК* фрагмента.

Следует заметить, что степень комплементарности между miРНК и их РНК-мишенями практически никогда не бывает абсолютной. Как правило, несколько нуклеотидных пар (от 1 до 4) не совпадают. Однако для эффективного выполнения функций полного соответствия пар не требуется. Более того, замечено, что некоторые несоответствующие пары под давлением эволюционного отбора не только не элиминируются, а скорее, наоборот, сохраняются. Считается, что неполное комплементарное соответствие способствует более эффективной посттранскрипционной репрессии путем разрезания мРНК. Это связано с тем, что части разрезанной мРНК быстрее высвобождаются из комплекса RISC, что повышает скорость ферментативной реакции.

У животных был обнаружен еще один механизм посттранскрипционной репрессии с участием микроРНК. Связывание RISC с мишенью вызывает не деградацию мРНК, а репрессию трансляции. В ряде случаев концентрация данного вида транскриптов остается на прежнем уровне и трансляция может быть возобновлена, однако часто репрессия сопровождается существенной деградацией мРНК-мишени, которая не опосредована механизмом РНК-интерференции, а является следствием репрессии их трансляции. Предполагается, что стабильность мРНК связана с ее трансляционным статусом (интенсивностью трансляции).

Репрессия трансляции осуществляется с участием miРНК, которые имеют низкую степень комплементарности мРНК-мишеням. Такие miРНК комплементарны мРНК-мишени только в 5′-части. Комплементарность обычно сохраняется в участке,

который называется seed region, который соответствует нуклеотидам 2–7/8. Небольшой размер комплементарного участка (seed region) позволяет miРНК иметь много мРНК-мишеней.

Большинство miРНК животных имеют неполную комплементарность с мишенями и способны связываться с нетранслирующимся 3′-районом мРНК (рис. 47-Б). В настоящее время не известно, осуществляется ли подобный механизм у растений.

Большинство генов, экспрессия которых регулируется miРНК путем разрушения мРНК или ослабления трансляции, связаны с контролем этапов развития организмов. Как уже было сказано, именно с этой функцией были связаны первые открытые микроРНК у личинок нематод. В растениях активность микроРНК также связана с дифференцировкой тканей и развитием органов. Например, в тканях развивающихся соцветий в изобилии обнаруживается микроРНК **miR171, а транскрипты генов** *SCL6-III* и *SCL6-IV* присутствуют только в разрезанном состоянии, причем сайт разрезания находится в середине участка, комплементарного **miR171. В то же время в клетках стебля miR171 не на**капливается, а транскрипты *SCL6-III* и *SCL6-IV* имеют полную длину и активно транслируются. Кстати, следует отметить некоторую исключительность **miR171: это одна из немногих** микроРНК, которая обладает абсолютной комплементарностью со своими мРНК-мишенями.

В настоящее время накопилось огромное количество сведений о микроРНК и у растений, и у животных. Анализ данных позволяет утверждать, что **микроРНК являются факторами, способствующими очищению клетки от определенных видов транскриптов.** Это имеет важное значение для процессов дифференцировки, поскольку позволяет значительно ускорять переход клетки с одной программы развития на другую.

siРНК

Помимо miРНК существует еще один тип низкомолекулярных РНК. Это короткие [или малые] интерферирующие (вмешивающиеся) РНК, которые обозначают siРНК **(short [or small] in**terfering **RNA). Впервые эти РНК были идентифицированы как** компоненты, участвующие в посттрансляционной репрессии генов у растений. По своей структуре, некоторым этапам синтеза и ряду свойств siРНК **чрезвычайно похожи на** miРНК.

Все siРНК **содержат от 18 до 25 нуклеотидов, процессируются** ферментом Dicer **и затем включаются в рибонуклеопротеино-**

вые комплексы RISC. Активность siРНК так же, как и miРНК, проявляется в составе RISC-комплекса. Однако существует ряд принципиальных различий, которые позволяют строго отличать siРНК от miРНК (рис. 46):

1) siРНК не кодируются собственными генами;
2) siРНК процессируются из длинной двуцепочечной РНК или большой шпильки одноцепочечной РНК, источником которых могут быть матричные, вирусные РНК, а также РНК, транскрибированные с ДНК транспозонов, вирусов или гетерохроматиновых участков генома;
3) обе короткие комплементарные цепочки двухленточной РНК, полученной в результате процессинга, являются зрелыми siРНК;
4) siРНК не обладают консервативностью, поскольку не эволюционируют самостоятельно, а первичная структура siРНК зависит исключительно от последовательности нуклеотидов их источников.

Для siРНК характерны те же свойства, что и для miРНК. Они участвуют в посттранскрипционной репрессии генов путем разрезания мРНК и репрессии трансляции без разрушения мРНК. Вместе с тем, функции siРНК более разнообразны, чем у miРНК. Это объясняется тем, что пути происхождения РНК этого вида тоже несколько разнообразнее. siРНК могут быть процессированы из вирусной РНК, поэтому их функции ассоциируются не только с репрессией своих генов, но и чужеродных. Предполагается, что siРНК могут быть задействованы в антивирусной защите.

Показано, что у растений при заражении вирусами накапливается значительное количество siРНК, комплементарных транскриптам вирусных генов. Появление этих siРНК значительно снижает уровень экспрессии чужеродных генов. Более того, во флоэме растений, инфицированных вирусами, а также трансгенных растений, экспрессирующих гены белка вирусной оболочки, была обнаружена высокая концентрация siРНК. У растений тыквы (*Cucurbita maxima*) идентифицировали белок CmPSRP1 (PHLOEM SMALL RNA BINDING PROTEIN1), который участвует в переносе siРНК через плазмодесмы во флоэму, а также в их транспорте по флоэме. Распространяясь через флоэму по растению, siРНК попадают в другие органы растения, обеспечивая в них антивирусную защиту. Способность siРНК проникать и транспортироваться по флоэме обеспечивает им роль системного защитного сигнала.

Некоторые siРНК эндогенного происхождения (гетерохроматиновые siРНК) **участвуют в регуляции генной экспрессии путем ремоделирования хроматина**. Связываясь с определенными участками генома, siРНК **направляют на локализованные в этом** участке нуклеосомы каталитическую активность гистоновых метилтрансфераз. Ковалентная модификация коровых гистонов (метилирование) способствует формированию на данном участке генома неактивной гетерохроматиновой области (подробнее о ремоделировании хроматина и значении ковалентной модификации гистонов см. в главе «Механизмы клеточной памяти»).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ГЛАВЕ 1

Биохимическая природа наследственности

1. Что вы знаете о развитии представлений о биохимической природе наследственности?
2. Какое значение для понимания химической природы наследственности имеют эксперименты Гриффита и Эвери?
3. Можно ли рассматривать процессы воспроизведения (наследования) и реализации генетической информации с точки зрения биосинтеза и почему?
4. В каких случаях не хватает специфичности ферментов для обеспечения синтеза молекул?
5. Объясните причины возникновения концепции матричной поверхности.
6. Какими свойствами должны обладать молекулярные матрицы? Какие молекулы обладают этими свойствами?
7. Может ли белок выполнять роль матрицы?

Центральная биологическая догма

1. Что такое Центральная биологическая догма?
2. Какие механизмы вовлекаются в процесс реализации генетической информации в биологических системах?

Конформационная наследственность белков

1. Как были открыты прионные белки?
2. Какие особенности молекулярной структуры прионов определяют их свойства?
3. Каким структурным изменениям подвергается молекула белка в процессе прионизации?
4. Что вам известно о распространении прионных белков в живом мире?
5. Опишите молекулярный механизм нонсенс-супрессии у дрожжей.
6. Какие существуют современные представления о механизмах прионизации?
7. Обоснуйте необходимость участия шаперонов в процессах прионизации.

ДНК — идеальная матрица

1. Почему молекула ДНК подходит для выполнения функций молекулярной матрицы?

2. Расскажите о структуре ДНК.
3. Какими свойствами обладает двойная спираль ДНК?
4. Какими бывают двойные спирали ДНК и чем они различаются между собой?
5. Опишите уровни компактизации молекулы ДНК у прокариот.
6. Объясните сущность и преимущества доменной структуры хроматина.
7. Опишите уровни компактизации молекулы ДНК у эукариот.
8. Что такое нуклеосомы и как они устроены?
9. Какое значение для формирования хроматиновых фибрилл имеет гистон H1?
10. Существуют ли различия в механизмах репликации ДНК между прокариотами и эукариотами? Чем они обусловлены?
11. Как осуществляется инициация репликации?
12. Чем характеризуются точки начала репликации?
13. Опишите молекулярные события в области репликационной вилки.
14. Зачем нужны белки, дестабилизирующие структуру ДНК?
15. Как функционируют и для чего нужны топоизомеразы?
16. В каком направлении осуществляется полимеризация цепей ДНК?
17. Опишите механизм полимеризации ДНК.
18. Какие типы ДНК-полимераз Вы знаете?
19. Какими свойствами обладают ДНК-полимеразы?
20. Что такое праймер и почему без него не может начаться синтез цепи ДНК?
21. Обоснуйте, почему не существует ДНК-синтезирующей праймазы.
22. Что такое фрагменты Оказаки?
23. Какую функцию выполняет ДНК-лигаза?
24. У каких организмов возникает проблема концевой репликации и как она решается?
25. С какого конца дочерние цепи ДНК будут короче своих матриц после репликации?
26. Что такое теломеры и теломеразы?

Типы генов и их структура

1. Объясните понятия «ген» и «цистрон».
2. Как устроен ген?
3. Какие существуют типы генов? Дайте им характеристику.

4. Для чего нужны участки узнавания и связывания в регуторных участках генов?
5. Базальные, проксимальные и дистальные элементы промотора.
6. Чем можно объяснить сходство структуры блока Прибнова и ТАТА-блока?

Синтез РНК

1. Что Вам известно о типах и функциях РНК?
2. Какие существуют РНК-полимеразы у прокариот и эукариот и какие они выполняют функции?
3. Что Вы знаете о структуре РНК-полимераз? Основные и вспомогательные частицы РНК-полимеразы?
4. Что такое холофермент и корфермент?
5. Как протекает инициация транскрипции у *E. coli*?
6. Что такое слабый участок связывания; закрытый двойной комплекс; открытый двойной комплекс; открытый тройной комплекс?
7. Как останавливается синтез РНК у бактерий?
8. Какие существуют типы терминаторов бактериальных генов и как они устроены?
9. Что такое ρ-фактор?
10. Опишите механизм терминации транскрипции у бактерий.
11. Какие особенности инициации транскрипции белок-кодирующих генов у эукариот Вы знаете?
12. На какие группы можно разделить компоненты преинициаторного комплекса?
13. Опишите механизм сборки преинициаторного комплекса.
14. Особенности структуры эукариотических РНК-полимераз.

Процессинг РНК

1. Что такое процессинг РНК?
2. Какие механизмы относятся к процессингу?
3. Опишите последовательность событий в ходе созревания мРНК эукариот.
4. Что такое гетерогенная ядерная РНК и какова ее судьба в клетке?
5. Что такое кэп, какие бывают кэпы?
6. Какие РНК подвергаются кэпированию и как оно осуществляется?
7. Что такое сплайсинг и сплайсосомы?

8. Какое значение мяРНК имеют в механизме сплайсинга?
9. Почему вырезанный в процессе сплайсинга интрон принимает форму петли?
10. Что какое альтернативный сплайсинг и каково его значение в механизмах регуляции?
11. Как осуществляется процессинг тРНК у прокариот?
12. Расскажите об особенностях процессинга тРНК у дрожжей.
13. Опишите механизм автосплайсинга рРНК у ресничной инфузории *Tetrahymena thermophila*.

РНК с низкой молекулярной массой

1. Что такое малые РНК? Какие виды малых РНК Вы знаете?
2. В каких механизмах участвуют виды малых РНК?
3. Где локализуются гены, кодирующие малые РНК?
4. Как синтезируются малые ядрышковые РНК у разных групп организмов?
5. Какие особенности структуры мяРНК определяют их свойства?
6. Что Вам известно о структуре и функциях малых интерферрующих РНК?
7. В чем сходство и чем принципиально различаются miРНК и siРНК?
8. Что Вы можете сказать о консервативности последовательностей miРНК и siРНК?

Глава 2

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У ПРОКАРИОТ

ТОПОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ

Экспрессия генов инициируется в результате узнавания РНК-полимеразой регуляторных участков промоторов. Однако начало транскрипции у бактерий во многом зависит от белков-регуляторов, которые определяют доступность РНК-полимеразы к промотору. Помимо этого, для регуляции генной экспрессии важное значение имеет состояние хроматина, его третичная структура. У прокариотических организмов уровень экспрессии генов на конкретном участке ДНК зависит от уровня его механического напряжения. Регуляцию генной активности путем создания определенных механических напряжений хроматина называют **топологической.**

Для проявления активности генов важное значение имеет состояние хроматина, точнее, тех его участков, в которых находятся активные гены. Синтез РНК на определенном участке ДНК осуществляется в том случае, если существует возможность создания двойного открытого комплекса. Процесс плавления ДНК на ограниченном участке требует затраты энергии, и чем плотнее скручен участок ДНК, чем труднее его расплести, тем меньше шансов у ферментов и регуляторов инициировать транскрипцию.

Экспрессия гена — реализация генетической информации, закодированной в ДНК. Осуществляется в процессах транскрипции и трансляции. В более полном смысле это понятие включает в себя взаимодействие конечных продуктов генов между собой, так как далеко не все синтезированные РНК и белки могут проявить себя в фенотипе.

Бактериальный геном, как известно, имеет структуру петельных доменов. Концы петель жестко закреплены, и свободное вращение спирали ДНК вокруг ее оси невозможно. Раскручивание двойной спирали при образовании открытого комплекса сопровождается ее вращением, в результате которого в молекуле создаются механические на-

пряжения. Дальнейшее раскручивание ДНК в процессе транскрибирования способствует образованию положительных супервитков в соседних участках петли, и это затрудняет синтез РНК. Таким образом, для облегчения инициации экспрессии гена и собственно транскрипции необходимо ослабить механическое напряжение на транскрибируемом участке ДНК. Это достигается благодаря функциональной активности фермента гиразы — топоизомеразы **II-го** типа. Гираза способна создавать и поддерживать отрицательные супервитки.

Как и топоизомеразы, предотвращающие спутывание ДНК в процессе репликации, гиразы также способны вносить разрывы в цепи ДНК, а затем сшивать их, изменяя этим механическое напряжение в молекуле ДНК в рамках одного домена (или петли) (см. раздел «Компактизация ДНК прокариот»). При этом гиразы осуществляют разрыв двух цепей ДНК одновременно (рис. 48).

Активная форма гиразы *E. coli* представляет собой тетрамер, состоящий из субъединиц двух типов: **GyrA** и **GyrB. Структуру гиразы можно представить** в виде A_2B_2. Субъединица **GyrA** имеет молекулярную массу около 105 кД, **GyrB — 95 кД. Общая масса гиразы** составляет приблизительно 400 кД. Субъединица **GyrA участвует в разрыве** и возобновлении фосфодиэфирных связей, субъединица **GyrB контролирует** пространственную структуру молекулы фермента в целом и содержит сайты связывания с АТР. С белковым тетрамером контактируют около 140 пар нуклеотидов ДНК.

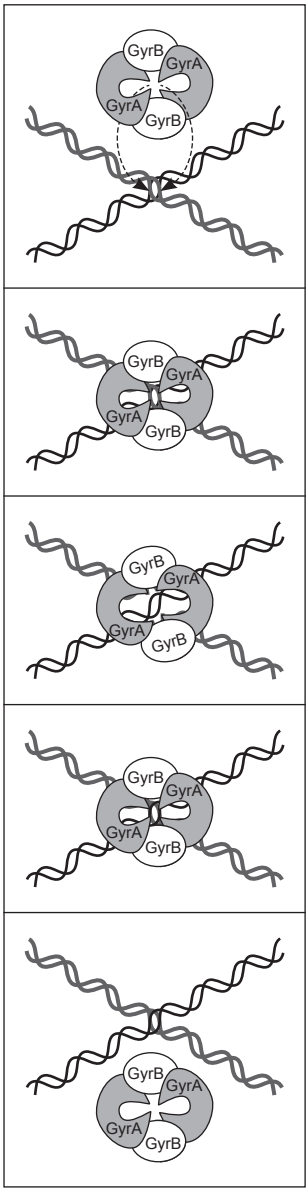


Рис. 48. Образование двухцепочечного разрыва и восстановление целостности дуплекса ДНК гиразой

Гираза связывается с положительно суперспирализованной двухцепочечной ДНК в месте перекреста молекулы и вносит еще один положительный виток. Образование положительной суперспирали по месту взаимодействия гиразы с ДНК стимулирует образование отрицательной суперспирали в соседнем несвязанном участке ДНК. Затем фермент вносит разрывы в обе цепи дуплекса ДНК в месте пересечения положительной суперспирали. Каждая из субъединиц **GyrA ковалентно связывается** с 5′-фосфатом по месту разрыва, а 3′-концы остаются свободными. Другая двойная цепь ДНК протаскивается через образующуюся в результате разрыва брешь, а затем разрывы сшиваются. Разрыв одного дуплекса ДНК по одну сторону второго, а сшивание разрыва с другой приводит к инверсии супервитка с положительного на отрицательный. Таким образом, в результате одного цикла действия гиразы образуются 2 отрицательных супервитка (рис. 49). Впоследствии локальное расплетание спирали в транскрибируемом участке сопровождается исчезновением отрицательного супервитка, а не возникновением положительного. Это делает процесс синтеза РНК энергетически более выгодным.

Как и в случае работы других топоизомераз, разрыв и образование ковалентных фосфодиэфирных связей не требует дополнительной затраты энергии, так как энергия связи сохраняется в результате образования ковалентной связи между ферментом и 5′-концом цепи ДНК. Более того, не требуется затраты энергии при образовании отрицательного витка в момент связывания гиразы с ДНК. Однако следующий цикл без дополнительной энергии будет невозможен. В результате работы гиразы меняется ее пространственная структура, и после отделения фермента от инвертированной суперспирали должна быть восстановлена его первоначальная конформация. В противном случае гираза останется в неактивном состоянии. Процесс восстановления исходной конформации фермента называют **оборотом фермента**. Субъединицы **GyrB** связывают и гидролизуют АТР. Энергия гидролиза используется для пространствен-

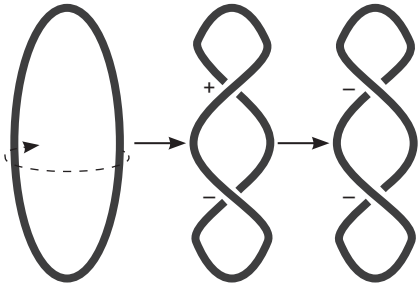


Рис. 49. Схема действия гиразы

ных изменений в молекуле, благодаря которым тетрамер гиразы приобретает активную конформацию.

Итак, увеличение механических напряжений в молекуле ДНК в негативном направлении способствует облегчению синтеза РНК, и этот процесс можно расценивать как один из этапов активации прокариотических генов.

Следует заметить, что промоторы многих бактериальных генов при отсутствии механических напряжений оказываются неэффективными, даже несмотря на то, что в этих условиях цепи ДНК легче отделить друг от друга. Тем не менее, инициация синтеза РНК на участках, имеющих множественные отрицательные супервитки, или при наличии одноцепочечного разрыва практически невозможна. Подобное свойство имеет важное значение, поскольку в ходе ряда генетических процессов, связанных с нарушением целостности одной из цепей ДНК (репарация, репликация, рекомбинация), доступ РНК-полимеразы к промоторам должен быть затруднен.

Таким образом, топологическая регуляция экспрессии бактериальных генов заключается в поддержании определенного уровня механических напряжений, что способствует максимальной активности экспрессии определенной группы генов.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ОПЕРОННЫХ ГЕНОВ

Регуляция экспрессии генов с помощью факторов транскрипции может осуществляться по позитивному или негативному принципу. Если наличие регулятора на промоторе гена стимулирует экспрессию, обеспечивая посадку на промотор РНК-полимеразы, то этот тип регуляции называют **позитивным**. Если же регулятор, наоборот, препятствует связыванию РНК-полимеразы с промотором, то такую регуляцию называют **негативной**.

Активность экспрессии бактериальных оперонных генов преимущественно определяется регуляторными белками-репрессорами, связывающими оператор. При связывании белком-регулятором операторного участка активность генов репрессируется (негативная регуляция). Уровень активности оперонных генов может регулироваться также и по позитивному типу. В этом случае регулятор связывается не с оператором, а с особой областью промотора, в результате чего обеспечиваются дополнительные участки связывания РНК-полимеразы, а транскрипция оперонных генов, соответственно, активируется.

Способность белков, модулирующих активность экспрессии у бактерий, связываться с регуляторными участками оперона часто зависит от низкомолекулярных веществ. В зависимости от того, как малые молекулы, связывающиеся с регуляторами, влияют на активацию, опероны называют **индуцибельными** или **репрессибельными**, а низкомолекулярные регуляторы соответственно **индукторами** или **корепрессорами**. В репрессибельных оперонах белок-репрессор связывается с оператором и ингибирует экспрессию в присутствии малых молекул корепрессора, а индуцибельные опероны активируются в присутствии коиндукторов.

Низкомолекулярные коиндукторы и корепрессоры, которые связываются с белковыми регуляторами, как правило, функционально связаны с белковыми продуктами генов. Например, если гены

оперона кодируют ферменты, то низкомолекулярные регуляторы могут быть представлены субстратами или продуктами тех реакций, которые катализируются данными ферментами. Так, экспрессия триптофанового оперона репрессируется триптофаном, а при низкой концентрации или при полном его отсутствии наблюдается повышение активности транскрипции. Низкомолекулярными регуляторами могут быть также вещества, не являющиеся субстратами или продуктами реакций. К примеру, лактозный оперон контролируется не лактозой, а ее стереоизомером аллолактозой. Подобные соединения называют **добровольными индукторами.**

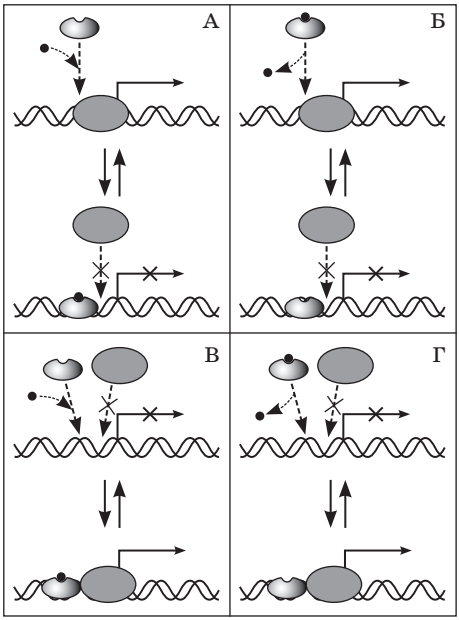


Рис. 50. Типы регуляции экспрессии генов с участием белковых модуляторов активности и низкомолекулярных корегуляторов:
А) негативный репрессибельный;
Б) негативный индуцибельный;
В) позитивный индуцибельный;
Г) позитивный репрессибельный.

Условные обозначения:
- низкомолекулярный аллостерический регулятор;
- белковый модулятор активности;
- РНК-полимераза.

Регуляцию с участием белковых и низкомолекулярных регуляторов можно разделить на 4 типа (рис. 50).

1. Негативная репрессибельная (рис. 50-А):
   - белковый регулятор — репрессор;
   - низкомолекулярный регулятор — корепрессор.

Оперон находится в активном состоянии при отсутствии или низких концентрациях корепрессора, когда репрессор имеет низкое сродство с оператором. Появление в клетке корепрессора в соответствующих концентрациях способствует связыванию репрессора с оператором. В результате РНК-полимераза вытесняется из промотора и транскрипция ингибируется.

2. Негативная индуцибельная (рис. 50-Б):
   - белковый регулятор — репрессор;
   - низкомолекулярный регулятор — индуктор.

Репрессор в присутствии индуктора теряет сродство с промотором и позволяет РНК-полимеразе инициировать трансляцию. При низких концентрациях индуктора (или полном его отсутствии) ген репрессирован.

3. Позитивная индуцибельная (рис. 50-В):
   - белковый регулятор — активатор;
   - низкомолекулярный регулятор — индуктор.

Активатор в присутствии индуктора связывается с регуляторным участком гена и стимулирует посадку РНК-полимеразы на промотор. Экспрессия оперона усиливается.

4. Позитивная репрессибельная (рис. 50-Г):
   - белковый регулятор — активатор;
   - низкомолекулярный регулятор — корепрессор.

При отсутствии корепрессора в клетке активатор и РНК-полимераза связаны с промотором — ген активен. Повышение концентрации корепрессора снижает сродство активатора с промотором. РНК-полимераза тоже диссоциирует от промотора и экспрессия ингибируется.

КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ЛАКТОЗНОГО ОПЕРОНА *E. COLI*

Негативный индуцибельный контроль

Лактозный оперон (*lac*-оперон), как и большинство других полицистронных генетических структур, кодирует последовательности нескольких функционально связанных белков (рис. 51). Три структурных гена *lacZ*, *lacY* и *lacA* кодируют, соответственно, β-галактозидазу (катализирует расщепление β-галактозидной связи), пермеазу (осуществляет трансмембранный перенос низкомолекулярных веществ, в том числе лактозы) и β-галактозилтрансацетилазу (ацетилирует галактозу).

Со стороны промотора *lacP* к оперону примыкает регуляторный ген *lacI*, который кодирует белок-репрессор, связывающий

Рис. 51. Структура лактозного оперона

оператор *lacO* в отсутствии аллолактозы — стереоизомера лактозы (рис. 52). Оператор занимает область размером около 26 п.н., которая находится в пределах нуклеотидов с положениями от −5 до +21. Частично область оператора перекрывается с промотором *lacP*, поэтому наличие репрессора на операторе не дает возможности РНК-пролимеразе связаться с промотором и индуцировать транскрипцию.

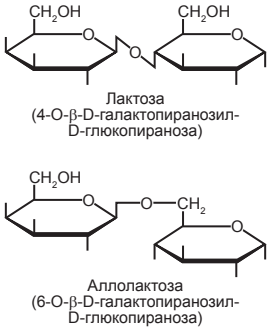


Рис. 52. Лактоза и ее изомер аллолактоза

Ген *lacI* транскрибируется независимо от регуляторов с постоянной скоростью. А поскольку процессы образования и распада продукта этого гена имеют равные соотношения, это обеспечивает постоянное присутствие в клетке определенного количества репрессора. Поскольку продукт этого гена является *транс*-диффундирующим, нет жесткой необходимости его расположения в пространственной близости возле оперона. Действительно, в отличие от гена *lacI* большинство регуляторных генов, кодирующих белки-репрессоры, располагаются на некотором удалении от оперонов, активность которых они контролируют.

Белок-репрессор *lac*-оперона (36 кД) взаимодействует с ДНК за счет **N-терминальной области, состоящей из 59 аминокислотных** остатков (1–59). Остальная часть молекулы (С-концевая область) содержит аминокислотные остатки 60–360 и носит название «ядра». Аминокислотные остатки в положениях 50–80 составляют шарнир, соединяющий две структурные области, а остальные аминокислоты (81–360) определяют способность белка к образованию тетрамерной структуры и связыванию индуктора.

В области оператора присутствуют два участка связывания репрессора. Каждый из этих участков связывается димером репрессора. В результате на двух операторных участках в составе лактозного оперона формируется тетрамерная структура. Активный репрессор способен связываться с любым участком ДНК, однако со специфическими последовательностями оператора связывается в 20 раз сильнее, чем с другими сайтами.

При наличии индуктора (аллолактозы) в клетке происходит его связывание аллостерическими центрами репрессора (рис. 53-А). Это приводит к изменению пространственной структуры молекулы репрессора, в результате чего сила его взаимодействия с оператором снижается примерно в тысячу раз. Реп-

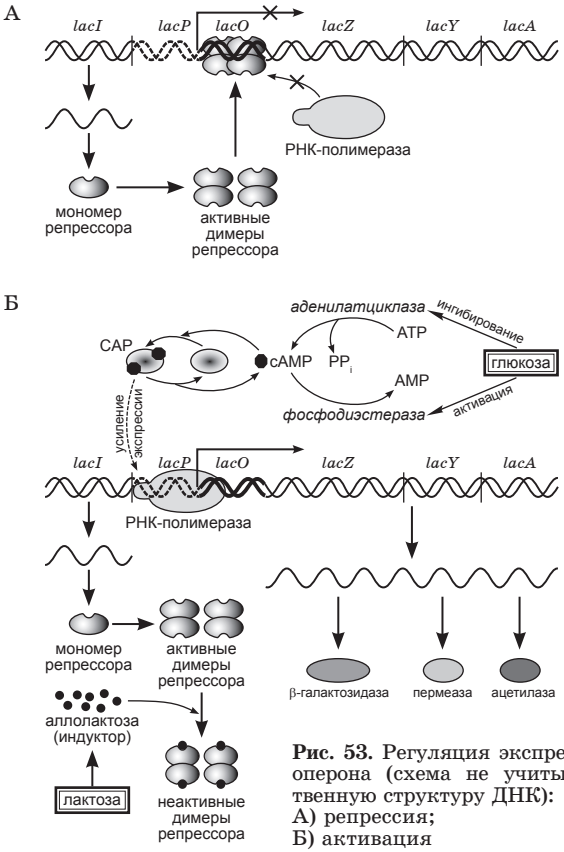


Рис. 53. Регуляция экспрессии лактозного оперона (схема не учитывает пространственную структуру ДНК):
А) репрессия;
Б) активация

рессор легко покидает оператор, смещаясь на другие участки ДНК, уступая место РНК-полимеразе. Свободные молекулы репрессора при этом не появляются. Так происходит индукция экспрессии *lac*-оперона.

Следует заметить, что отсутствие лактозы не выключает лактозный оперон полностью. В неиндуктивных условиях поддерживается так называемый базальный уровень экспрессии, который обеспечивает минимальную концентрацию белковых продуктов гена. Когда в среде появляется лактоза, β-галактозидаза гидролизует ее, а в результате побочной реакции осуществляется перенос галактозильного остатка на продукты гидролиза лактозы преимущественно с образованием аллолактозы и галактобиозы. Это имеет большое значение для индукции транскрипции *lac*-

оперона, поскольку сама лактоза оказывает лишь незначительный индуцирующий эффект.

Согласно механизму индукции, *lac*-оперон относится к оперонам, экспрессия которых контролируется за счет **негативной индуцибельной регуляции**. Однако активность экспрессии *lac*-оперона может усиливаться также за счет **позитивной индуцибельной регуляции.**

Позитивная индуцибельная регуляция

У ряда оперонов, кодирующих катаболитные гены, обнаружена способность связывать в области промотора особый регуляторный белок, который так и называют: **белок, активирующий катаболитный ген** (БАК или CAP — *catabolite activator protein*). CAP обеспечивает дополнительные сайты связывания с РНК-полимеразой и способствует более эффективной ее посадке на промотор. По сути, CAP можно рассматривать не как обязательный, а как усиливающий фактор индукции экспрессии некоторых оперонных генов.

Контроль активности *lac*-оперона через CAP зависит не от наличия лактозы, а от концентрации глюкозы в среде и в клетке. Сродство CAP с промотором зависит от концентрации cAMP в клетке (рис. 53-Б). Повышение концентрации cAMP способствует повышению сродства CAP с промотором и наоборот. Количество молекул cAMP определяется активностью двух ферментов: **аденилатциклаза** синтезирует cAMP из ATP, а **фосфодиэстераза** гидролизует фосфодиэфирную связь cAMP, превращая его в AMP. Активность обоих ферментов аллостерически регулируется глюкозой. Аденилатциклаза ингибируется глюкозой, а фосфодиэстераза, наоборот, — активируется. Таким образом, если концентрация глюкозы достаточна для питания клетки, то активность аденилатциклазы низкая, а фосфодиэстеразы — высокая. Поэтому при наличии глюкозы в клетке поддерживается низкая концентрация cAMP, следовательно, активации катаболитных генов, в том числе *lac*-оперона, не происходит. Снижение количества глюкозы приводит к противоположному результату: аденилатциклаза активируется, а активность фосфодиэстеразы, наоборот, угнетается. В результате концентрация cAMP увеличивается, и образуется комплекс cAMP–CAP, который связывается с промотором и усиливает транскрипцию.

Молекула cAMP является довольно важной регуляторной молекулой в живом мире. У животных cAMP выполняет роль вто-

ричного посредника в передаче гормонального сигнала (у растений возможность функционирования аденилатциклазной системы в процессах регуляции остается под вопросом). У бактерий cAMP является сигналом отсутствия глюкозы в среде, потому эту молекулу называют «сигналом голода» бактерий.

Двойная регуляция *lac*-оперона через репрессор и CAP обеспечивает тонкую чувствительность бактериальной клетки к источнику питания и позволяет оптимизировать метаболизм в соответствии с принципами максимальной экономии.

КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ТРИПТОФАНОВОГО ОПЕРОНА *E. COLI*

Негативная репрессибельная регуляция

Триптофановый оперон (*trp*-оперон) кодирует три фермента, участвующих в синтезе триптофана (рис. 54). Конечный продукт синтеза, катализируемого этими ферментами, — триптофан — угнетает транскрипцию *trp*-оперона. В его состав входят пять структурных генов *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* и *trpA*. Гены *trpE* и *trpD* кодируют субъединицы антранилат-синтазы, *trpC* — индолглицеролфосфат-синтазу, а *trpB* и *trpA* — субъединицы триптофан-синтазы. Между регуляторной частью *trp*-оперона (*trpP* и *trpO*) и структурными генами находится ген *trpL*, кодирующий лидерный пептид. Кроме промотора *trpP*, находящегося в левой части *trp*-оперона, перед генами *trpCBA* находится еще один неиндуцируемый внутренний промотор *trpP2*, обладающий низким сродством к РНК-полимеразе. Этот промотор обеспечивает низкий уровень экспрессии, который в 5 раз превышает активность экспрессии в репрессированном состоянии. В конце оперона через 36 п.н. после *trpA* находится ρ-независимый терминатор *trpt*, после которого примерно

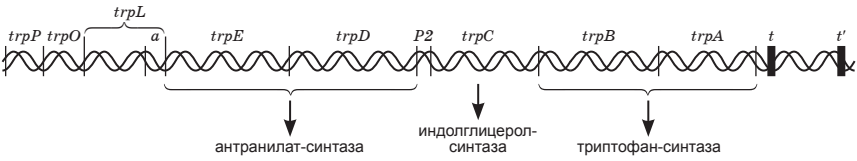


Рис. 54. Структура триптофанового оперона

через 250 п.н. расположен еще один терминатор *trpt'* с ρ-зависимостью. Активность *trp*-оперона контролируется с помощью репрессора и аттенуации. Ген *trpR*, **кодирующий репрессор (белок с молекулярной массой 12 кД)**, не является сцепленным с *trp*-опероном и находится в отдаленной области генома. Интересно, что активность *trpR*-гена находится под **аутогенным контролем**, то есть продукт гена способен репрессировать свой собственный синтез. По достижении определенной концентрации *trpR*-белок связывается с промотором собственного гена и значительно замедляет уровень транскрипции. Снижение количества репрессора вновь стимулирует его образование. Таким образом, концентрация регуляторного белка поддерживается на одном уровне.

Активный репрессор, связывающий оператор *trp*-оперона, имеет форму тетрамера. Связывание происходит в области промотора между нуклеотидами −23 и −3. В отсутствии триптофана оперон находится в активированном состоянии. Когда концентрация триптофана достигает определенной величины, аминокислота связывается с репрессором и повышает его сродство с оператором. Интенсивность экспрессии *trp*-оперона за счет негативной репрессибельной регуляции снижается в 70 раз по сравнению с активированным состоянием. Такой уровень репрессии очень низок, однако существует дополнительный механизм репрессии, который называют **аттенуация** (ослабление). За счет аттенуации активность *trp*-оперона падает еще примерно на порядок. Совместный вклад двух механизмов репрессии позволяет снизить активность экспрессии триптофанового оперона не менее чем в 700 раз. Такой уровень репрессии сопоставим с уровнем репрессии лактозного оперона (1000-кратное снижение активности).

Аттенуация

Механизм аттенуации возможен только для регуляции активности бактериальных генов, поскольку для его функционирования необходимо одновременное протекание процессов транскрипции и трансляции. Сам механизм построен таким образом, что он позволяет реагировать на концентрацию определенной аминокислоты в случае каждого конкретного оперона. Поэтому этим способом, как правило, регулируется экспрессия оперонов, включающих гены ферментов биосинтеза аминокислот. Успеш-

Аттенуация (от лат. attenuatio — уменьшение, ослабление). Механизм регуляции транскрипции генов, характерный только для бактерий. В основе механизма лежит способность преждевременной терминации транскрипции мРНК в области регуляторного участка гена — аттенуатора. Аттенуация возможна только при одновременном протекании процессов транскрипции и трансляции.

ное протекание или преждевременное прерывание транскрипции оперонов, регулируемых путем аттенуации, зависит от скорости движения РНК-полимеразы и рибосомы, или, иными словами, от соотношения скоростей синтеза РНК и белка. Поскольку интенсивность этих двух процессов зависит от наличия субстратов (нуклеотидов и аминокислот), то недостаток конкретных аминокислот будет способствовать отставанию рибосомы от РНК-полимеразы. Но чтобы понять, каким образом изменение скоростей движения полимеразных комплексов может влиять на преждевременную терминацию транскрипции, необходимо, прежде всего, четко представлять:

1) **особенности первичной структуры лидерного участка** *trpL*, причем не только транскрибируемой, но и некодирующей терминальной области;
2) **как наличие** инвертированных повторов (палиндромов) в молекуле РНК отражается на ее вторичной структуре;
3) **какое имеют строение и как функционируют** ρ-зависимый и ρ-независимый терминаторы.

Ген, кодирующий лидерный полипептид, состоит примерно из сотни пар нуклеотидов. После инициирующего кодона **AUG** (Met) **расположены еще 13 смысловых кодонов, а за ними следует** нонсенс кодон **UGA. Два кодона из четырнадцати (10 и 11)** кодируют триптофан.

Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Trp	Trp	Arg	Thr	Ser
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**

Важное значение для процесса аттенуации имеют особенности первичной структуры последовательности лидерного гена, расположенной после смысловой части. Терминальную некодирующую область лидера называют **аттенуатором**. Данная последовательность содержит четыре области (1, 2, 3, 4), представляющие собой инвертированные повторы, способные к спариванию. Области, соответствующие друг другу комплементарно, составляют следующие пары: 1–2, 2–3, 3–4. Синтезируемая РНК может об-

разовывать при соответствующих условиях две шпильки за счет областей 1–2 и 3–4 (рис. 55-А) или одну петлю, в образовании которой участвуют области 2 и 3 (рис. 55-Б). После области 4 в молекуле РНК находится участок, состоящий из 8 остатков уридина. Если РНК приобретает первый вариант вторичной структуры, то участок 3–4 вместе с полиуридиновой последовательностью приобретает вид и свойства ρ-независимого терминатора (шпилька и U_8), поэтому транскрипция прерывается (рис. 56-А). Если же спариваются участки 2 и 3, то область 4 находится в одноцепочечном состоянии, а петля (2–3) находится на некотором удалении от U_8 (рис. 56-Б). В этом случае аттенуатор не воспринимается РНК-полимеразой как терминатор и синтез РНК не прерывается, пока РНК-полимераза не достигнет терминатора *trpt* или *trpt'*.

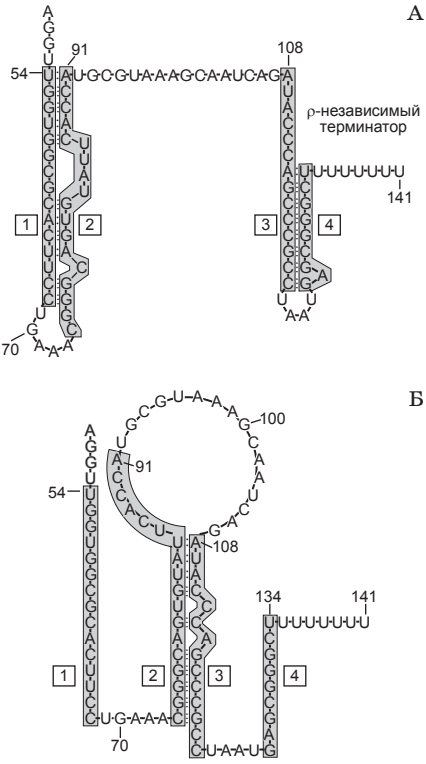


Рис. 55. Нуклеотидная последовательность аттенуатора триптофанового оперона и две возможные вторичные структуры, которые принимает лидерная область при спаривании определенных областей аттенуатора

Поскольку в состав лидерного пептида входят два триптофановых остатка подряд, его успешный синтез зависит от наличия триптофана. Чувствительность механизма аттенуации зависит от расстояния между кодонами, кодирующими триптофан, и аттенуатором, а также от скорости движения рибосомы и ее положения на РНК относительно РНК-полимеразы. При наличии триптофана синтез лидерного полипептида осуществляется без задержек. Рибосомы движутся по РНК на некотором удалении от РНК-полимеразы, причем рибосома переходит в область 2 еще до того, как РНК-полимераза заканчивает транскрибирование области 4. Область 3 на момент окончания транскрибирования

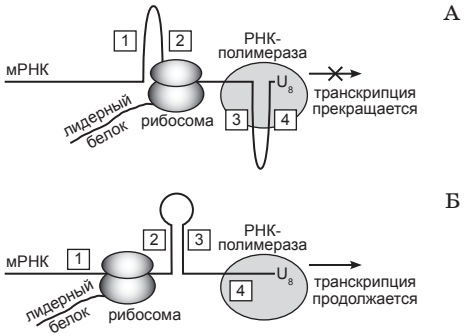


Рис. 56. Механизм аттенуации (описание в тексте)

области 4 остается свободной, поэтому области 3 и 4 имеют возможность спариться, образуя шпильку перед полиуридиновым участком U_8 (рис. 56-А). Это является сильным сигналом для прекращения транскрипции. В отсутствие или при недостаточном количестве триптофана синтез лидера тормозится, когда рибосомы достигают триптофановых кодонов. Движение рибосом задерживается ввиду невозможности продолжать синтез пептида из-за отсутствия субстрата. В результате такой задержки рибосомой изолируется только область 1, а область 2 спаривается с областью 3 еще до того, как синтезируется область 4. Область 4 остается в одноцепочечной форме, поэтому РНК-полимераза проходит аттенуатор, не воспринимая его как ρ-независимый терминатор, и продолжает транскрипцию оперона (рис. 56-Б).

Если создать условия голодания по некоторым аминокислотам, которые кодируются лидерным геном до триптофанов, например по лизину (см. последовательность лидерного пептида на с. 140), то остановка рибосомы будет способствовать спариванию участков 1 и 2. Следовательно, при занятой области 2 будет возможно спаривание 3 и 4 участков. Таким образом, в условиях лизинового голодания транскрипция *trp*-оперона будет останавливаться на аттенуаторе. Но положение рибосомы в момент задержки окажется такое, что РНК в области аттенуатора будет формировать ρ-независимый терминатор, который стимулирует прекращение транскрипции. Подобный эффект можно получить при недостатке всех аминокислот, которые включаются в полипептид до триптофана вплоть до глицина. Следовательно, голодание по данным аминокислотам будет имитировать условия достаточного снабжения триптофаном. Отсутствие самого триптофана

в этих условиях не будет никоим образом влиять на аттенуацию. Однако недостаток аргинина, который включается в лидерный полипептид сразу после двух триптофанов, окажет действие, характерное для недостатка триптофана: отсутствие аргинина будет стимулировать транскрипцию *trp*-оперона даже при наличии триптофана. В данном случае репрессия активности *trp*-оперона не превысит 70-кратного уровня, так как исключается аттенуация.

Синтез лидера имеет исключительно регуляторное значение. Сам пептид нигде не используется и расщепляется сразу после синтеза. Лидерный полипептид практически невозможно идентифицировать in **vivo вследствие его быстрого разрушения.**

АУТОГЕННЫЙ КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ

На примере *trpR*-гена, который кодирует репрессор триптофанового оперона, мы говорили об аутогенном контроле экспрессии генов на уровне транскрипции. Аутогенная регуляция может также осуществляться и на уровне трансляции. Этим способом регулируются некоторые бактериальные гены, кодирующие рибосомные белки.

Рибосомные белки кодируются небольшим количеством оперонов. В геноме *E. coli* обнаружены две группы сцепленных оперонов, кодирующих рибосомные белки. Первая группа содержит 4 оперона: *str*, *spc*, **S10**, α, а вторая — два: **L11**, *rif*. Кроме рибосомных белков, *str*-оперон кодирует также факторы элонгации **EF-Tu и EF-G, а** *rif*-оперон — β- и β′-субъединицы РНК-полимеразы. Все шесть указанных оперонов отличаются сходным свойством — синтез ряда продуктов оперонов контролируется аутогенным способом, то есть белком. Причем регуляция осуществляется на уровне трансляции, поэтому белки, кодируемые одной мРНК, могут синтезироваться с разной скоростью. Кроме того, синтез белков, транслируемых с одного транскрипта, нередко регулируется одним продуктом. Однако важно отметить, что синтез контролируется одним белком только в том случае, если все подконтрольные продукты необходимы в эквимолярных количествах.

Например, оперон *spc* кодирует 10 рибосомных белков. Трансляция семи белков (выделены жирным шрифтом) регулируется одним из них — белком **S8, который является продуктом гена** *rpsH*.

Оперон *spc*:

гены	*rplN*	*rplX*	*rplE*	*rpsN*	*rpsH*	*rplF*	*rplR*	*rpsE*	*rplO*	*rpmD*
продукты	**L14**	**L24**	**L5**	**S14**	**S8**	**S6**	**L18**	**S5**	**L15**	**L30**

Оперон *str* кодирует 2 рибосомных белка и факторы элонгации. Белок **S7 контролирует свой собственный синтез, а также** синтез фактора элонгации **EF-Tu.**

Оперон *str*:

гены	*rpsL*	*rpsG*	*fusA*	*tufA*
продукты	**S12**	**S7**	**EF-Tu**	**EF-G**

Синтез всех подобных белков зависит от содержания рибосомных РНК. По мере синтеза белки взаимодействуют с вновь синтезированными рРНК, образуя субъединицы рибосом. Если вновь синтезированные белки не находят возможности включаться в рибосомы, количество несвязанного белка в клетке увеличивается, и это является причиной репрессии трансляции определенного набора белков. Механизм регуляции, по-видимому, связан с предотвращением связывания рибосомы с инициирующими участками мРНК. В ряде случаев были обнаружены сайты связывания белков, обеспечивающих аутогенный контроль синтеза.

Например, оперон **L11 содержит два гена** *rplK* и *rplA*, кодирующие соответственно белки **L11 и L1. Синтез обоих продуктов** контролируется **L1. Было обнаружено, что белок L1 связывается** с мРНК поблизости от инициирующего кодона. Это затрудняет посадку рибосомы на РНК и подавляет таким образом трансляцию.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ГЛАВЕ 2

Топологическая регуляция экспрессии бактериальных генов

1. Почему механическое напряжение хроматина влияет на интенсивность экспрессии генов?
2. Что такое отрицательные и положительные супервитки?
3. Какой механизм лежит в основе топологической регуляции экспрессии бактериальных генов?
4. Как функционирует гираза?

Регуляции транскрипции оперонных генов

1. Как осуществляются негативный и позитивный контроли экспрессии генов?
2. Чем отличаются индуцибельные и репрессибельные опероны?
3. Какое значение в регуляции оперонных генов имеют низкомолекулярные соединения?
4. По какому типу осуществляется регуляция экспрессии лактозного оперона *E. coli*?
5. Какое значение имеет белок, активирующий катаболитный ген (CAP)?
6. Для чего нужен двойной контроль экспрессии лактозного оперона?
7. Почему активность лактозного оперона зависит от уровня глюкозы в среде?
8. В чем заключается регуляторная роль cAMP?
9. Как контролируется экспрессия триптофанового оперона *E. coli*?
10. В чем состоит сущность механизма аттенуации?
11. Как структура лидерной последовательности триптофанового оперона связана с механизмом аттенуации?

Аутогенный контроль экспрессии рибосомных белков

1. Что такое аутогенный контроль экспрессии? Приведите примеры.

Глава 3

РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У ЭУКАРИОТ

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

Геном эукариот превосходит по размеру и значительно более сложно устроен, чем прокариотический геном. Соответственно, более сложной является и регуляция генной активности у эукариот. Существует ряд принципиальных различий между эукариотами и прокариотами в организации их генома. Наиболее важными отличиями эукариотического генома можно назвать такие:

1) **наличие гистоновых белков, участвующих в структурировании** хроматина;
2) **возможность высокого уровня компактизации;**
3) **присутствие огромного количества повторяющихся некодирующих** последовательностей, которые составляют основу плотно упакованной части хроматина — **гетерохроматина**.

У многоклеточных организмов в каждой отдельной клетке активна только лишь небольшая часть генов (примерно 7 %), а остальная находится в репрессированном состоянии. В отличие от прокариот, большинство молчащих генов в геноме эукариот находится в области гетерохроматина — участке генома с высокой степенью компактизации. Эти гены инактивированы благодаря недоступности их промоторов для регуляторов и ферментов (у прокариот практически все промоторы доступны). Формирование гетерохроматина регулируется разными механизмами, в основе которых лежит ковалентная модификация нуклеотидов ДНК (метилирование цитозина) и гистоновых белков. Модифицированные гистоны и нуклеотиды формируют участки для связывания соответствующих структурных белков, которые способны к кооперативному взаимодействию друг с другом. В результате этого взаимодействия образуется плотно упакованная трехмерная структура хроматина. **Образование обширных мультимерных белковых комплексов является основой формирования гетерохроматина.**

В противоположность гетерохроматину, **эухроматин**, представленный участками декомпактизованного хроматина, имеет структуру, позволяющую непосредственный контакт промоторов с РНК-полимеразами и модуляторами активности. Инициация транскрипции эухроматиновых генов осуществляется с помощью транскрипционных факторов преимущественно путем позитивной и негативной регуляции в равной мере, тогда как у прокариот регуляция активности оперонов, большей частью, имеет негативный характер. Промоторы многих эукариотических генов взаимодействуют и с активаторами, и с репрессорами.

Сравнивая регуляцию экспрессии генов у разных групп организмов, нельзя не отметить то, что эукариоты, благодаря способности образовывать гетерохроматин, используют общие механизмы репрессии генов. Если у прокариот практически каждый оперон имеет свой индивидуальный белок-репрессор, то у эукариот разные группы генов репрессируются за счет сходных механизмов, основным из которых является компактизация определенных участков хроматина. У многоклеточных эукариот в значительной степени проявляются механизмы **эпистатического взаимодействия генов**. Это возможно ввиду наличия в геноме эукариот огромного количества регуляторных генов, активация или репрессия которых приводит к широкомасштабным изменениям в экспрессии генов. Экспрессия одного регуляторного гена может привести к синтезу ключевого регулятора активности хроматин-ремоделирующего комплекса. Инициированная хроматин-ремоделирующим комплексом модификация структуры хроматина может привести к глобальным изменениям в наборе экспрессирующихся генов.

Активация эукариотических генов осуществляется специализированными транскрипционными факторами, синтез которых стимулируется в результате воздействия внешних и внутренних стимулов. То есть, транскрипционные факторы (по крайней мере, большинство из них) не всегда присутствуют в клетке, или их количество варьирует в широких пределах в зависимости от условий.

Эпистаз (от греч. epistasis — остановка, препятствие). Один из типов взаимодействия генов, при котором аллели одного гена подавляют проявление аллелей других генов. Также взаимодействие двух неаллельных генов, при котором один из них (эпистатический) влияет (или даже подавляет) фенотипическое проявление другого (гипостатического) гена.

Стратегия регуляции генной экспрессии эукариот, по-видимому, оправдана с точки зрения оптимизации процесса регуляции. Действительно, использование общих механизмов репрессии можно расценивать как более экономный и эффективный способ по сравнению с необходимостью синтезировать огромное количество индивидуальных белков-репрессоров для 93 % генов. Логичнее поддерживать работоспособность сигнальной системы, приводящей к активации и/или синтезу набора транскрипционных факторов для ограниченного количества генов. Такие особенности регуляции генной экспрессии эукариот как обширные эпистатические взаимоотношения генов, а также механизмы глобальной репрессии, определяют возможность поддерживать в клетках экспрессию различного набора генов, что лежит в основе процессов дифференциации клеток.

Инициация экспрессии генов у эукариот — чрезвычайно сложный процесс. В нем задействованы сложные **системы рецепции и внутриклеточной трансдукции сигналов**. Процесс трансдукции сигнала, как правило, многоэтапный и обладает свойством усиления, благодаря которому незначительные изменения во внешней или внутренней среде могут привести к существенным физиолого-биохимическим сдвигам в организме.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ХРОМАТИНА

Хроматин интерфазного ядра соматических клеток выглядит неоднородным. Оптически более плотная область соответствует гетерохроматину, менее плотная — эухроматину. Высокая плотность гетерохроматиновой области определяется его конденсированным состоянием, которое сохраняется на протяжении всей интерфазы. Эухроматин приобретает высокую плотность только во время митоза, когда становится неактивным. Радиоавтографический анализ с применением меченого предшественника РНК показывает, что в интерфазном ядре метка локализуется только в эухроматине, то есть гетерохроматин не участвует в транскрипции. Чрезвычайно высокая степень компактизации гетерохроматина затрудняет образование репликационной вилки в этой области генома, поэтому ДНК гетерохроматина реплицируется в позднем периоде синтетической фазы клеточного цикла.

Значение декомпактизованного хроматина для синтеза РНК достаточно наглядно было продемонстрировано в классических экспериментах на политенных хромосомах. Эти структуры образуются в результате многократной репликации, поэтому значительно толще обычных хромосом и хорошо видны на электронных микрофотографиях, а следовательно, удобны для микроскопических исследований. К примеру, в слюнных железах личинок дрозофилы политенные хромосомы состоят из 1024 параллельно расположенных хроматид. Плотность петель политенных хромосом неоднородна по всей длине. Менее плотные участки соответствуют декомпактизованному хроматину и называются пуфами. Кратковременное введение в клетку меченного [^{3}H]-уридина с последующими микроскопированием и радиоавтографией показывает, что именно в пуфах наблюдается наибольшая активность транскрипции. Таким образом, декомпактизация хроматина — важное условие для инициации синтеза РНК.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ И РОЛЬ ГЕТЕРОХРОМАТИНА

Эволюционно гетерохроматин возник параллельно с увеличением размера генома эукариот. Массированная инвазия эукариотических геномов геномными паразитами, способными к амплификации, послужила причиной значительного увеличения размера геномов. Отдельные участки генома эукариот, приобретенные ими вследствие инвазии — транспозоны и ретротранспозоны, — до сих пор не утратили способности к перемещению по геному. Например, в геноме человека количество копий ретротранспозона L1 достигает 100 тысяч, а число копий, способных к перемещению, составляет около 30–60 тысяч. Транспозоны и ретротранспозоны обычно рассеяны по геному, но в отдельных участках хромосом они могут концентрироваться. В целом подвижные элементы обычно составляют 10–30 % от общей массы ДНК. Геном человека состоит, по крайней мере, на 35 % из эволюционно древних мобильных элементов, а в растительном геноме процент транспозонов еще больший.

Мобильные генетические элементы имеют специальную структуру, которая позволяет им перемещаться, поэтому долгое время они рассматривались как представители так называемой эгоистичной ДНК, целью которой является паразитирование и размножение в геноме хозяина. Перемещение мобильных элементов — достаточно редкое событие, хотя частота перемещений может значительно варьировать. Так, у бактерий один акт перемещения удается зарегистрировать примерно на 10 000 – 1 000 000 клеток. У многоклеточных эукариот частоты транспозиций настолько малы, что их трудно идентифицировать и оценить. Под влиянием особых внешних воздействий частота перемещений может измениться на несколько порядков.

Поскольку большое количество транспозонов и их дальнейшее размножение может подавить геном хозяина, инвазия геномными паразитами является нежелательным и даже губительным явлением для организма. Поэтому эукариоты в процессе эволюции выработали разнообразные механизмы защиты от чужеродной ДНК. Одним из наиболее мощных механизмов является ковалентная модификация и последующая компактизация ДНК. Эти события приводят к невозможности экспрессии уплотненных участков генома и размножения находящихся там мобильных элементов, но, вместе с тем, позволяют осуществлять процесс репликации ДНК.

После возникновения механизмов инактивации ДНК эукариоты «научились» использовать избыточный «чужеродный» генетический материал в эпигенетической регуляции генной экспрессии (через стабильную репрессию отдельных областей генома путем его компактизации). Эволюция соответствующих белков, обеспечивающих компактизацию хроматина, привела к возникновению единой структурно-функциональной ДНК-белковой структуры, получившей название гетерохроматин. Второй важной функцией гетерохроматина, помимо эпигенетической регуляции, является его участие в процессах деления клетки.

Интересно, что в ряде случаев можно наблюдать способность эукариотических клеток использовать мобильность транспозонных элементов. Эти полезные свойства проявляются у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Клетки этого организма не имеют теломеразного механизма, защищающего линейные молекулы ДНК от укорочения в процессе репликации. Данную функцию выполняют транспозоны, которые достраивают 3′-концы ДНК, предотвращая ее укорочение и потерю важных генов. Также существуют данные об участии транспозонных элементов в «залечивании» двухнитевых разрывов ДНК. В этой связи предполагается, что естественному отбору, наряду с генами хозяина, подвергались и «потомки» геномных паразитов, активность которых была приспособлена для выполнения полезных функций в клетке хозяина.

Наиболее важным следствием образования гетерохроматина, по-видимому, следует считать его использование в качестве эпигенетического фактора, поскольку это позволяет поддерживать в разных клетках экспрессию различного набора генов, сохраняя при этом первичную структуру ДНК. Таким образом, массовое внедрение генетических паразитов в геном простейших ядерных организмов и развитие механизмов защиты от чужеродной ДНК у ранних эукариот привели к ряду важных эволюционных событий, которые способствовали значительному прогрессу в эволюции эукариот. **Эволюционное формирование гетерохроматина можно считать одним из наиболее важных ароморфозов в естественной истории, так как это событие неразрывно связано с развитием процессов эпигенетической регуляции, дифференциации клеток и, наконец, возникновением многоклеточных организмов.**

ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ КОНДЕНСАЦИЯ ХРОМАТИНА

Известно, что большая часть ДНК эукариот, в области которой, как правило, не обнаруживается транскрипционная активность (так называемый **конститутивный гетерохроматин**), содержит серии сравнительно коротких многократно повторяющихся последовательностей сателлитной ДНК (длина таких повторов составляет от нескольких пар нуклеотидов до нескольких десятков) и средних повторяющихся последовательностей, родственных транспозонным элементам и ретровирусам. Обычно конститутивный гетерохроматин соответствует центромерам и перицентральным районам хромосом.

Ранние общепринятые взгляды о том, что конститутивный гетерохроматин абсолютно неактивен, были несколько изменены благодаря тому, что современные молекулярно-биологические методы позволили зарегистрировать транскрипцию в области сателлитной ДНК генома, в частности, у человека. Такая активность в большинстве случаев приводит к образованию структурных и регуляторных РНК, участвующих в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов (см. разделы «МикроРНК» и «Молекулярный механизм стрессовых реакций»).

Часть ядерного генома эукариот на протяжении жизненного цикла организма может находиться в состоянии и гетерохроматина, и эухроматина. Эти участки не содержат тандемных повторов, соответствующих сателлитной ДНК, и в конденсированном состоянии они представляют собой **факультативный гетерохроматин**, то есть гетерохроматин, который содержит гены и потенциально может быть транскрипционно активным. Количество и расположение факультативного гетерохроматина в хромосомах варьирует в зависимости от возраста и типа клеток. Наименьшее его количество отмечено в эмбриональных клетках, но по мере специализации клеток фракция факультативного гетерохроматина увеличивается. Собственно говоря, состояние именно этой части генома определяет различия между специализированными клетками многоклеточного организма.

Формирование факультативного гетерохроматина неразрывно связано с **дифференциацией клеток**. Для осуществления процессов дифференциации возникает необходимость в стабильной репрессии отдельных участков генома. Только после инактивации конкретных участков генома возможно образование специализированных клеток. Регуляция генной активности путем устойчивой репрес-

сии называется **эпигенетической регуляцией** (от **эпигенез** — эмбриональное развитие организмов путем последовательных новообразований).

Эпигенез — учение о зародышевом развитии организмов как о процессе, осуществляемом путем последовательных новообразований. Термин «эпигенез» был предложен У. Гарвеем в 1651 году. С точки зрения молекулярной биологии эпигенез обеспечивается путем последовательных преобразований пространственной структуры хроматина ядра, в результате которых отдельные участки генома подвергаются устойчивой репрессии. В процессе дифференциального деления в двух дочерних клетках репрессируются разные участки генома, поэтому данные клетки приобретают разнокачественные свойства.

Гетерохроматин вовлекается в эпигенетическую репрессию отдельных участков генома и даже целых хромосом (например, одна из Х-хромосом самок млекопитающих). Способность гетерохроматина «заглушать» гены известна под явлением **эффекта положения генов,** или **PEV** (***position effect variegation*** — мозаичный эффект положения). Репрессию генов путем конденсации участков хроматина называют также **транскрипционной репрессией генов**, или **TGS** (***transcriptional gene silencing***).

Следует отметить, что термин *silencing* (от англ. «*silence*» — тишина, безмолвие, молчание) широко употребляется в англоязычной литературе при обозначении репрессии генов, чаще всего — применительно к эпигенетической репрессии. Причем выражение *gene silencing* (сайленсинг генов) является даже избыточным, поскольку сам термин *silencing* подразумевает то же самое.

Гены, локализованные в эухроматине, также могут быть инактивированы, однако, в отличие от **TGS, репрессия таких генов** обеспечивается специфическими белковыми факторами, для которых мишенью их воздействия являются промоторы конкретных генов. В то же время, **репрессия путем образования гетерохроматина обеспечивается широкомасштабными модификациями компонентов хроматина и представляет собой глобальный механизм репрессии генов,** то есть этот механизм пространственно выходит далеко за рамки промоторов генов.

Дифференциация, дифференцировка — возникновение различий в первоначально единой или состоящей из одинаковых элементов системе. У многоклеточных организмов дифференциация лежит в основе морфогенеза, в процессе которого образуются специализированные клетки, ткани и органы. Как правило, это явление имеет необратимый характер.

Общие принципы формирования хроматина были описаны в разделе «Строение и компактизация хроматина эукариот». Первый уровень организации хроматина — нуклеосомный — является важным не только для компактного расположения хроматина в ядре, но также и для транскрипционной активности. Состояние нуклеосомных гистонов (их ковалентная модификация) — это один из главных факторов, от которого зависит уровень компактизации, а соответственно, и активность хроматина. Гистоновые хвосты участвуют в формировании поверхности нуклеосомы, которая узнается и связывается специфическими регуляторными и структурными белками. В зависимости от состояния гистонов, определяющих тип взаимодействующих с нуклеосомами белков, формируются уплотненные участки гетерохроматина или декомпактизованные области транскрипционно активного эухроматина. Для гетерохроматиновых областей характерна высокая степень деацетилирования и метилирования гистонов, тогда как для активного эухроматина наблюдается обратная зависимость.

Структурно-функциональное состояние хроматина зависит также от метилирования самой ДНК. Причем метилированные участки ДНК соответствуют, как правило, неактивному гетерохроматину. Степень различных модификаций гистоновых хвостов и ДНК находятся в строго определенных взаимоотношениях. (Значение этих модификаций для поддержания уровня экспрессии генов и наследования дифференцированного состояния клеток будет подробно обсуждаться в разделах «Гистоновый код» и «Метилирование ДНК».) Вместе с тем, самым главным фактором, от которого зависит состояние хроматина, является, по-видимому, нуклеотидная последовательность ДНК. Этот вопрос во многих отношениях еще не исследован, однако известно, например, то, что наличие повторяющихся инвертированных последовательностей воспринимается регуляторными системами ядра в качестве ключевого сигнала для метилирования ДНК и последующего формирования гетерохроматина. Не исключено, что для узнавания инвертированных и прямых повторов бóльшее значение имеет вторичная структура, которая формируется благодаря взаимодействию ближайших комплементарно соответствующих участков одной цепи ДНК. Значительно сложнее исследовать и понять механизм конденсации факультативного гетерохроматина. Регуляция этого процесса, по-видимому, должна вовлекать белки, узнающие специфические участки генома. Но об этом пока мало что известно.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРИЗНАКИ СОСТОЯНИЯ ХРОМАТИНА

Эухроматин и гетерохроматин имеют значительные отличия по составу белков. Эухроматиновые белки способствуют поддержанию декомпактизованного состояния, что дает возможность промоторам генов физически контактировать с транскрипционными факторами и РНК-полимеразами. Гетерохроматиновые белки, наоборот, делают хроматин очень плотно упакованным, предотвращая, таким образом, проникновение регуляторов транскрипционной активности и ферментов в зону гетерохроматина. Поскольку отдельные участки хроматина избирательно приобретают соответствующее состояние, можно утверждать, что ДНК несет соответствующие маркеры, которые узнаются теми или иными структурно-функциональными белками. На любом участке генома на протяжении всего клеточного цикла хроматин не теряет нуклеосомной структуры. Поэтому не удивительно, что **маркеры состояния хроматина располагаются не только на самой ДНК, но и на нуклеосомных гистонах**.

Уровень компактизации и функциональной активности хроматина коррелирует с ковалентной модификацией коровых гистонов и ДНК. Это объясняется тем, что модифицированные аминокислотные остатки гистонов и нуклеотиды участвуют в формировании определенной поверхности, которая узнается различными негистоновыми регуляторными и структурными белками. Взаимодействие таких белков с гистонами и ДНК способствует поддержанию определенной структуры хроматина и, соответственно, его функциональной активности.

Наибольшее значение для формирования структуры хроматина имеют:

— метилирование цитозина;
— ацетилирование и метилирование лизиновых остатков в гистонах H3 и H4.

Интерпретировать значение метилирования цитозина намного легче. Как правило, высокая степень метилирования цитозиновых нуклеотидов в ДНК характерна для гетерохроматиновых участков, тогда как в эухроматине ДНК преимущественно деметилирована.

В отличие от ДНК, гистоны подвергаются более разнообразным модификациям. Далеко не все из них имеют принципиальное значение для поддержания структуры хроматина. Тем не

менее, практически все модификации связаны с определенными функциями, такими как участие в ремоделировании хроматина, клеточном делении и транкрипционной активности.

Одними из основных маркеров состояния хроматина являются ацетилированные остатки лизинов в молекулах коровых гистонов. Высокая степень ацетилирования гистоновых хвостов характерна для активных районов генома (эухроматина), тогда как в гетерохроматине гистоны, наоборот, деацетилированы. Значительное количество ядерных белков, участвующих в поддержании активного состояния участков хроматина, имеют структурный элемент, получивший название **бромодомен**. Этот домен необходим для белок-белковых взаимодействий, которые осуществляются через ацетилированные лизиновые остатки гистонов. С другой стороны, ацетилирование предотвращает взаимодействие хроматина с гетерохроматиновыми белками.

Гетерохроматиновые белки, которые участвуют в репрессии генов посредством компактизации хроматина, связываются с нуклеосомами через метилированные лизины. Для этих взаимодействий у гетерохроматиновых белков служат особые структуры — **хромодомены**. Типичным сайтом связывания наиболее распространенного гетерохроматинового белка HP1 служит лизин 9 в гистоне H3 (H3/me**K9**). **Однако принцип формирования** гетерохроматина у разных организмов может отличаться. Причем не обязательно эти различия обнаруживаются у эволюционно отдаленных видов. Так, у многих видов животных, растений и грибов удалось идентифицировать белок HP1 и показать, что он действительно связывается с H3/me**K9**. **Вместе с тем, у двух** видов дрожжей, представителей двух разных родов, *Schizosaccharomyces pombe* и *Saccharomyces cerevisiae*, гетерохроматин образуется по-разному. У делящихся дрожжей (*S. pombe*) обнаружен механизм с участием HP1, а у почкующихся (*S. cerevisiae*) — нет. У *S. cerevisiae* формирование гетерохроматина инициируется деацетилированием гистона H4, с которым взаимодействуют структурные белки: фактор **RAP1 и тетрамерный** белковый комплекс **SIR (подробнее см. в разделе «Репрессия** хроматина»).

В отличие от ацетилирования как маркера активного состояния хроматина, метилирование гистонов не всегда однозначно сопряжено с репрессией. Некоторые метилированные сайты необходимы, наоборот, для активации генов. **Несмотря на то, что отдельные специфические модификации характерны для под-**

держания того или иного состояния хроматина, следует все же рассматривать комбинации модификаций, поскольку это может предоставить больше значимой информации о роли модификаций в формировании хроматина. Многочисленные данные позволяют в настоящее время утверждать, что специфические модификации гистонов, а точнее — их комбинации, соответствуют своеобразному коду, который определяет физическое и функциональное состояние отдельных участков хроматина. Этот код называют **гистоновым. Гистоновый код** необходим не только для поддержания состояния отдельных областей хроматина, но также и для наследования этого состояния в процессе митоза.

Более подробно значение модификаций гистонов и нуклеотидов для процессов формирования структуры хроматина, а также для поддержания механизмов клеточной памяти будет описано в разделе «Значение и взаимодействие гистоновых модификаций» и «Метилирование ДНК».

ИНАКТИВАЦИЯ Х-ХРОМОСОМЫ В КЛЕТКАХ ЖЕНСКОГО ОРГАНИЗМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Классическим примером избирательной конденсации хроматина является конденсация одной Х-хромосомы в соматических клетках женского организма млекопитающих. Известно, что двойная доза продуктов Х-хромосомы является летальной для организма. Поэтому существует механизм, обеспечивающий переход одной из Х-хромосом в неактивное состояние путем ее конденсации. Зигота, дающая начало женскому организму, имеет две активные Х-хромосомы, но на ранней стадии эмбрионального развития (через несколько первых делений) одна Х-хромосома образует неактивный гетерохроматин. Вероятность того, что отцовская или материнская Х-хромосома останется активной, равна 50 %. Последующие поколения клеток строго наследуют конденсированное состояние той Х-хромосомы, которая изначально перешла в состояние гетерохроматина. В итоге половина клеток женского организма имеет конденсированную Х-хромосому, полученную от матери, а вторая половина — от отца.

Механизм конденсации Х-хромосомы по своей динамике напоминает процесс кристаллизации, при котором определенная точка Х-хромосомы является центром нуклеации, а от нее кон-

денсированное состояние распространяется вдоль всей хромосомы. В экспериментах с мутантными особями, у которых одна из Х-хромосом была присоединена к концу аутосомы, было показано, что процесс конденсации, инициирующийся в Х-хромосоме, распространяется и на присоединенную к ней аутосому. Таким образом, конденсация Х-хромосомы несколько отличается от формирования гетерохроматина в любой другой области генома, поскольку данный процесс обязательно распространяется на всю Х-хромосому. С другой стороны, конденсированная Х-хромосома обладает многими характерными признаками гетерохроматина. Главным образом, это высокая степень метилирования цитозина, низкий уровень ацетилирования гистонов и наличие гетерохроматиновых белков, связанных с **Н3/meК9.**

Возможно, что еще не все компоненты, входящие в состав конденсированной Х-хромосомы, идентифицированы, но известно, что в поддержании ее плотноупакованной структуры, помимо белков, участвует также **высокомолекулярная РНК Xist**, которая обнаруживается исключительно в инактивированной Х-хромосоме. По-видимому, транскрипт Xist **избирательно взаимодействует** с Х-хромосомой (но не с другими), способствуя ее конденсации.

Ген, кодирующий Xist, **локализуется в Х-хромосомах и имеет** длину около 25 т.п.н. (рис. 57). Экспрессия *Xist* зависит от состояния **Х-инактивационного центра — Xic** (*X-inactivation centre*). Данная структура получила это название, поскольку его удаление приводит к конститутивной экспрессии гена Xist и последующей репрессии Х-хромосомы. В Х-инактивационном центре на расстоянии 15 т.п.н. от 3′ конца гена *Xist* локализу-

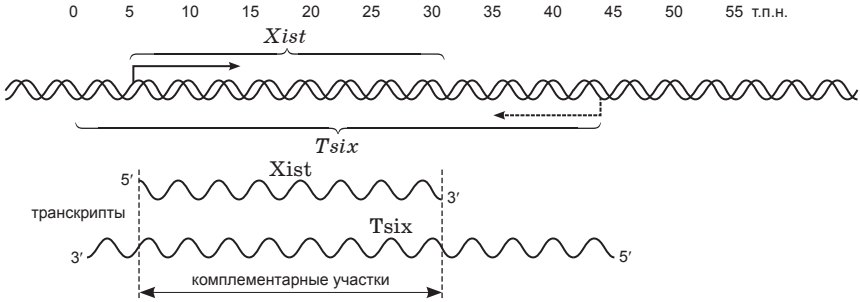


Рис. 57. Локализация генов, кодирующих РНК Xist и Tsix, в Х-инактивационном центре и направления их считывания (по Lee J.T., Davidow L.S., Warshawsky D., 1999 с изменениями)

ется 5′ конец другого гена — *Tsix*, кодирующего РНК длиной 40 т.н. Считывание Tsix происходит в противоположном (относительно Xist) направлении и полностью захватывает локус Xist. Таким образом, часть транскрипта Tsix является комплементарной РНК Xist.

Экспрессия генов *Xist* и *Tsix* изменяется в клетках по мере развития. На протяжении нескольких первых делений зиготы женских организмов наблюдается биаллельная (то есть в обоих Х-хромосомах) экспрессия генов *Xist* и *Tsix* на низком уровне. По мере дифференциации клеток экспрессия *Tsix* становится моноаллельной, причем она ассоциируется с будущей активной Х-хромосомой. В этой хромосоме репрессируется активность гена *Xist*. В другой Х-хромосоме активность *Tsix* затухает, но одновременно повышается активность *Xist*. Х-инактивация, сопровождающая процесс дифференциации, завершается тем, что будущая неактивная Х-хромосома покрывается Xist-транскриптами и конденсируется, что приводит к ее инактивации. В активной Х-хромосоме экспрессия *Tsix* сохраняется только в процессе Х-инактивации, а затем исчезает. В дифференцированных клетках экспрессия гена *Tsix* не обнаруживается.

Кроме этого, следует отметить существенное отличие в локализации транскриптов Xist и Tsix. Если Xist транскрипты покрывают всю неактивную Х-хромосому, то локализация транскриптов Tsix строго ограничена районом Х-инактивационного центра на любом этапе дифференциации.

Интересно, что в клетках мужских организмов также изменяется интенсивность экспрессии *Xist* и *Tsix*. В недифференцированных клетках, как и у женских организмов, проявляется низкая скорость экспрессии обоих генов. Процесс дифференциации сопровождается исчезновением экспрессии *Xist*, но при этом поддерживается активность *Tsix*. Наконец, во взрослых клетках активность обоих генов исчезает. Таким образом, активность *Tsix* характерна только для недифференцированных клеток развивающегося организма любого пола.

Механизм инактивации гена *Xist* и значение в этом процессе гена *Tsix* окончательно не выяснены. В настоящее время предполагаются три гипотетических модели:

1) Tsix РНК спаривается с Xist транскриптом и маскирует его функциональные домены;
2) транскрипты Tsix вызывают изменения структуры хроматина, которые сопровождаются модуляцией активности *Xist*;

3) экспрессия *Xist* может регулироваться путем конкурентной транскрипции *Tsix*.

В дифференцированных женских клетках транскрипты Xist связаны только с неактивной конденсированной Х-хромосомой. В результате репликации ДНК транскрипты Xist равномерно распределяются между дочерними Х-хромосомами и, вероятно, выступают в качестве эпигенетических маркеров, обеспечивая наследование структурно-функционального состояния Х-хромосом.

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ПАМЯТИ

Все клетки многоклеточного организма имеют идентичный геном, однако специализированные клетки, отличающиеся друг от друга функциональной активностью, обладают различным набором экспрессирующихся генов. Во всех клетках, которые образовались из одной путем воспроизводящего (недифференциального) деления, будет наследоваться характерный для них образец экспрессии, причем неактивная часть генома будет оставаться в составе гетерохроматина. Однородные клетки, полученные из одной материнской, называют **клоном**.

Разнообразие типов клеток и тканей возникает в процессе дифференциального деления, в результате которого из материнской клетки образуются две функционально различные дочерние. При таком делении между образующимися клетками происходит неравномерное распределение детерминантов, влияющих на состояние хроматина. Хроматин-ремодулирующие белковые факторы определяют степень компактизации конкретных участков хроматина. Следствием изменения структуры хроматина является переключение генетической программы, поскольку при этом изменяется набор экспрессирующихся генов. При дальнейших делениях дифференцированное состояние в клеточных клонах наследуется. Способность клеток сохранять в последующих поколениях активность идентичного набора генов называется **клеточной памятью**. Клеточная память играет решающую роль в развитии и дифференциации многих организмов.

Дифференциальное деление клеток. Изменение генетической программы может стимулироваться как внутренними, так и внешними факторами. Внутренние факторы влияют, главным образом, на дифференциацию клеток в онтогенезе, тогда как внешние часто определяют сезонные изменения состояния клеток, которые необязательно сопровождаются дифференциацией, хотя изменение структуры хроматина может определить дальнейшее развитие клетки. Это следует понимать так: клетки в результате ремоде-

лирования хроматина могут не изменить своей функциональной активности при данных конкретных условиях, но, тем не менее, приобретают особую компетентность, которая позволяет им специфически реагировать на конкретные воздействия окружающей среды. Например, клетки апикальных меристем стебля ряда озимых растений в процессе яровизации приобретают способность реагировать на флоральные стимулы, хотя при отсутствии индукционных для цветения условий эти клетки функционально не отличаются от дояровизированного состояния.

При незначительных изменениях структуры хроматина может существенно поменяться функциональное состояние клетки. Это является следствием того, что большое количество генов находятся в **эпистатических взаимоотношениях**, то есть продукты одних генов влияют на экспрессию других. Такое сложное взаимодействие может привести к значительным изменениям при репрессировании или активировании даже одного гена.

Воспроизводящее деление клеток. Делящаяся клетка является транскрипционно неактивной, но после митотического воспроизводящего деления в дочерних клетках возобновляется экспрессия набора тех же генов, которые были активны в материнской. Деление клеток сопровождается конденсацией хромосом, в результате которой из хроматина удаляются все транскрипционные факторы. То есть в механизмах клеточной памяти транскрипционные факторы не принимают никакого участия. Одной из характерных особенностей митотического деления эукариотических клеток является то, что хроматин сохраняет в процессе митоза нуклеосомную структуру: ДНК в процессе репликации и конденсации остается связанной с коровыми гистонами. Гистоны несут определенные комбинации ковалентных модификаций, которые распознаются негистоновыми белками, участвующими в процессах формирования структуры хроматина. Некоторые негистоновые белки также не теряют связи с образующимися двуспиральными молекулами ДНК, сохраняя при этом свою специфическую локализацию относительно нуклеотидной последовательности генома.

Гистоны, несущие определенные ковалентные модификации, **негистоновые белки**, а также **схема метилирования ДНК** расцениваются в качестве **эпигенетических маркеров**, которые сохраняются в составе хроматина при делении клетки, а по завершению митоза и деконденсации хроматина привлекают соответствующие белковые комплексы, которые воссоздают структуру хромати-

на, идентичную его структуре в материнской клетке. Следовательно, вместе со структурой хроматина наследуется образец набора экспрессирующихся генов. По сути дела, **механизмы клеточной памяти заключаются, главным образом, в поддержании гистонового кода и схемы метилирования ДНК в хроматине клеточных клонов**. Эти процессы происходят во время репликации ДНК или после нее.

Эпигенетические метки (маркеры). В хроматине — модифицированные нуклеотиды ДНК и аминокислотные остатки нуклеосомных гистонов, содержащие дополнительные боковые группы. Эпигенетические метки формируют особые поверхности для связывания структурных и регуляторных негистоновых ядерных белков, обеспечивая, таким образом, поддержание определенного структурно-функционального состояния отдельных участков хроматина. Механизмы наследования эпигенетических меток в процессе митоза клеточными клонами лежат в основе феномена ***клеточной памяти***.

При рассмотрении механизмов клеточной памяти следует помнить, что ферменты, обеспечивающие введение эпигенетических меток, часто зависят друг от друга, могут физически взаимодействовать и даже входить в один хроматин-ремоделирующий комплекс.

ГИСТОНОВЫЙ КОД

Сайты модификации гистонов

Гистоновые белки **H2a, H2b, H3 и H4 участвуют в формировании** нуклеосом, которые обеспечивают первый уровень компактизации хроматина. Каждая из этих молекул образует глобулу, входящую в сердцевину нуклеосомы. На поверхности нуклеосомы находятся положительно заряженные **N-концевые домены** всех коровых гистонов, а также короткие С-хвостовые участки гистонов **H2a и H2b. Аминокислотные остатки гистоновых хвостов** могут быть ковалентно модифицированы путем присоединения к ним различных групп. Остатки лизина ацетилируются, метилируются и убиквитинируются, аргинин метилируется и серин фосфорилируется. Возможные модификации аминокислотных остатков коровых гистонов приведены в таблице 2.

Характер ковалентной модификации гистонов в отдельных участках хроматина имеет выраженную корреляцию с их физическим и функциональным состоянием. Это объясняется тем, что

Таблица 2. Потенциальные сайты модификации нуклеосомных гистонов

Гистон	Часть молекулы		
	N-концевая	глобулярная	С-концевая
H2a	acK5	—	uK119
H2b	acK5, acK12, acK15, acK20	—	uK123
H3	meR2, meK4, ac/meK9, PS10, acK14, meR17, acK18, acK23, meK27, PS28, meK36	meK79	—
H4	PS1, meR3, acK5, acK8, acK12, acK16, meK20	—	—

Условные обозначения:

- обозначение аминокислоты приводится согласно однобуквенному коду (K — лизин, R — аргинин, S — серин);
- перед аминокислотой обозначен тип модификации (ac — ацетил, me — метил, P — фосфат, u — убиквитин, ac/me — возможны обе модификации по данному сайту);
- цифра указывает номер модифицированного аминокислотного остатка.

модифицированные аминокислотные остатки участвуют в формировании определенной поверхности, которая узнается различными негистоновыми регуляторными и структурными белками. Каждый конкретный образец посттрансляционной модификации гистонов обеспечивает взаимодействие нуклеосом со специфическими белками или белковыми комплексами, что способствует поддержанию определенной степени компактизации и функциональной активности хроматина.

Нуклеосомные гистоны сохраняются в хроматине в процессе репликации и поэтому наследуются дочерними клетками. А поскольку наследованные нуклеосомы будут способствовать сборке хроматина в дочерних клетках по образцу материнской, то следует говорить о том, что ковалентные модификации гистонов не только способствуют реорганизации структуры нуклеосом и хроматина, но и обеспечивают богатый источник **эпигенетической информации**. Не все модифицированные аминокислоты участвуют в формировании эпигенетических меток нуклеосом. Часть из них необходима для облегчения ремоделирования хроматина, другая важна для поддержания его структуры.

В процессе деления не обязательно все возможные модификации гистоновых аминокислот передаются дочерним клеткам. Но поскольку наблюдается взаимная зависимость ковалентных модификаций (наличие одних определяет обязательное присутствие

или отсутствие других), недополученная информация возобновляется при воссоздании структуры хроматина.

Многочисленные данные позволяют утверждать, что специфические модификации гистонов или, скорее всего, их комбинации соответствуют коду, который определяет структурно-функциональное состояние отдельных участков хроматина. Код устанавливается гистон-модифицирующими ферментами определенной специфичности и читается негистоновыми белками, которые связываются с нуклеосомами модификационно-чувствительным способом. Для успешной реализации эпигенетической информации, которую несет **гистоновый код**, требуются не только белки, способные читать комбинации модификаций, но и механизмы, посредством которых они могут помещаться на определенные участки хроматина и наследоваться в процессе деления. Гистоновый код иногда называют эпигенетическим кодом, но это не совсем корректно, поскольку в качестве эпигенетических наследуемых маркеров используются не только модифицированные гистоны, но также модифицированные нуклеотиды (5-метилцитозин) и негистоновые белки, которые заякориваются на ДНК и случайным образом (статистически равномерно) распределяются между дочерними молекулами ДНК в процессе репликации.

Соотношение и приоритетность процессов установления эпигенетических меток пока еще не полностью понятны, так как все они тесно связаны друг с другом и недостаточно полно изучены. Тем не менее, **гистоновый код** является хотя и важной, но, скорее, составной частью общего **эпигенетического кода**.

Гистоновый код — комбинация ковалентных модификаций аминокислотных остатков N-терминалных участков коровых гистонов. Код устанавливается гистон-модифицирующими ферментами определенной специфичности и читается негистоновыми белками, которые связываются с нуклеосомами модификационно-чувствительным способом.

Значение и взаимодействие модификаций гистонов

Ацетилирование

Высокая степень ацетилирования нуклеосомных гистонов в активных областях генома и деацетилированное состояние гетерохроматиновых районов являются давно установленными фактами. Известно также, что уровень ацетилирования значи-

тельно снижается в процессе митоза. Однако долгое время не было понятно, имеет ли эта модификация отношение к наследованию структуры хроматина. Подробное исследование уровня ацетилирования лизиновых остатков на разных участках генома млекопитающих в гистонах Н3 и Н4 на протяжении клеточного цикла позволило выявить ряд интересных особенностей, которые подтверждают участие процессов ацетилирования в механизмах клеточной памяти.

Хвостовой **N-домен гистона** Н4 может быть ацетилирован специфическими **гистоновыми ацетилтрансферазами (НАТ) по четырем** лизиновым остаткам: К5, К8, К12 и К16. Активные участки хроматина гиперацетилированы, то есть все указанные остатки имеют ацетильные группы. В области гетерохроматина гистон Н4 находится в деацетилированном состоянии. При активации определенных участков генома в процессе эпигенеза ацетилирование гистона Н4 начинается с лизина-16, затем ацетилируются К8 или К12, и последним ацетилируется К5. Наличие асК5 является признаком гиперацетилированного состояния и всегда ассоциируется с транскрипционно активным хроматином. Перед делением клетки ДНК реплицируется и переходит в конденсированное состояние. Процесс конденсации сопровождается деацетилированием гистонов, который катализируется **гистоновыми деацетилазами (HDAC). Однако было выяснено, что осуществляется лишь частичное** деацетилирование. В молекулах гистонов Н4 полностью деацетилируются только остатки лизина 5, а остальные — К8, К12 и К16 — во время митоза остаются в неизменном состоянии и наследуются дочерними клетками. Таким образом, лизин-5 (Н4/К5) важен только для конформации хроматина, а три других остатка отвечают за клеточную память, то есть являются эпигенетическими маркерами активного хроматина. В гистоне Н3 ацетилированию могут подвергаться лизины К9, К14, К18 и К23. Основными сайтами, обеспечивающими наследование активного состояния, являются ацетилированные К9 и К14.

Незначительное нарушение процессов ацетилирования отражается на жизнедеятельности клеток. При генетическом скрининге почкующихся дрожжей были выявлены мутанты со сниженным уровнем ацетилирования К12 в гистоне Н4. В результате этой мутации ряд генов, находящихся вблизи теломерной зоны, оказались запертыми в области гетерохроматина и, соответственно, были инактивированными, тогда как в клетках дикого типа эти гены находятся в активном состоянии.

Метилирование

Ферменты, метилирующие гистоны, называют гистоновыми метилтрансферазами (HMTs). **Они проявляют специфичность** к определенным аминокислотным остаткам (лизину или аргинину) конкретных гистонов. Как правило, метилирование гистонов ассоциируется с образованием гетерохроматина и репрессией генной активности. Гистоновые метилтрансферазы и ацетилтрансферазы являются, в какой-то степени, антагонистами, так как их каталитическая активность часто приводит к противоположным результатам. Однако в отличие от ацетилирования, которое сопровождает усиление экспрессии, метилирование приводит к разнообразным эффектам. Наблюдаемые эффекты зависят, во-первых, от того, какой именно аминокислотный остаток гистонов будет метилироваться, а во-вторых, в какой комбинации с другими модификациями это будет происходить.

У высших эукариот наибольшее значение для состояния хроматина имеет метилирование двух остатков лизина в гистоне H3 — К4 и К9. Эти модификации чаще всего оказывают противоположное действие. Показано, что транскрипционно активные районы обогащены H3/**meК4, а молчащие (**гетерохроматин) — H3/**meК9.**

Формирование гетерохроматина опосредуется предпочтительным связыванием гетерохроматинового белка HP1 с нуклеосомами, в которых хвосты H3 метилированы по К9, а метилирование H3/К4 способствует проявлению двух важных эффектов, которые, наоборот, предотвращают образование гетерохроматина. Наличие H3/**meК4, во-первых, затрудняет связывание** нуклеосомы с хроматин-ремоделирующим и деацетилирующим комплексом NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylation*), активность которого сопряжена с образованием гетерохроматина. Во-вторых, H3/**meК4 ингибирует активность HMTs, катализирующих метилирование** H3/К9 (например, HMT млекопитающих SUV39H). Таким образом, метилирование H3/К4 блокирует введение эпигенетической метки, которая указывает область формирования гетерохроматина и, соответственно, репрессии находящихся в этом участке генов.

В экспериментах in vitro с клетками млекопитающих было показано, что образованию гетерохроматина препятствует не только метилирование H3/К4, но также фосфорилирование H3/S10 и, конечно же, ацетилирование H3/К9, так как эти модификации затрудняют или делают невозможным метилирование H3/К9. Похожее действие оказывает ацетилирование H3/К14, но

при этом наблюдается значительно более слабый эффект. Однако мутанты *S. cerevisiae*, у которых отсутствует гистоновая деацетилаза, специфичная по H3/K14, также показывают значительное снижение метилирования H3/K9.

Уровень метилирования K20 в гистоне H4 изменяется на протяжении клеточного цикла и, вероятно, имеет большое значение для процессов конденсации хроматина. Вместе с тем, существующие данные об этом вопросе очень противоречивы. Однако согласно последним представлениям, уровень метилирования H4/K20 более высокий в неактивных районах хроматина.

Наиболее высокий уровень метилирования в хроматине обнаруживается по H3/K79, который расположен в центральной части молекулы, но, тем не менее, располагается на поверхности нуклеосомы. Частота этой модификации достигает 90 % в дрожжевых клетках дикого типа, причем большинство H3/meK79 (около 50 %) находится в триметилированном состоянии. Исследователи предполагают, что метилирование H3/K79 блокирует связывание активного хроматина со специфическими гетерохроматиновыми белками. У дрожжевых мутантов, у которых полностью отсутствуют метилированные H3/K79, наблюдается случайное распределение таких белков по хроматину, что приводит к их истощению в молчащих районах. В результате этого активировались молчащие в норме гены. Сверхэкспрессия гена, кодирующего фермент, метилирующий H3/K79, приводила к 98 %-му триметилированию молекул H3 по K79, в том числе и в потенциально молчащих районах, что снижало тотальный уровень репрессии генома.

Убиквитинирование

Убиквитинированием называют образование изопептидной связи между ε-аминогруппой лизина какого-либо белка и концевой карбоксильной группой низкомолекулярного белка убиквитина. Убиквитин — это кислый белок с повышенным содержанием остатков дикарбоновых аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой кислот. Он может быть присоединен к гистоновым белкам только по двум сайтам: H2a/K119 и H2b/K123. Причем в одной нуклеосоме с убиквитином конъюгируется обычно одна молекула гистона H2a или H2b. В конъюгированной форме может находиться от 5 до 15 % гистона H2a и менее 5 % H2b. Наибольшее количество убиквитинированных лизинов находится в области эухроматина в интерфазном ядре, поэтому можно утверждать, что убиквитинирование связано с активацией экспрессии генов.

В гетерохроматине данная модификация не обнаруживается. При конденсации ДНК перед делением клеток убиквитин, по-видимому, полностью высвобождается из хроматина.

Присоединение убиквитина является важным процессом, который сопровождает модификацию гистоновых хвостов и ремоделирование хроматина. Обнаружена зависимость метилирования **H3/K4 и H3/K79 от** убиквитинирования H2b/**K123. Мутанты** дрожжей *S. cerevisia*e**, у которых** лизин-123 гистона H2b **заменен** на аланин, или нарушен синтез фермента **Rad6, ответственного** за присоединение убиквитина к лизину-123, полностью блокировано метилирование **H3/K4 и H3/K79. При наличии в нуклеосо**ме H2b/**uK123 оба эти сайта обязательно находятся в метилиро**ванном состоянии. Однако обращает на себя внимание большое и повсеместное различие между уровнями двух модификаций (метилированием 4-го и 79-го лизинов гистона H3 и убиквитинированием H2b**). В дрожжевых клетках дикого типа уровень мети**лирования **H3/K4 составляет 35 % и** H3/**K79 — 90 %, тогда как** лишь менее 5 % гистона H2b **находится в** убиквитин-конъюгированном состоянии. Таким образом, наличие H2b/**K123 в нук**леосоме определяет метилирование **H3/K4 и H3/K79 не только** в этой, но и в соседних нуклеосомах. Предполагается, что при введении убиквитина в **H2b на одной нуклеосоме этот белок дей**ствует как «клин», который разрыхляет структуру хроматина, делая другие нуклеосомы этой области доступными для метилирующих ферментов. Но существует и вторая возможность, влияющая на разную частоту модификаций. Метилирование является более стабильной модификацией и может оставаться длительное время после удаления убиквитина, наличие которого изначально позволило гистоновым метилтрансферазам присоединить метильные группы к **H3/K4 и H3/K79.**

Таким образом, **убиквитинирование является динамическим процессом, который имеет большее значение для собственно ремоделирования хроматина, а не для поддержания его структуры.**

Фосфорилирование

Нуклеосомные гистоны могут быть фосфорилированы по двум сайтам — **H3/S10 и H4/S1. Присоединение фосфатной группы** к остатку серина может влиять на другие модификации гистонов. Например, фосфорилированный H3/**PS10 затрудняет метилиро**вание H3/**K79. Однако, несмотря на это, фосфорилированные се**рины гистонов вряд ли обеспечивают клеточную память. Ранее

указывалось, что некоторые модификации гистонов (например, ацетилирование) сохраняются при любом состоянии хроматина, тогда как другие четко коррелируют с уровнем компактизации хроматина и обнаруживаются только на определенных стадиях клеточного цикла. По-видимому, основное значение фосфорилирования гистонов заключается в связывании особых белков, необходимых для конденсации хроматина, сопряженной с клеточным делением.

Интересно, что гистон H1, который не входит в состав нуклеососом, также может быть ковалентно модифицирован путем фосфорилирования, которое осуществляется преимущественно по гидроксильной группе серина. Реже фосфорилируются остатки гистидина.

Наблюдается четкая корреляция между состоянием хроматина, которую геном принимает в разные фазы клеточного цикла, и количеством фосфатных групп в гистоне H1. В синтетической фазе митоза **(S) в молекулу** H1 могут быть введены одна или две фосфатные группы. Однако основное фосфорилирование происходит во время профазы митоза практически перед самым делением клетки. Именно в профазе активность ядерных серин-треониновых киназ достигает максимальной величины. Количество фосфатов в молекуле H1 достигает шести. По окончании процесса деления все фосфатные группы удаляются фосфатазой. Данные о периодичности фосфорилирования гистона H1 свидетельствуют о том, что этот процесс важен для образования хромосом.

Характерной особенностью активно транскрибируемых участков хроматина, по сравнению с гетерохроматином, является пониженное количество гистона H1. Этот белок участвует в поддержании структуры хроматиновых фибрилл, которые не обнаруживаются в транскрибируемой области генома. Хроматиновые фибриллы затрудняют доступ регуляторов и ферментов к промоторам локализующихся в этой области генов, делая невозможной их транскрипцию. Не исключено, что степень фосфорилирования H1 имеет значение не только для конденсации хроматина во время митоза, но, возможно, и для поддержания неактивного состояния определенных участков генома в интерфазном ядре.

Комбинации модификаций

В клетках *Drosophila melanogaster* обнаружен эпигенетический активатор ASH1 (Absent, Small or Homeotic discs 1), который обладает метилтрансферазной активностью с широкой субстрат-

ной специфичностью. Он метилирует H3 по лизинам 4 и 9, а также H4 по лизину 20. Эта комбинация модификаций обеспечивает два эффекта:

1) **способствует связыванию активатора BRAHMA, который** является ATP-азным компонентом SWI/SNF-подобного ремоделирующего комплекса;
2) **ингибирует связывание эпигенетических репрессоров, таких как** Polycomb группа (PcG) **и** HP1.

Этот пример демонстрирует, что H3/meK9 — эпигенетический маркер, который часто ассоциируется с неактивным хроматином, так как обеспечивает сайты связывания для гетерохроматинового белка HP1, — в присутствии H3/meK4 и H4/meK20 участвует в формировании платформы, необходимой для присоединения ремоделирующего активирующего комплекса. Таким образом, H3/meK9 требуется также и для поддержания транскрипционно-активного состояния хроматина, но только при определенной комбинации модификаций.

Заканчивая описание ковалентных модификаций нуклеосомных гистонов, мы приводим обобщенные сведения об их функциональном значении, которые собраны в таблице 3 (с. 174).

Вовлечение гистонов в образование новых нуклеосом

Репликация ДНК приводит к необходимости возобновления структуры хроматина, поэтому в области репликационной вилки, помимо ДНК-полимераз, функционируют различные белки, которые участвуют в сборке хроматина, начиная от воссоздания первого уровня компактизации ДНК — нуклеосомной структуры.

Наиболее подробно изученным белковым комплексом, участвующим в образовании новых нуклеосом, является так называемый **фактор сборки хроматина CAF1** (*chromatin assembly factor 1*). Это гетеротримерный комплекс, который состоит из трех различных полипептидных цепей. У дрожжей субъединицы **CAF1 получили названия CAC1, CAC2 и CAC3 (то есть** *chromatin assembly complex 1*, *2* и *3*). Аналоги этих белков обнаружены также у животных и растений (соответственно, **p150, p60, p48** у человека и **FAS1, FAS2, MSI1 у** Arabidopsis**). Наиболее консервативным** из белковых субъединиц является CAC3. Между CAC3 дрожжей и аналогичными белками дрозофилы, млекопитающих,

Таблица 3. Функциональное значение некоторых сайтов модификации нуклеосомных гистонов

Модификация	Функциональное значение
H3/meK9	мишень HP1, эпигенетический маркер конденсированного состояния хроматина
H3/meK4	1) затрудняет связывание хроматин-ремоделирующего деацетилирующего комплекса NuRD; 2) ингибирует гистоновую метилтрансферазу, специфичную к H3/K9, блокируя метилирование H3/K9
H3/P10S	блокирует метилирование H3/K9
H3/acK9	блокирует метилирование H3/K9
H3/meK79	блокирует связывание активного хроматина с гетерохроматиновыми белками
H4/acK5	определяет деконденсированное состояние хроматина, в механизмах клеточной памяти не участвует
H4/acK8	эпигенетические метки активного состояния хроматина сохраняются в конденсированном хроматине делящейся клетки
H4/acK12	
H4/acK16	
H2a/uK119	облегчает модификацию гистонов и способствует ремоделированию хроматина, в механизмах клеточной памяти не участвует
H2b/uK123	облегчает метилирование H3/K4, H3/K79 и, вероятно, другие модификации гистонов, способствует ремоделированию хроматина, в механизмах клеточной памяти не участвует

в том числе человека, и растений обнаруживается высокая степень гомологии. По-видимому, это не случайно, так как именно этот пептид несет основную нагрузку по взаимодействию с другими хроматиновыми белками: деацетилазами, **Rb-подобными** белками и ATP-зависимыми хроматин-ремоделирующими машинами **(CRMs).**

Фактор сборки хроматина CAF1 **обеспечивает вовлечение** вновь синтезированных гистонов H3 и H4 в структуру нуклеосом по ходу репликации ДНК. Предполагается, что **CAF1 входит** в структуру репликационной вилки в виде гомотримерного белка, который образует скользящую скобообразную структуру вблизи ДНК-полимеразы.

Фактор сборки хроматина **CAF1 взаимодействует с вновь синтезированными** гистонами, которые имеют специфические модификации. Например, гистон H4 подвергается начальной пост-

трансляционной модификации за пределами ядра в цитоплазме сразу после синтеза. Этот белок ацетилируется **цитоплазматической гистоновой ацетилтрансферазой (HAT) B-типа** по 5 и 12 лизиновым остаткам. HAT B-типа состоит из двух субъединиц (45 и 50 kD). **Меньшая субъединица очень близка по структуре** и свойствам белку CAC3, который является компонентом **CAF1.**

В ацетилированом по K5 и K12 состоянии гистон H4 транслоцируется в ядро, узнается фактором **CAF1 и включается в** нуклеосомы. Коровые гистоны в процессе репликации ДНК случайно, практически равномерно, распределяются между дочерними молекулами. В областях, куда гистоны не попали, формируются новые нуклеосомы за счет взаимодействия между образованными de **novo гистонами и CAF1. Поскольку наследованные нук**леосомные гистоны несут особый гистоновый код, то есть обладают специфической комбинацией ковалентных модификаций, они способны взаимодействовать с соответствующими белковыми комплексами, участвующими в формировании структуры хроматина. Причем компоненты таких комплексов выполняют не только структурные, но и каталитические функции. Ферментативная активность белковых хроматиновых комплексов обеспечивает соответствующую ковалентную модификацию гистонов вновь образованных нуклеосом.

ЗНАЧЕНИЕ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ В НАСЛЕДОВАНИИ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА

Ацетилирование гистонов имеет важное значение для наследования эпигенетического состояния хроматина, однако, скорее всего, данный процесс является лишь одним из компонентов общего механизма клеточной памяти. В процессе конденсации хроматина, предшествующей митозу, в его составе сохраняются не только гистоны, но и ряд негистоновых белков, многие из которых являются компонентами хроматин-ремоделирующих комплексов (CRCs). **Подобные комплексы часто обладают** каталитической активностью, необходимой для ковалентной модификации гистоновых хвостов. С одной стороны, CRCs связываются с определенными участками хроматина и удерживаются на них за счет состояния гистонов, а с другой стороны, сами CRCs способны корректировать и поддерживать гистоновый код. Поэ-

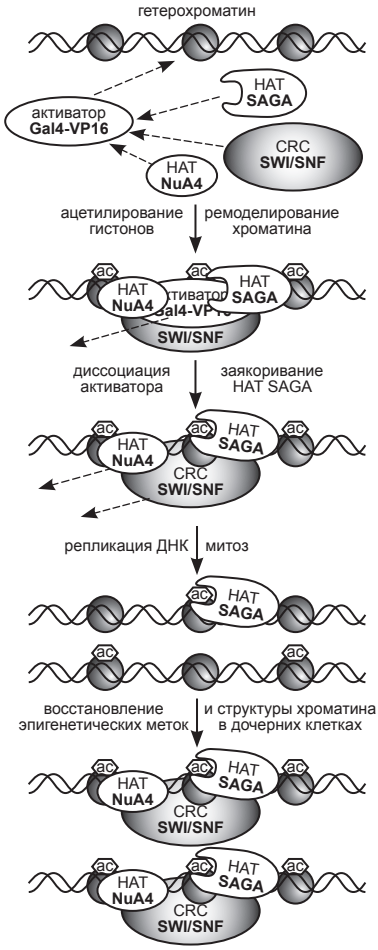


Рис. 58. Активация хроматина с участием гистон-ацетилирующего комплекса SAGA, который используется в качестве эпигенетической метки

тому в качестве эпигенетических наследуемых маркеров, вероятно, могут выступать не только модифицированные гистоновые остатки (или их комбинации), но и компоненты CRCs, сохраняющиеся в составе хроматина при делении клетки.

Существует множество механизмов ремоделирования хроматина. Рассмотрим конкретные примеры эпигенетической активации с участием комплекса SWI/SNF и репрессии с участием Polycomb группы.

Одним из таких комплексов является гистон-ацетилтрансферазный **(HAT) комплекс SAGA.** Этот комплекс ацетилирует гистоны в месте локализации хроматин-ремоделирующего комплекса **SWI/SNF. Последовательность** событий, происходящих при активации хроматинового участка с участием **HAT-комплекса SAGA, происходит следующим** образом (рис. 58). Вначале активатор генной экспрессии **Gal4-VP16 присоединяется к определенному** участку хроматина и привлекает к нему **SWI/SNF** комплекс. Затем **HAT-комплексы** SAGA **и NuA4 ацетилируют гистоны** в этом участке. Ацетилирование не усиливает связывание комплекса **SWI/SNF с хроматином,** но обеспечивает его удержание при последующем удалении активатора **Gal4-VP16. После введения ацетильных групп в лизиновые** остатки гистонов H3 и H4 комплекс **SAGA заякоривается** на этом участке хроматина, а активатор **Gal4-VP16 удаляется.** Прочно удерживаться на ацетилированном участке хроматина комплексу **SAGA позволяет наличие бромодоменов в субъедини-**

це Gcn5. В комплексе NuA4 бромодомены отсутствуют, поэтому его связывание с хроматином менее прочное. В процессе митоза из хроматина вытесняются все участвующие в активации компоненты, кроме HAT комплекса SAGA. Он остается связанным с ацетилированным доменом хроматина во время деления клетки, обеспечивая самосохраняющуюся эпигенетическую метку.

Некоторые белковые комплексы, которые участвуют в эпигенетической репрессии генов, путем поддержания структуры гетерохроматина, также могут оставаться связанными с хроматином в области молчащих генов в процессе репликации ДНК и деления клетки.

В эмбриональных клетках *Drosophila* был идентифицирован белковый комплекс, связанный с кластерами молчащих генов. Он получил название Polycomb группы (PcG). Одним из компонентов PcG — E(Z) *(Enhancer of Zeste*) обладает гистон-метилтрансферазной активностью. E(Z) проявляет субстрантную специфичность к гистону H3 и метилирует его по K27 и K9. Большинство H3/K9 в гетерохроматине находятся в *три*метилированном состоянии. Через метилированные лизины-9 гистона H3 (H3/meK9) обеспечивается связывание нуклеосом с гетерохроматиновым белком HP1, который является одним из основных компонентов, обеспечивающих формирование гетерохроматина. Поскольку E(Z)-содержащий PcG комплекс сохраняет свою локализацию в хроматине в процессе и после деления клеток, он обеспечивает метилирование вновь синтезированных молекул гистона H3, а это, в свою очередь, инициирует конденсацию хроматина и формирование неактивной гетерохроматиновой области на данном участке генома. Таким образом, Polycomb обладает потенциалом самоподдерживающейся эпигенетической метки, указывающей область молчащих генов.

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ХРОМАТИНА

Все клетки многоклеточного организма имеют общий генетический фон, то есть обладают одинаковым генетическим потенциалом. Тем не менее, в дифференцированных клетках реализуется только определенная генетическая программа, благодаря экспрессии ограниченного набора генов. В процессе эпигенетического развития в период раннего эмбриогенеза

у многоклеточных организмов происходит дифференциация клеток посредством ремоделирования хроматина. Кроме того, у растений, в отличие от животных, образовательные ткани сохраняются на протяжении всего жизненного цикла, поэтому дифференциация клеток в области точек роста стебля и корня протекает постоянно. На разных стадиях эмбриогенеза (или органогенеза у растений) наблюдается последовательная экспрессия генов, кодирующих эпигенетические регуляторы, которые направляют процессы ремоделирования пространственной организации хроматина. Для каждой стадии развития характерна экспрессия специфических регуляторных генов, продукты которых, изменяя уровень компактизации отдельных участков хроматина, оказывают репрессирующее или активирующее воздействие на различные гены. Таким образом, **дифференциация и развитие клеток контролируется через пространственно-временную активацию или репрессию специфических генов путем ремоделирования хроматина.**

Изменение пространственной организации хроматина осуществляется хроматин-ремоделирующими комплексами **(CRCs)** — сложными надмолекулярными образованиями, включающими в себя множество функционально разнообразных компонентов. Эти комплексы способны взаимодействовать с различными хроматиновыми белками, в том числе с гистонами, а также с ДНК. Следует заметить, что наиболее важными являются взаимодействия хроматин-ремоделирующих комплексов с коровыми гистонами.

Активация хроматина

Процессу активации определенного участка хроматина, как правило, предшествует инициация экспрессии гена, кодирующего белок-активатор. Это происходит под влиянием различных эндогенных или экзогенных факторов. Активатор присоединяется к специфическому участку генома и привлекает хроматин-ремоделирующий комплекс. Вслед за **CRC к данному участку хроматина** присоединяются гистон-ацетилтрансферазные (HAT) комплексы, которые повышают уровень ацетилирования гистоновых **N-концевых доменов. За счет ацетилирования аминокислотных** остатков ослабевает связь нуклеосом с гетерохроматиновыми белками. Одновременно с этим ацетилированные гистоны привлекают белки, в структуре которых есть **бромодомены.** Субъединицы хроматин-ремоделирующих комплексов, по крайне мере, некото-

рые из них, имеют бромодомены, поэтому после ацетилирования гистонов CRCs могут удерживаться на данном участке хроматина даже после удаления активатора, а некоторые компоненты сохраняются в составе хроматина даже во время митоза (см. рис. 58).

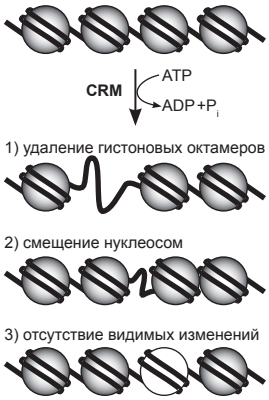


Рис. 59. Возможные структурные изменения, которые можно наблюдать в результате действия хроматин-ремоделирующей машины (CRM) в процессе активации хроматина (по Reyes J. C., Hennig L., Gruissem W., 2002)

В состав CRCs входит компонент, обладающий АТР-азной активностью. Этот компонент принято называть АТР-зависимой хроматин-ремоделирующей машиной (CRM). В таких АТР-азах выделяют три основных домена: АТР-азный домен, а также N- и С-концевые домены, которые служат для взаимодействия с другими субъединицами CRM или специфическими хроматин-ассоциированными белками.

CRMs воздействуют на хроматин путем введения супервитков в молекулу ДНК, используя при этом энергию гидролиза АТР. Активность CRM позволяет им изменять положение нуклеосом, смещать, раздвигать их и даже удалять из нуклеосом гистоны (рис. 59). В любом случае, АТР-азная активность CRM приводит к повышению текучести хроматина. Это делает данный участок хроматина доступным для транскрипционных факторов и РНК-полимераз.

Репрессия хроматина

Репрессия транскрипционной активности отдельных участков хроматина путем формирования гетерохроматина осуществляется в несколько этапов. В наиболее общем виде этот процесс можно представить в такой последовательности:

1) под влиянием определенных стимулов активируются соответствующие деацетилазы, которые деацетилируют коровые гистоны;
2) деацетилированные гистоны являются субстратом для HMT, которые метилируют их лизиновые остатки (наиболее типичный сайт метилирования — Н3/К9);
3) гетерохроматиновый белок HP1 присоединяется к нуклеосоме через Н3/meК9;

4) **другие гетерохроматиновые белки связываются с хроматином через HP1**, и образуется обширный мультибелковый комплекс.

Характерными особенностями HP1 и его гомологов являются их сравнительно небольшие размеры (171–328 а/к) и наличие двух структурных единиц, обеспечивающих белок-белковые взаимодействия: на **N-конце молекулы расположен** хромодомен (*chromodomain*), а на **С-конце — хромошедоу домен (***chromoshadow domain*). Эти домены имеют 60 %-ную гомологию и не имеют сродства с ДНК. Это достаточно важная деталь: **основной структурный белок гетерохроматина не способен взаимодействовать непосредственно с ДНК**. Данное свойство характерно для многих хроматиновых белков.

Белок HP1 способен привлекать новые HMT, специфичные к H3/K9, обеспечивая этим сначала формирование, а затем — и наследование гетерохроматина в клеточных клонах. В процессе формирования обширных областей гетерохроматина существенное значение имеет тетрамерный комплекс **ORC (***origin of replication recognition complex*). Одна из субъединиц этого комплекса **ORC1 взаимодействует одновременно с двумя доменами HP1** (хромо- и хромошедоу), повышая таким образом стабильность гетерохроматина (рис. 60-А).

Последовательность процессов репрессии хроматина путем его компактизации может быть иной, а механизм в таком случае протекает с вовлечением других компонентов. Например, у *S. cerevisiae* ключевым моментом образования гетерохроматина является деацетилирование гистона H4, а не H3 (рис. 60-Б). С деацетилированным H4 связывается тетрамерный белковый комплекс SIR (***s**ilence **i**nformation **r**egulator*). Комплекс SIR инициирует образование хроматина, обеспечивая, подобно HP1, взаимодействие хроматина с другими белками. Однако общей закономерностью в процессе формирования гетерохроматина у всех организмов является наличие двух основных этапов: модификации гистоновых хвостов и образования мультимерного белкового комплекса, благодаря которому поддерживается транскрипционно неактивная структура гетерохроматина.

В качестве примера репрессии хроматина рассмотрим молекулярные события, сопровождающие инактивацию локуса цветения С (*FLC*) в процессе яровизации у озимых растений *Arabidopsis* (рис. 61). Репрессии хроматина в области *FLC* предшествует активация экспрессии гена, кодирующего белковый регу-

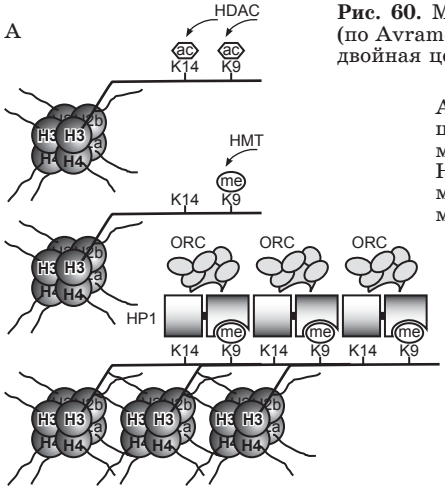
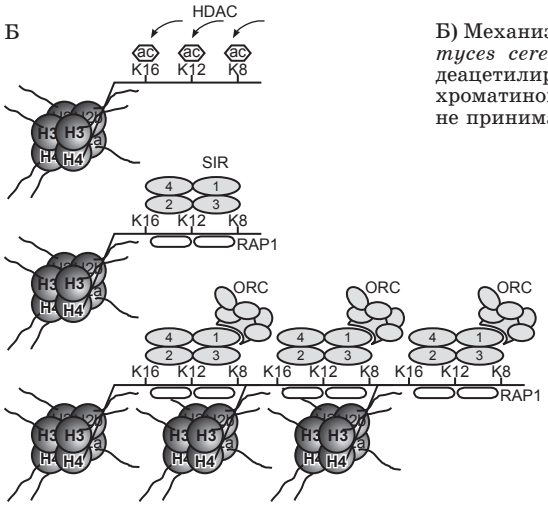


Рис. 60. Модели формирования гетерохроматина (по Avramova Z. V., 2002). Для упрощения схемы двойная цепь ДНК не показана.

А) Механизм, характерный для большинства эукариот. Ключевой момент механизма — деацетилирование гистона H3. Процесс формирования гетерохроматина протекает с участием гетерохроматинового белка HP1.



Б) Механизм, обнаруженный у *Saccharomyces cerevisiae*. Ключевое событие — деацетилирование гистона H4. Гетерохроматиновый белок HP1 в механизме не принимает участие.

лятор VIN3, синтез которого стимулируется длительным низкотемпературным воздействием (яровизацией). VIN3 является аллостерическим регулятором гистоновой деацетилазы (HDAC). Он связывает и активирует HDAC в области локуса цветения C. После деацетилирования с данным участком хроматина связываются белки Polycomb группы (PcG) — продукты локуса *VRN2*. Один из компонентов PcG обладает метилтрансферазной активностью, причем субстратом для этой гистоновой метилтрансферазы (HMT) являются H3/K27 и один из деацетилированных

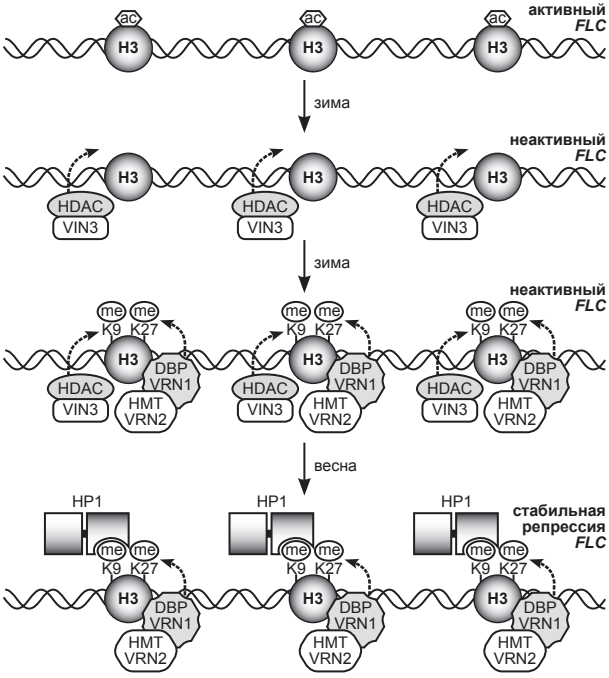


Рис. 61. Репрессия хроматина в области локуса цветения С (*FLC*) у озимых генотипов *Arabidopsis* в процессе яровизации (по Sung S., Amasino R. M., 2004)

в процессе яровизации остатков лизина гистона Н3 — лизин 9. Метилирование Н3/К9 предотвращает его реацетилирование и, следовательно, реактивацию репрессивного состояния локуса цветения С. Н3/meК9 является специфическим сайтом связывания с хромодоменом гетерохроматинового белка HP1.

Репрессия отдельных участков хроматина может инициироваться siРНК. Этот тип микроРНК процессируется ферментом Dicer (РНК-аза III-подобный фермент) из длинных двуспиральных РНК. Образующиеся короткие полирибонуклеотидные фрагменты (siРНК) участвуют в трансляционной (TGS) и посттрансляционной (PTGS) репрессии генов. TGS связана с изменением структуры хроматина. Одноцепочечные siРНК способны присоединяться к соответствующим участкам ДНК путем комплементарного взаимодействия. Наличие siРНК на хроматине является сигналом для гистоновых метилтрансфераз, которые метилируют N-концевые домены коровых гистонов и способствуют, таким образом, формированию гетерохроматиновой области.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Значение и эволюция процесса метилирования цитозина

Метилирование ДНК по цитозину имеет двоякое значение для многоклеточных организмов. Прежде всего, этот процесс возник эволюционно как защитный механизм, направленный на защиту клеток от чужеродной ДНК еще у прокариот. Метилирование генома у бактерий является частью системы, которая защищает клетку от инфекции бактериофагами. В более поздний период эволюции эта функция стала использоваться эукариотами для обезвреживания чужеродной ДНК, транспозонных элементов и эндогенных ретровирусов. Так как мобильные элементы стали основой структуры гетерохроматина, эукариотический геном может подвергаться влиянию эндогенных элементов, способных к транспозиции через ДНК или РНК. Хотя значительная часть «собственных» транспозонных элементов и потеряла активность, метилирование ДНК, тем не менее, необходимо для предотвращения распространения в геноме хозяина транспозонных элементов, обладающих такой активностью. Слишком большое количество транспозонов и их дальнейшее размножение может подавить геном хозяина, то есть потенциально является губительным для организма. Ковалентная модификация и последующая компактизация ДНК приводят к невозможности экспрессии уплотненных участков генома и размножения находящихся там мобильных элементов. Процесс метилирования ДНК в ходе эволюции стал не только способом инактивации хроматина, но и одним из центральных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов.

Метилирование ДНК эукариот происходит преимущественно по 5-му атому пиримидинового кольца цитозина, который находится в составе динуклеотида **–CG–. Эволюционный выбор этой** модификации неслучаен. Цитозин склонен к дезаминированию, которое приводит к образованию урацила. Поскольку уридин не входит в состав ДНК, он эффективно удаляется из ДНК и заменяется цитозином в результате функционирования репарационного механизма (рис. 62). В противоположность этому, 5-метилцитозин в результате дезаминирования превращается в тимин, замена которого происходит намного менее эффективно, чем урацила. В неправильной паре тимин–гуанин замещение тимина на цитозин осуществится с такой же вероятностью, как и замещение гуанина

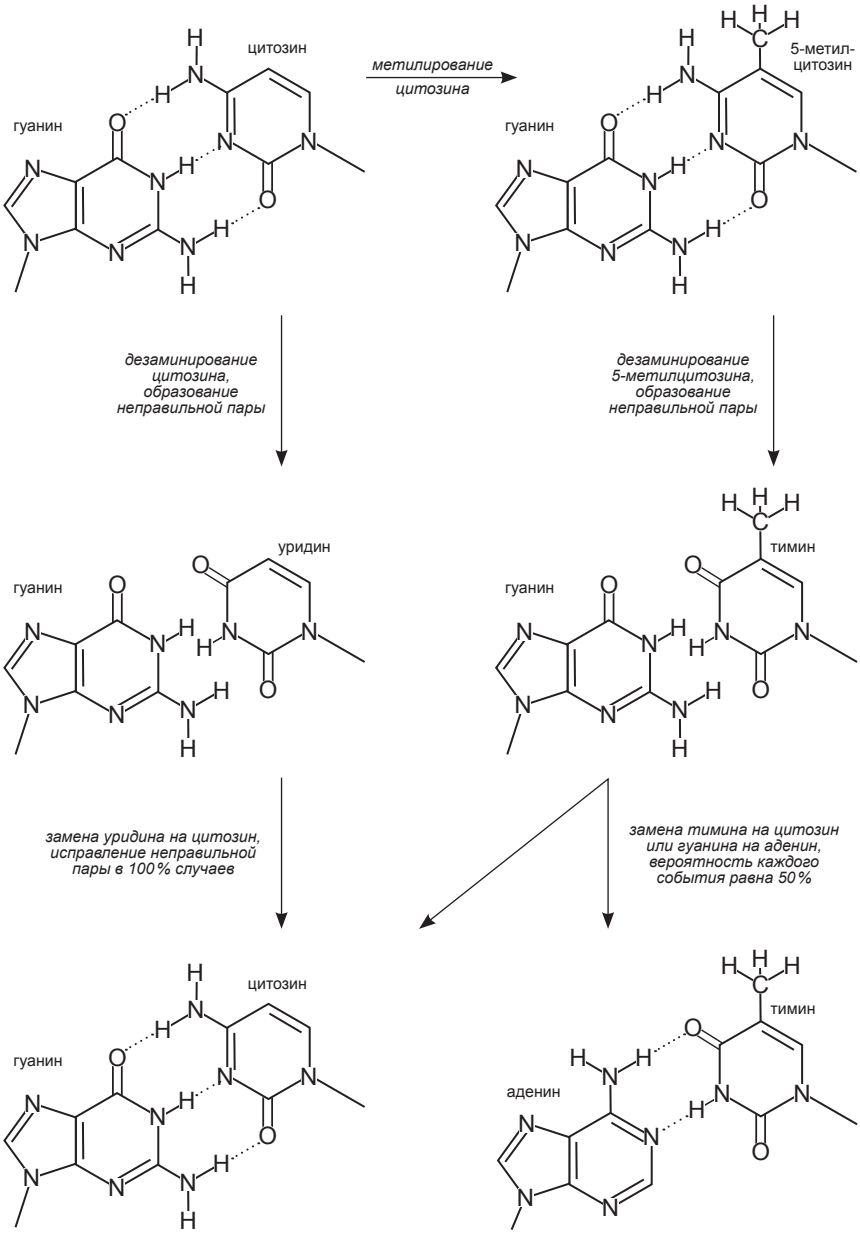


Рис. 62. Мутагенные свойства 5-метилцитозина

на аденин. Таким образом, 5-метилцитозин является мутагеном, поэтому метилирование цитозина может служить эффективной защитой против чужеродной ДНК. Вероятно, метилирование цитозина является очень древним механизмом защиты против геномных паразитов. На определенном этапе развития эукариоты получили определенную выгоду, используя чужеродный генетический материал для собственных эволюционных процессов. Параллельно с увеличением в геноме эукариот количества паразитической ДНК, инактивированной путем ковалентной модификации (метилирования цитозина), эволюционировали белковые системы, обеспечивающие конденсацию участков ДНК, несущих некодирующие последовательности. В результате этого возникла структура, называемая гетерохроматином, который также оказался ценным эволюционным приобретением, так как он, во-первых, выполняет ряд функций, связанных с делением клетки, а во-вторых, используется для обеспечения эпигенетической репрессии генов.

С метилированием цитозина и мутагенными свойствами 5-метилцитозина, вероятно, связан тот факт, что динуклеотид **–CG–** встречается в геномах эукариот значительно реже, чем ожидалось бы, а количество пар **C≡G меньше, чем A=T пар практически** во всех исследованных эукариотических геномах. У вирусов и прокариот такая тенденция не выявлена (табл. 4).

Локализация и уровень метилирования

В ядерной ДНК эукариот в метилированном состоянии может находиться от 2 до 7 % цитозина. Причем уровень метилирования ДНК изменяется с возрастом. Увеличение доли гетерохроматина в процессе специализации клеток сопровождается повышением уровня метилирования ДНК, так как эти показатели неразрывно связаны друг с другом. Вместе с тем, метилированные цитозины могут быть обнаружены и в активных участках генома. Например, в эритроидных клетках человека с высокой активностью β-глобулиновых генов кластеры этих генов содержат метилированные остатки цитозина. Тем не менее, наличие метилированных участков не инактивирует гены, кодирующие β-глобулин. В таких случаях говорят, что активный ген «недометилирован». Для инактивации генов определяющее значение имеет, вероятно, не метилирование само по себе, а метилирование именно тех участков, в которых локализуются промоторы. Например, у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* большинство сайтов генов, кодиру-

Таблица 4. Содержание азотистых оснований в молекулах ДНК различных организмов (по А. Ленинджер, 1985, с изменениями)

Организм	Нуклеотидный состав, мол. %			
	A	T	G	C
Человек	30,9	29,4	19,9	19,8
Овца	29,3	28,3	21,4	21,0
Курица	28,8	29,3	20,5	21,5
Черепаха	29,7	27,9	22,0	21,3
Лосось	29,7	29,1	20,8	20,4
Морской еж	32,8	32,1	17,7	17,3
Саранча	29,3	29,3	20,5	20,7
Пшеница	27,3	27,1	22,7	22,8
Дрожжи	31,3	32,9	18,7	17,1
Escherichia coli	24,7	23,6	26,0	25,7
Staphylococcus aureus	30,8	29,2	21,0	19,0
Фаг T7	26,0	26,0	24,0	24,0
Фаг λ	21,3	22,9	28,6	27,2
Фаг ϕX174 (репликативная форма)	26,3	26,4	22,3	22,3

ющих рРНК, остается метилированными при любом состоянии активности. Однако два сайта, расположенных возле промотора, деметилируются в процессе эмбрионального развития, когда начинается транскрипция рРНК.

Большая часть динуклеотидов –CG– встречается в так называемых CpG-островах — GC-обогащенных районах. В молчащих областях генома, преимущественно в сателлитной ДНК, CpG-острова являются гиперметилированными, тогда как в активных генах они деметилированы. Большинство генов в нормальных клетках, как правило, не регулируется путем метилирования ДНК, и главной функцией этого процесса является контроль конденсированного состояния повторяющейся (сателлитной) ДНК. Активность лишь незначительной части генов контролируется таким способом. Эти гены расположены в дифференциально метилированных районах (DMRs — ***d****ifferentially* ***m****ethylated* ***r****egions*) и экспрессируются моноаллельно, то есть активен только один ген, наследованный или от отца, или от матери. Также важная группа моноаллельно экспрессируемых генов, которые контролируются через метилирование, расположена в неактивной Х-хромосоме женского организма млекопитающих.

Механизм наследования схемы метилирования

Остается неизвестным, по какой причине и в результате какого механизма происходит первоначальное метилирование в процессе дифференциации клеток, однако существует много указаний на то, что ключевым сигналом для репрессии генов путем метилирования являются повторяющиеся последовательности ДНК. Вместе с тем, особенности механизма наследования метилированных участков генома изучены достаточно подробно.

Метилирование цитозина в положении 5 осуществляется ферментами ДНК(цитозин-5)-метилтрансферазами (Dnmts). У млекопитающих было обнаружено три гена, кодирующих подобные метилтрансферазы: Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b.

Процесс метилирования осуществляется таким образом, что он обеспечивает устойчивое наследование схемы метилирования ДНК. Фермент, метилирующий цитозин, для проявления активности требует, чтобы субстрат соответствовал двум условиям:

— во-первых, метилирование цитозина происходит только в последовательностях –CpG–;
— во-вторых, эта последовательность должна быть спарена с такой же, но уже метилированной по цитозину.

Наличие метилированного цитозина не мешает репликации ДНК. После удвоения каждая новая двойная спираль содержит по одной метилированной цепи, полученной от исходной молекулы, и одной неметилированной вновь образованной (рис. 63). Обе новые ДНК отвечают двум условиям, необходимым для проявления активности метилирующего фермента: наличие последовательности с неметилированным цитозином и комплементарной последовательности с метилированным цитозином.

Фермент Dnmt метилирует этот сайт, и таким образом ДНК приобретает первоначальный вид.

После очередной репликации снова образуется полуметилированный дуплет, который будет мишенью для фермента. Этим объясняется наследование метилирования в клеточных клонах.

Значение метилирования для инактивации генов было продемонстрировано в исследованиях с использованием ле-

Рис. 63. Наследование схемы метилирования ДНК

карственного препарата 5-азацитидина — искусственного аналога цитозина. Это соединение включается при репликации ДНК в цепи, однако не метилируется из-за того, что 5-положение блокировано. Вследствие невозможности метилирования ДНК в дочерних клетках начали экспрессироваться прежде неактивные гены. Было показано, как 5-азацитидин индуцировал развитие мышечных клеток из немышечных. Подобным образом это соединение активировало гены в молчащей Х-хромосоме. Эти данные доказывают, что метилирование цитозина является важным событием, влияющим на регуляцию активности генов.

Вместе с тем, существует много указаний на то, что каталитическая активность ДНК-метилтрансфераз не оказывает непосредственного ингибирующего влияния на ДНК. Помимо ДНК, метилирующие ее ферменты взаимодействуют с рядом структурных и функциональных белков. Известно, что метилирование цитозина функционально очень тесно связано с деацетилированием гистоновых белков. Эти две активности сопутствуют одна другой. Более того, обнаружено, что ферменты, катализирующие метилирование ДНК, способны физически взаимодействовать с гистоновыми деацетилазами **HDACs. Предполагается, что основная** роль ДНК-метилтрансфераз, взаимодействующих с деацетилазами, заключается в восстановлении эпигенетических маркеров в хроматине во время или после митотического деления клеток.

Сравнительно недавно были выделены **белки, способные распознавать и связываться с метилированными участками ДНК** (–^{me}CpG–). Например, у человека — это **MeCP2 (m**ethyl-**C**p**G**-**bind**ing **p**rotein **2**), MBD**1, MBD2 (m**ethyl-**C**p**G**-**b**inding **d**omain **protein** 1 и 2) и др. Необычной особенностью этих белков является то, что они распознают относительно малые поверхности молекулы ДНК и поэтому могут связываться с этими участками в том случае, если участок ДНК закручен вокруг гистонового октамера. То есть ^{me}CpG-связывающие белки взаимодействуют с ДНК в области нуклеосомы.

^{me}CpG-связывающие белки, как и гистоны, остаются в составе нуклеосом во время митоза и случайным образом распределяются между хроматином дочерних клеток. После или во время репликации ДНК эти белки служат мишенями, которые узнаются различными комплексами. Один из ^{me}CpG-связывающих белков, **MeCP2, связывает гистоновые** деацетилазы и привлекает их вместе с ДНК-метилтрансферазами (поскольку эти молекулы имеют высокое сродство друг к другу) к соответствующим нук-

леосомам. Комплекс Dnmt–HDAC обеспечивает восстановление метилированных участков ДНК.

Кроме этого, ^{me}CpG-связывающие белки привлекают к нуклеосомам хроматин-ремоделирующие комплексы, участвующие в репрессии хроматина. Из ядер яйцеклеток шпорцевой лягушки был выделен мультибелковый хроматин-ремодулирующий комплекс Mi-2. Этот комплекс состоит из шести субъединиц, среди которых обнаружены АТР-аза Mi-2 (по названию которой и обозначают весь комплекс), гистоновая деацетилаза и белок MBD3, селективно связывающий метилированные участки ДНК. Аналогичный комплекс найден и у млекопитающих, его обозначают так: NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylation*). Считается, что NuRD привлекается белком MBD2 к метилированным CpG-островам хроматина и инициирует сборку гетерохроматина.

В ДНК эукариот локализация метилированных цитозинов не ограничивается только симметричными динуклеотидными фрагментами –^{me}CpG–. Метилирование принципиально других участков осуществляется ДНК-метилтрансферазами иного типа. Обнаружены ферменты, которые метилируют цитозин в составе тринуклеотидных участков ДНК, имеющих обобщенную структуру –CpNpG–. Одним из них является ДНК-метилтрансфераза растений CHROMOMETHYLASE3 (CMT3). Метилирование тринуклеотидов –CpNpG–, так же как и динуклеотидов, функционально тесно связано с процессами формирования гетерохроматина. Показано, что гетерохроматиновый белок растений LHP1 (LIKE HP1), аналог HP1 животных, может физически взаимодействовать с CMT3. То есть метилирование цитозина в составе –CpNpG– сопряжено со сборкой хроматина.

Итак, метилированные цитозины ДНК являются самонаследующимися эпигенетическими метками, связанными с наследованием репрессированных участков хроматина. Ферментативные комплексы, контролирующие уровень метилирования цитозина, находятся в тесных функциональных и структурных взаимоотношениях с хроматин-ремоделирующими комплексами, которые участвуют в ковалентной модификации гистоновых N-концов и поддержании уровня компактизации хроматина. В настоящий момент известно, что схема метилирования ДНК и гистоновый код являются главными составляющими клеточной памяти, однако еще не достаточно понятны причинно-следственные взаимоотношения процессов распознавания, поддержания и наследования эпигенетических маркеров. То есть не ясна иерархия (или приоритетность) механизмов,

контролирующих клеточную память. Не исключено, что оба компонента клеточной памяти являются равноценно важными и могут обеспечивать взаимное поддержание друг друга.

Отсутствие метилирования ДНК

Способность к метилированию цитозина по положению 5 обнаруживается во всех филогенетических группах организмов. Это доказывает древнее происхождение данного механизма. Кроме того, об эволюционной преемственности этого процесса свидетельствует достаточно высокая степень гомологии между ферментативными комплексами, метилирующими цитозин у прокариот и эукариот.

Однако у некоторых организмов метилирование не является эффективной защитой генома. Возможно, что транспозонные эндогенные элементы в этих случаях приспособились использовать метилирование для того, чтобы «скрыться» от хозяина и размножиться через клеточное деление. По этой причине организмы могли потерять в процессе эволюции способность метилировать ДНК ввиду неработоспособности этого широко распространенного защитного механизма. Другая причина утери способности к метилированию ДНК связана с отсутствием необходимости использовать данный механизм. Например, такие модельные объекты, как *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster*, не метилируют ДНК. Но обращает на себя внимание тот факт, что все перечисленные виды имеют геномы малого размера и короткий жизненный цикл. Малый размер генома определяется тем, что он содержит незначительное количество или не содержит вообще транспозонных элементов, а короткий жизненный цикл, как правило, связан с тем, что большая часть генома используется на протяжении всей жизни организма. В любом случае, метилирование потеряло свое значение, а репрессия генов путем конденсации хроматина обеспечивается за счет иных механизмов. Теоретически существуют два возможных варианта отсутствия конкретного механизма: он был утерян или не был приобретен в процессе эволюции совсем. В этой связи примечательным является то, что метилтрансферазы и ^{me}CpG-связывающие белки удерживаются в клетках *Schizosaccharomyces pombe* и *Drosophila melanogaster*. Это, вероятно, является доказательством того, что репрессия генов, зависимая от метилирования ДНК, была утеряна этими организмами в процессе эволюции.

КЛОНИРОВАНИЕ И ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ

Теоретические основы клонирования

> ***Клон*** (от греч. clon — отпрыск, ветвь). Совокупность клеток или организмов, происходящих от общего предка посредством бесполого размножения.

Сохранение первичной структуры ДНК в дифференцированных клетках предполагает возможность получения целостного полноценного организма из соматической клетки. Теоретически, возможность клонирования зависит от того, **насколько необратимы процессы дифференциации и существуют ли способы их преодоления.** Более полувека назад, на рубеже 30–40-х годов XX столетия, немецкий эмбриолог Ганс Шпеманн впервые поставил вопрос о целостности и идентичности генома организма в течение всей жизни и предложил эксперимент по переносу ядра соматической специализированной клетки в энуклеированную (то есть с предварительно разрушенным ядром) яйцеклетку (рис. 64). В настоящее время перенос ядра дифференцированной клетки в энуклеированную яйцеклетку является основной технологической операцией процесса клонирования животных.

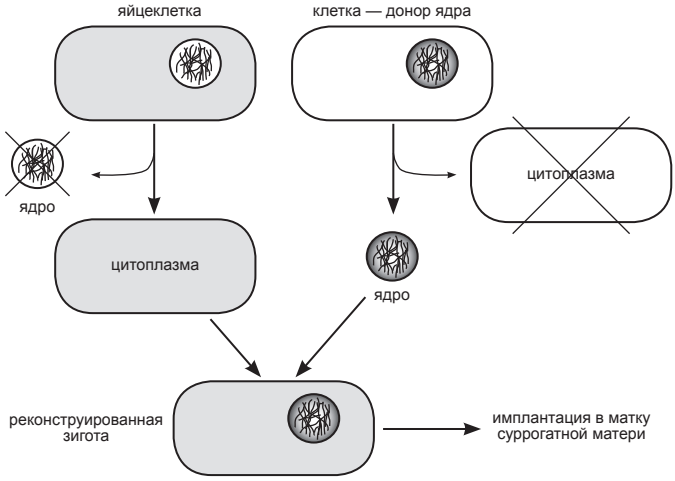


Рис. 64. Схема получения реконструированной зиготы

Тотипотентность (от лат. totus — весь, целый и potential — сила) — свойство отдельной клетки реализовывать генетическую информацию ядра, обеспечивающую ее дифференцировку, а также развитие до целого организма.

Дифференциация клеток многоклеточных организмов — процесс, в некоторой степени, необратимый, но, с другой стороны, возникает вопрос: почему специализированные половые клетки способны при оплодотворении образовывать **тотипотентную зиготу**, то есть клетку, из которой развивается целый организм? Таким образом, по-видимому, существует механизм, посредством которого осуществляется процесс дедифференциации, и этот механизм активизируется только в яйцеклетках. Именно поэтому Шпеманн выдвинул идею использования цитоплазмы яйцеклетки для того, чтобы заставить перенесенное в нее ядро вернуться в недифференцированное состояние.

Технологии клонирования интенсивно развиваются, и уже давно известно, что получение клонов из растительных клеток гораздо легче, чем из клеток животных, причем низшие формы животных проще клонировать, чем, к примеру, млекопитающих. Разная способность клеток к дедифференциации зависит, вероятно, от степени детерминированности специализированного состояния у различных групп организмов. А уровень детерминированности, в свою очередь, во многом определяется характером жизнедеятельности организма.

Так, неподвижный образ жизни растений связан с необходимостью поддерживания функции роста на протяжении всего жизненного цикла. Растения не могут передвигаться в пространстве всем организмом, однако возможность постоянного роста позволяет им изменять положение отдельных органов. Благодаря этому, органы растений оптимально располагаются в пространстве, что позволяет им эффективно использовать солнечный свет, воду, минеральные вещества, избегать неблагоприятных факторов и т. д. Сохранение образовательных тканей (меристем) у растений в течение всей жизни позволяет им не только поддерживать постоянный рост, но и обладать высокой регенерационной способностью. Это полезное свойство, поскольку растительный организм, вследствие своей неподвижности, часто оказывается беззащитным против ряда абиотических и биотических факторов, воздействие которых может нанести механические повреждения. Один из лучших способов выживания, кроме продуцирования

обильного количества семян, — использование вегетативного способа размножения.

Большинство высших животных растут лишь на протяжении определенного этапа развития, то есть обладают детерминированным ростом, и при этом не способны к регенерации органов. Однако у них есть специализированные стволовые клетки, которые используются лишь для регенерации тканей определенного типа. К вегетативному размножению способны только низшие животные, например, кишечнополостные, черви, иглокожие. Что касается позвоночных, то лишь немногие из них способны регенерировать утерянные органы. Например, тритоны могут регенерировать конечности, а некоторые ящерицы способны восстанавливать хвост. Как правило, такие способности связаны со стратегией выживания животных. Они оставляют части своего тела в качестве добычи преследующим их хищникам. Однако восстановить целого тритона из одной лапы невозможно, поскольку у взрослого тритона нет образовательных недифференцированных тканей, состоящих из тотипотентных клеток.

Дифференциация, как неоднократно отмечалось, является следствием эпигенетической регуляции путем стабильной репрессии отдельных участков генома. По ходу реализации генетической программы регуляторные факторы вносят в различные районы хроматина эпигенетические метки, ответственные за репрессию генов раннего развития. На разных стадиях эмбриогенеза (а у растений также и органогенеза) количество репрессированных генов в клетке изменяется, причем их количество увеличивается по мере развития. Состояние хроматина в клетках животных жестко контролируется, и развитие животной клетки протекает только однонаправленно — в сторону специализации (дифференциации). В противоположность этому, процесс развития растений является более пластичным и в большей степени отзывчивым на воздействие биотических и абиотических факторов. У растений, по-видимому, существуют механизмы специфического взаимодействия между программами развития и сигнальными путями, индуцированными внешними стимулами, причем координация таких взаимодействий осуществляется на уровне организации хроматина. То есть под влиянием определенных внешних условий в растительных клетках может быть преодолено репрессивное состояние областей факультативного гетерохроматина, в результате чего осуществляется процесс, обратный дифференциации, и клетка приобретает тотипотентное состояние.

Клонирование растений и животных

На практике соматические клетки растений сравнительно легко можно перевести в недифференцированное состояние, а затем получить из них целый организм. Культуру клеток (или тканей) поддерживают на специальной питательной среде, содержащей углеводы, витамины, ионы металлов, аминокислоты и др. Но главным образом, дедифференциация клеток и образование зачатков нового растения достигается благодаря действию двух основных ростовых гормонов — ауксина и цитокинина. Изменяя соотношение этих гормонов в среде, можно добиться образования каллусной ткани — группы однородных недифференцированных клеток, — а затем формирования новых органов и, наконец, — целого растения.

Культуру животных клеток также можно поддерживать, однако добиться получения недифференцированного состояния практически невозможно (по крайней мере, при современном состоянии биотехнологии). Вполне реально получить культуру делящихся клеток, но эти клетки не будут эквивалентны зиготе, поскольку они не обладают тотипотентностью. Это же можно сказать и о раковых клетках, которые обладают неконтролированным делением, но не могут дать начало новому организму.

Технология клонирования растений не требует применения средств клеточной инженерии. При клонировании животных методы клеточной инженерии становятся необходимыми, потому что воссоздавать искусственную среду, способную перепрограммировать ядро, еще не научились. Однако, известно, что в качестве такой «среды» можно использовать цитоплазму яйцеклетки.

Первые эксперименты по клонированию животных были проведены еще в 40-х годах автором идеи переноса ядер в энуклеированную яйцеклетку Шпеманном со своими сотрудниками. В результате экспериментов удалось показать, что ядра ранних эмбрионов тритонов и морских ежей обладают тотипотентностью: из них можно получить полноценный организм. Позже, в 1952 году, подобные опыты были проведены на амфибиях. При использовании ядер, полученных из клеток ранних эмбрионов, удавалось клонировать взрослый организм, однако реконструированные зиготы с ядром клетки взрослого организма могли развиваться лишь до стадии головастика, а затем погибали.

Первыми млекопитающими, на которых были поставлены эксперименты по клонированию (в 1983 году), были мыши. Извест-

но, что клетки эмбрионов млекопитающих на самых ранних стадиях развития (4–8-ми клеточная стадия) состоят из идентичных клеток и могут быть разделены на отдельные бластомеры, из которых можно получить полноценные организмы (разнояйцевые близнецы). Тем не менее, в опытах с мышами при использовании ядер, полученных из клеток 4-х и 8-клеточных эмбрионов, не удавалось довести развитие реконструированной зиготы даже до стадии бластоцисты.

Во второй половине 80-х годов были достигнуты значительные успехи по клонированию млекопитающих. Были получены клоны многих домашних животных: овцы, козы, коровы, кролика, свиньи, а позже, уже в 1990-х, — приматов. Первые клонированные млекопитающие родились в 1985 году. Это были овцы, полученные из зигот, реконструированных при переносе ядер 8-ми и 16-клеточных эмбрионов. Затем получили потомство коровы и овцы в результате переноса ядер из клеток преимплантационных эмбрионов.

Несмотря на значительные успехи в получении полноценных клонированных животных, наиболее нашумевший эксперимент, известность которого вышла далеко за пределы научного мира, был проведен в 1996 году научной группой Уилмута в Рослинском Институте. Итоги эксперимента были оглашены лишь в феврале 1997 года, когда в журнале Nature было опубликовано сообщение об этой работе. В результате этого эксперимента родились восемь ягнят, полученных из реконструированных зигот. Но почему только овечка Долли приобрела всемирную известность? Дело в том, что Долли была клонирована из ядра клетки взрослого животного, а не эмбриона.

Суть этого эксперимента вкратце была такова. В энуклеированные яйцеклетки овцы методом электропорации были введены ядра из трех предварительно полученных клеточных популяций:

1) преимплантационных 9-дневных эмбрионов;
2) 26-дневных плодов;
3) клеток молочной железы 6-летней овцы (если более точно, это были фибробласты из нижней части вымени овцы, находившейся на четвертом месяце беременности).

Реконструированные ооциты культивировали до стадии морулы/бластоцисты и имплантировали овцам-реципиентам (суррогатным матерям) для вынашивания. В результате эксперимента успешно реконструировали 834 ооцита, из которых родились

8 ягнят. Третья часть зигот (277) была реконструирована при переносе ядер из клеток взрослого животного, и только из одной зиготы удалось получить родившегося ягненка — всемирно известную Долли. Эта овечка ничем не отличалась от других новорожденных ягнят. Впоследствии она нормально развивалась и привела потомство. На втором году жизни Долли родила ягненка, которого назвали Бонни, а через год — еще трех здоровых ягнят.

Многочисленные эксперименты по клонированию животных, в том числе и только что описанный, показывают, что использование ядер клеток с меньшей степенью дифференциации обеспечивает более высокую вероятность успешного клонирования. Это согласуется с данными о состоянии хроматина на разных стадиях развития клетки. Хроматин ядра животной клетки претерпевает последовательные изменения в процессе дифференциации. Все модификации сохраняются и наследуются клонами за счет механизмов клеточной памяти. С каждым очередным этапом дифференциации в хроматине накапливается все большее количество изменений. Поэтому закономерно, что на более ранних этапах развития клетки легче преодолеть механизмы клеточной памяти.

Не удивительно, что получение клонированного животного с использованием ядра взрослого организма оказалось более сложной задачей, по сравнению с аналогичными экспериментами, но с ядрами, взятыми из эмбриональных клеток.

Помимо степени дифференцированности клетки-донора ядра, существуют еще некоторые факторы, с которыми связаны сложности клонирования животных. Поскольку цитоплазма яйцеклетки (реципиента) и ядро клетки-донора взаимно влияют друг на друга, это взаимодействие должно быть согласованным. Нарушение согласованности может привести к анеуплоидии и аномальному развитию ооцита. Наиболее удачным эксперимент получается в случае, если клетка-донор ядра задерживается в фазе G_0. Если же донор находится на стадии **S или** G_2, то его ядра будут проявлять тенденцию к дополнительной репликации ДНК и преждевременной конденсации. Это, как правило, приводит к двум нежелательным эффектам.

Во-первых, вследствие дополнительной репликации нарушается плоидия, то есть изменяется нормальное количество хромосом. Соответственно, развитие реконструированной зиготы будет аномальным и клетка погибнет.

Во-вторых, конденсированный хроматин менее доступен для ремоделирующих факторов, поэтому ядро не сможет быть перепрограммировано и оно, таким образом, не приобретет необходимый статус, характерный для недифференцированной тотипотентной зиготы. В хроматине реконструированного ооцита могут остаться эпигенетические метки, соответствующие состоянию частично или полностью дифференцированной клетки. При сохранении нормальной плоидии такие ооциты смогут делиться, но на определенной стадии их развитие прекратится.

Еще одной проблемой для процесса клонирования может быть особенность развития зиготы, а именно время начала транскрипции генома. Это принципиальный момент, поскольку инициация транскрипции приводит к образованию различных белков, которые могут вмешаться в ремоделирование хроматина. Необходимо не менее двух клеточных циклов без транскрипции, чтобы осуществить ремоделирование хроматина. В противном случае, клетка не успеет завершить процесс дедифференциации. У разных животных транскрипция инициируется на различных этапах. Например, у овец синтез РНК начинается на 8–16-клеточной стадии, а у мышей — на поздней двуклеточной.

Мыши являются достаточно сложным объектом для клонирования, причем по нескольким параметрам. Во-первых, это ранняя инициация транскрипции, а во-вторых, ядра преимплантационных эмбрионов преимущественно находятся в стадии S или G_2. С этим связаны многие неудачи клонирования этих животных.

Молекулярные основы дедифференциации

Процессы дифференциации клеток не полностью изучены, хотя, в целом, этот механизм понятен. В его основе лежит эпигенетическая регуляция, от которой зависит ремоделирование третичной структуры хроматина без изменения первичной структуры генов. В процессе развития многоклеточного организма из одной оплодотворенной яйцеклетки (зиготы) в структуру хроматина вносятся различные ковалентные модификации, служащие эпигенетическими метками, которые определяют дифференцированное состояние клеток. Это состояние наследуется при воспроизводящем делении клеток.

Половые клетки (оогонии и сперматогонии) тоже являются дифференцированными. При созревании они образуют гаплоид-

ные клетки (соответственно, яйцеклетки и сперматозоиды), которые сливаются при оплодотворении, формируя диплоидную зиготу, обладающую свойством тотипотентности. То есть генетическая программа в оплодотворенной яйцеклетке возвращается в некое исходное состояние, позволяющее зиготе начать новый цикл эпигенетического развития, включающего все этапы дифференциации. Каким образом дифференцированные половые клетки способны формировать тотипотентную зиготу? Предполагается, что ключевые механизмы дедифференциации половых клеток происходят во время мейоза.

Известно, что в ооцитах млекопитающих повышается активность гистоновой деацетилазы **HDAC1, тогда как во время** митоза этот фермент не проявляет активности. Поскольку уровень ацетилирования гистонов является одним из основных критериев состояния хроматина, для выяснения механизмов дедифференциации была исследована динамика изменения этого показателя в процессе митоза и мейоза. Исследования были проведены на культуре клеток мышей. Ожидалось, что полученные результаты прольют свет на природу молекулярных событий, сопровождающих дедифференциацию. Результаты исследований отражены в таблице 5.

Оогонии после прекращения митозов и репликации ДНК переходят в премейотическую интерфазу, которая совпадает с периодом их роста. Такие клетки называют первичными ооцитами (ооцитами **I-го порядка). В этот период в ядре происходит конъюг**ация гомологичных хромосом и кроссинговер, а в цитоплазме увеличивается количество органелл. На этом этапе заметных изменений в уровне ацетилирования гистонов не обнаруживается. После первого мейотического деления образуется полярное тельце и ооцит второго порядка. Образование вторичного ооцита сопровождается значительной активацией гистоновой деацетилазы HDAC1, **а гистоны H3** и H4 подвергаются тотальному деацетилированию. Все хвостовые лизиновые остатки, которые несут эпигенетические метки в виде ацетильных групп, деацетилируются (H3/K9, H3/K14, H4/K5, H4/K8, H4/K12, H4/K16). Деацетилированное состояние гистонов сохраняется и в зрелой яйцеклетке после второго деления. Единственным исключением являются H4/K8, так как эти лизины деацетилируются не полностью и какая-то их часть во время мейоза остается в ацетилированном состоянии — H4/acK8. После образования зиготы ацетилированное состояние гистонов H3 и H4 восстанавливается.

Таблица 5. Динамика ацетилирования лизиновых остатков коровых гистонов во время митоза и мейоза (по Jin-Moon et al., 2003, с изменениями)

Гистон/ лизин	Тип клеток								
	ооцит		яйцеклетка	зигота		2-клеточная стадия		бластоциста	
	I порядка	II порядка							
	I	MI	MII	I	M	I	M	I	M
H3/K9	+	–	–	+	+	+	+	+	+
H3/K14	+	–	–	+	+	+	+	+	+
H4/K5	+	–	–	+	–	+	–	+	–
H4/K8	+	±	±	+	+	+	+	+	+
H4/K12	+	–	–	+	+	+	+	+	+
H4/K16	+	–	–	+	+	+	+	+	+

Условные обозначения: «I» — интерфаза; «M» — метафаза; «+» — высокая степень ацетилирования; «±» — средняя степень ацетилирования; «–» — низкая степень ацетилирования или деацетилированное состояние.

В отличие от мейоза, митотические деления сопряжены с незначительным деацетилированием. В разделе «Ацетилирование гистонов» уже отмечалось, что конденсация хромосом сопровождается деацетилированием только лишь по сайту H4/K5. Остальные лизины сохраняют ацетильные группы во время митоза. Предполагается, что некоторые из них, такие как H4/K8, H4/K12, H4/K16, H3/K9 и H3/K14, отвечают за клеточную память, являясь эпигенетическими маркерами активного состояния хроматина.

Глобальное деацетилирование гистонов, которое сопровождает процесс мейоза, является предположительным механизмом (или его частью), направленным на перепрограммирование генома. Сущность этого механизма заключается в том, что информация об активных генах «стирается» путем тотального деацетилирования гистонов. Уничтожение информации о дифференцированном состоянии приводит яйцеклетку в состояние тотипотентности. Остающиеся ацетилированные остатки H4/acK8, вероятно, вовлекаются в механизмы ремоделирования хроматина, которые приводят к запуску нового цикла генетической программы после оплодотворения.

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТОЧНОЙ ПАМЯТИ, СВЯЗАННЫЕ С ПЕРЕСТРОЙКОЙ ДНК

Неизменность первичной структуры генома не является абсолютным правилом для всех живых существ. У ряда прокариот и эукариот обнаружена способность к перестройкам ДНК, которые приводят к изменению первичной структуры. Эти изменения наследуются клеточными клонами. Некоторые из таких перестроек являются обратимыми, но есть и необратимые.

Обратимые перестройки ДНК

Инверсия промотора

Один из самых простых механизмов клеточной памяти обнаружен у энтеробактерий рода *Salmonella*. Механизм связан с инверсией регуляторного участка гена. В ДНК этой бактерии есть участок, состоящий из двух генов, имеющих противоположные направления считывания, и одного регуляторного промоторного фрагмента, расположенного между ними. Как известно, промотор определяет место инициации и направление синтеза РНК. Регуляторный фрагмент, находящийся между двумя генами, может быть инвертирован, то есть повернут на 180°. Инверсия промотора способствует изменению направления транскрипции (рис. 65).

Если в одном из положений промотор обеспечивает транскрипцию гена А, то ген В будет находиться в выключенном состоянии. После инверсии промотора проявляется противоположный эффект: считывается ген В, а ген А — инактивирован.

У *Salmonella* гены А и В кодируют белки оболочки бактериальной клетки двух разных типов. Переключение синтеза белка одного типа на другой направлено на защиту бактерии от иммунной системы организма хозяина. Клеточная стенка паразитирующей бактерии, содержащая новые белки, не будет узнаваться антителами, выработанными против белков старого типа. Поскольку инверсное положение промотора наследуется в последующих поколениях, это дает бактериям возможность выжить и размножиться.

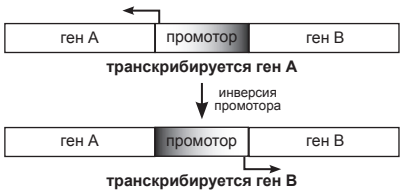


Рис. 65. Инверсия промотора у энтеробактерии *Salmonella*

Кассетный механизм

У почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обнаружен механизм клеточной памяти, получивший название кассетного. Клетки этих грибов могут иметь один из двух возможных половых типов. Половой тип определяется двумя генами *a* и α. Однотипные клетки не способны к конъюгации, однако гаплоидные дрожжевые клетки способны периодически переходить из одного типа в другой.

В клетке может транскрибироваться только один из генов, определяющих половой тип. Участок генома, в котором локализуются гены полового типа, устроен следующим образом (рис. 66). В нем располагается специфический локус, в котором один из генов находится под контролем активного промотора. Копии каждого из генов находятся в дремлющем неактивном состоянии в соседних нетранскрибируемых локусах. При переходе к другому половому типу на матрице одного из дремлющих генов образуется его копия. Ген, который располагался в специфическом локусе, вырезается и деградирует, а вновь образованная копия встраивается в специфический локус и начинает экспрессироваться.

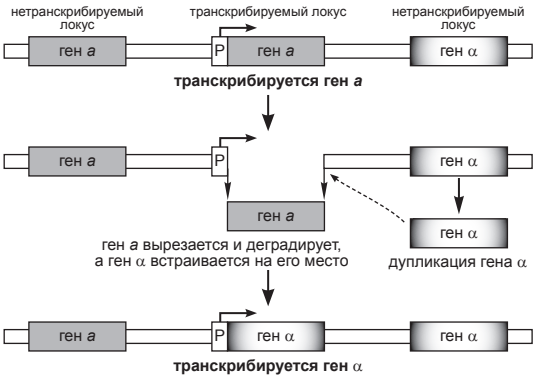


Рис. 66. Кассетный механизм у *Saccharomyces cerevisiea*

Другой пример кассетного механизма обеспечивает способность трипаносом изменять структуру и свойства главного белка своей наружной оболочки. Эти кинетопластные одноклеточные являются возбудителями опасных заболеваний теплокровных животных. Кассетный механизм трипаносом способствует лучшей их выживаемости, поскольку изменение свойств наружного белка «обманывает» иммунную систему хозяина.

Обратимые перестройки генома по типу инверсного или кассетного механизмов не обнаружены у высших эукариот, хотя не исключено, что они могут играть определенную роль в возникновении устойчиво наследуемых изменений экспрессии генов развивающимися соматическими клетками.

Необратимые перестройки ДНК

У некоторых организмов были обнаружены необратимые перестройки, в результате которых *элиминируется часть ДНК*. Такие делеции обнаружены у примитивных эукариот, например, у аскариды и вислоногих рачков циклопов. На ранних этапах развития этих организмов (после нескольких циклов дробления зиготы) у всех клеток, кроме одной, вырезаются и деградируют специфические участки гетерохроматина. Вероятно, эти участки содержат гены, необходимые только для раннего развития. Единственная клетка, которая сохраняет интактную ДНК, впоследствии дает начало половым клеткам. Все соматические клетки в процессе делеции лишаются около половины ДНК, содержащейся в зародышевых. Участки гетерохроматина, которые удаляются из генома, могут занимать концы хромосом (например, у *Cyclops divulsus*) или быть рассеянными по всей хромосоме (*Cyclops strenuum*) (рис. 67). Во втором случае вырезание гетерохроматиновых участков ДНК напоминает удаление интронных участков первичных транскриптов при сплайсинге мРНК. После удаления отдельных участков целостность хромосом восстанавливается.

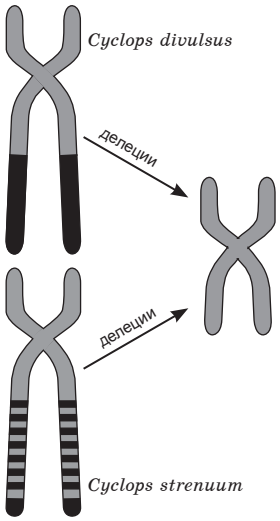


Рис. 67. Делеции части генома у вислоногих рачков. Черным цветом обозначены удаляемые области хромосом

Необратимые перестройки генома можно обнаружить и у высших животных. В отличие от аскарид и циклопов, у млекопитающих геномные перестройки происходят не во всех клетках, а, например, в развивающихся В-лимфоцитах. Эти перестройки связаны с развитием иммунной реакции. В-лимфоциты млекопитающих способны синтезировать огромное количество антител. На воздействие любого антигена организм отвечает выработкой специфического антитела. Каждый отдельный клон В-лимфоцитов синтезирует один тип антитела. Сталкиваясь с соответствующим антигеном, В-лимфоцит через определенный (латентный) период начинает продуцировать против него антитела. Спустя некоторое время выработка антител сходит на нет и иммунная

реакция затухает. В отсутствии антигена этот лимфоцит продуцирует с очень низкой скоростью антитела мембранного типа. Если происходит повторная встреча лимфоцита с антигеном, латентный период сокращается, активность выработки антител превышает первоначальную, а затухание реакции происходит медленнее. В-лимфоцит способен к делению, а его клоны обладают способностью к синтезу того же типа антител. Иммунная память поддерживается за счет нескольких механизмов. Один из них заключается в том, что гены, кодирующие антитела, при развитии лимфоцита подвергаются перестройке.

Антитело состоит из двух тяжелых и двух легких цепей. Цепи содержат константные и вариабельные области. Вариабельные участки цепей кодируются целым набором нуклеотидных последовательностей. Легкая цепь имеет 100 вариантов участка V **и 10** вариантов участка **J. Причем существует 5 различных способов** соединения **J- и V-участков. Получается, что в организме млекопитающих** возможен синтез 5×10^3 вариантов легких цепей. Что касается тяжелых цепей, то они имеют 100 вариантов участка V, 10 — **J и 50 — D. Кроме того, соединение участков V/J и J/D мо**жет быть осуществлено 10 разными способами. Таким образом, теоретически возможен синтез $2{,}5\times10^6$ вариантов тяжелых цепей. Поскольку легкие и тяжелые цепи могут комбинироваться, то всего организм способен продуцировать около 10^{10} различных антител. В процессе созревания В-лимфоцита области, кодирующие цепи антител, подвергаются рекомбинациям или делециям. В результате зрелый лимфоцит содержит в геноме информацию об одном варианте антитела, которая устойчиво наследуется в клонах данного лимфоцита.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ У ЭУКАРИОТ

Большая часть генов эукариот инактивирована за счет тотального репрессирующего механизма, то есть они находятся в области гетерохроматина. Молчащие гены не могут быть активированы без ремоделирования хроматина, так как их промоторы не доступны для РНК-полимераз и регуляторных белков. Поэтому в клетке возможна активация только тех генов, которые локализуются в деконденсированных участках генома — эухроматине. Лишь в некоторых случаях возможно транскрибирование гетерохроматиновых участков генома, в том числе сателлитной ДНК.

Как и в случае бактериальных генов, гены эукариот имеют базальный уровень активности, проявляемый в отсутствие активаторов (у бактерий этот уровень проявляется, наоборот, в присутствии репрессоров). Но, как правило, интенсивность такой экспрессии крайне невелика, хотя и может обеспечить присутствие незначительных количеств продуктов (белков, РНК), что в ряде случаев является принципиальным.

Активация экспрессии генов в эукариотических клетках осуществляется преимущественно путем позитивной регуляции, но возможен и негативный контроль. Существует множество разнообразных семейств специфических белков-активаторов, которые связываются с регуляторными участками промоторов определенного набора генов и обеспечивают сборку на них преинициаторного комплекса, стимулируя процесс экспрессии этих генов. Такие регуляторные белки принято называть специфическими **транскрипционными факторами**, или ***транс*-активными факторами**. Приставка «*транс*» во втором термине указывает на то, что данный фактор кодируется одним геном, а регулирует активность другого.

Участки промотора, связываемые транскрипционными факторами, содержат особые последовательности, которые называют ***цис*-активными элементами**. В данном случае приставка «*цис*»

предполагает принадлежность этой последовательности регулируемому гену. Каждый транскрипционный фактор строго соответствует определенной группе генов и связывается с их промоторами с высокой степенью специфичности.

Промоторы эукариотических генов имеют, как правило, множественные участки связывания со специфическими транскрипционными факторами. Расположение в промоторе *цис*-элементов может быть различным. Они могут непосредственно примыкать друг к другу или быть разделены промежуточными последовательностями длиной от нескольких пар нуклеотидов до нескольких тысяч. Промотор имеет сложную трехмерную структуру, благодаря чему удаленные участки могут быть пространственно близки друг к другу, а факторы, связывающие такие участки, могут взаимодействовать между собой. Транскрипционные факторы, в свою очередь, также принимают участие в формировании пространственной структуры промоторной области.

Участие нескольких специфических факторов в регуляции экспрессии отдельного гена позволяет осуществлять тонкую настройку его активности, учитывая качественные и количественные характеристики совокупности внешних и внутренних сигналов, которые воспринимает клетка.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ НА УРОВНЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Регуляция транскрипции может осуществляться за счет изменения пула активных **транскрипционных факторов** (активаторов и репрессоров) в ядре в ответ на внешний сигнал или в течение клеточного цикла. Это достигается различными способами.

1. Синтез *транс*-факторов de novo

Активация большого числа генов сопровождается синтезом *транс*-активных факторов, причем часто наблюдается последовательная активация синтеза нескольких транскрипционных факторов. В такой системе регуляции под действием внешнего сигнала в первую очередь активируются гены, кодирующие транскрипционные факторы, а во вторую — собственно функциональные белки. Система регуляции путем последовательной активации синтеза нескольких транскрипционных факторов дает сравнительно небольшую задержку внутриклеточного сигнала

(внешний сигнал – эффект), однако оказывает при этом усиливающий эффект. Активация экспрессии одного гена, как правило, приводит к неоднократной транскрипции, причем каждый образованный транскрипт после сплайсинга может служить матрицей для синтеза множества молекул белка. Резкое повышение количества регуляторных белков оказывает значительный эффект на дальнейшие события.

Пример. Большинство функциональных генов, которые активируются в ответ на воздействие растительного гормона этилена, контролируются транскрипционными факторами, которые принято называть EREBP (*ERE-binding proteins*), то есть белки, связывающие этилен-чувствительные *цис*-активные элементы (ERE — *ethylene response element*). Как правило в нестимулированных этиленом растительных клетках *транс*-факторы EREBP отсутствуют или их концентрация слишко низка, чтобы оказывать заметное влияние. Вместе с тем, в клетках всегда присутствует незначительный пул транскрипционных факторов (EIN3 и родственных ему белков EIL1 и EIL2), которые при воздействии этилена активируют гены факторов этиленового ответа *ERF* (*ethylene response factor*), кодирующих *транс*-факторы EREBP. Во вторую очередь активируются этилен-чувствительные гены, активируемые факторами EREBP.

2. Деградация существующих факторов

Направленный протеолиз транскрипционных факторов, который сопровождается синтезом других регуляторов, позволяет быстро изменить соотношение активаторов и репрессоров транскрипции. Поскольку транскрипционные факторы с разнонаправленным действием часто являются конкурентами за сайты связывания промоторов, это позволяет значительно повысить конкурентоспособность в пользу вновь синтезированных регуляторов. Данный механизм осуществляется с участием убиквитинирующей лигазы и 26S-протеосомы. Под действием определенного сигнала соответствующие транскрипционные факторы подвергаются убиквитинированию, а затем разрушаются 26S-протеосомой. Белки, которые подвергаются направленному протеолизу, обладают особой аминокислотной последовательностью, необходимой для опознавания компонентами убиквитинирующей лигазы. Мутации в этом районе молекулы приводят к повышению стабильности белка, и, соответственно, это приводит к нарушению регуляторных механизмов.

Пример. Транскрипция большой группы ауксин-зависимых генов у растений активируется гомодимером транскрипционного регулятора ARF (auxin response factors). Помимо образования гомодимеров ARF способны образовывать гетеродимеры с транскрипционными репрессорами Aux/IAA.

Предполагается, что регуляторы ARF постоянно занимают место на промоторах ауксин-чувствительных генов в области ARE (*auxin response elements*), однако собственно активация таких генов зависит от того, какие димеры будут образовывать связанные с ДНК ARF. Активной структурой является гомодимер ARF–ARF. Он обеспечивает посадку на промотор РНК-полимеразы II и способствует инициации транскрипции. Наличие на промоторе гетеродимерной структуры Aux/IAA–ARF, наоборот, предотвращает экспрессию гена.

В отсутствии ауксинового сигнала в растительных клетках молекулы Aux/IAA присутствуют в высоких концентрациях, и поскольку они конкурируют с ARF за образование димеров, то происходит замещение одной молекулы ARF в гомодимере на Aux/IAA. По этой причине подавляющее большинство ARE-содержащих промоторов связаны с гетеродимерами Aux/IAA–ARF и пребывают в неактивном состоянии. Стимуляция клеток ауксином приводит к дестабилизации молекул Aux/IAA, которые убиквитинируются и вовлекаются в протеолиз. Уровень Aux/IAA под действием ИУК значительно снижается, а это способствует образованию гомодимеров ARF–ARF, связанных с ARE-содержащими генами. Так происходит ауксин-индуцируемая активация экспрессии генов.

3. Модуляция активности транскрипционных факторов

Наличие в клетке регуляторов транскрипции еще не обеспечивает необходимого уровня транскрипции, поскольку они могут быть в неактивном состоянии. Модуляция активности *транс*-факторов может осуществляться различными способами: например, в результате ковалентной модификации (присоединения или удаления групп, частичного протеолиза) или путем связывания *транс*-факторов с аллостерическими регуляторами (ионами, белками или веществами гормональной природы) посредством слабых взаимодействий. Фосфорилирование/дефосфорилирование является наиболее часто используемым способом модуляции активности транскрипционных факторов.

Пример. Существует значительное количество различных протеиновых киназ и фосфатаз, которые фосфорилируют транскрипционные факторы. Среди этих ферментов можно выделить широкораспространенные протеинкиназы А (ПКА), которые регулируются через аденилатциклазную регуляторную систему. В неактивном состоянии протеинкиназы А существуют в виде тетрамеров — C_2R_2, которые состоят из двух каталитических (С) и двух регуляторных (R) субъединиц. Каждая R-частица имеет два участка связывания cAMP. В результате присоединения 4-х молекул cAMP к двум регуляторным субъединицам изменяется конформация последних, что способствует диссоциации тетрамера. Это приводит к высвобождению двух отдельных каталитически активных субъединиц. В ряде эндокринных клеток каталитические субъединицы ПКА транслоцируются в ядро и фосфорилируют транскрипционный фактор CREB. Фосфорилированный CREB взаимодействует с CREB-связывающими белками и формирует комплекс, который связывается со специфическими участками промотора определенных генов, и стимулирует на них сборку преинициаторного комплекса.

Следует заметить, что фосфорилирование *транс*-факторов может осуществляться не только путем киназных реакций, но и в результате фосфорелейного механизма. Этот механизм, например, функционирует в двукомпонентной многошаговой регуляторной системе растений, которая активируется гормоном цитокинином. В данной регуляторной системе участвует группа транскрипционных факторов, которых относят к регуляторам ответа В-типа (RR-B — *response regulator B-type*). Регуляторы ответа состоят из двух основных доменов. Регуляторный домен или получатель (receiver домен) и эффекторный — output домен. Регуляторный домен содержит остаток аспарагиновой кислоты, который фосфорилируется гистидиновой фосфотрансферазой при переносе фосфатной группы от гистидиновой киназы. Эффекторный домен содержит ДНК-связывающий мотив, через который RR-B связываются с промоторами цитокинин-регулируемых генов. В нефосфорилированном состоянии RR-B являются неактивными, но после присоединения фосфата к остатку аспарагиновой кислоты receiver домена приобретает способность активировать экспрессию генов.

Взаимодействие факторов транскрипции с белками описано выше на примере факторов ARF и Aux/IAA, участвующих в регуляции ауксин-чувствительных генов.

4. Задержка в цитоплазме факторов транскрипции

Транскрипционные факторы в цитоплазме связываются со специфическими белковыми факторами, которые маскируют у *транс*-факторов сигнальную последовательность ядерной локализации. Ассоциация и диссоциация этих белков контролируется, как правило, уровнем фосфорилирования удерживающего белка. Активация факторов транскрипции из пула неактивных цитоплазматических комплексов обеспечивает быструю индукцию транскрипции в ответ на внешние регуляторные сигналы.

Пример. Большинство ядерных рецепторов локализуются непосредственно в ядре. Однако рецепторы стероидов в неактивном состоянии могут находиться в цитоплазме, как правило, в растворимом состоянии. При отсутствии соответствующего лиганда стероидные рецепторы связываются с шаперонами, которые экранируют ДНК-связывающий домен рецепторов. Шапероны, с одной стороны, затрудняют транспорт рецептора в ядро, а с другой — препятствуют его удержанию в ядре, вследствие того, что они маскируют ДНК-связывающий домен. Различные виды стероидных рецепторов специфически связываются с шаперонами определенного типа. Например, рецепторы стероидных гормонов GR, MR, PR и AR взаимодействуют с белком теплового шока Hsp90. Шаперон Hsp90 помимо удержания рецептора в цитоплазме также способствует связыванию лиганда с неактивным рецептором. При взаимодействии с гормональным лигандом комплекс рецептор–шаперон диссоциирует, а рецептор диффундирует в ядро, где выполняет роль транскрипционного фактора.

5. Взаимодействие транскрипционных факторов

Специфические транскрипционные регуляторы вступают в разнообразные взаимоотношения друг с другом. Они могут иметь аддитивный, синергистический, а также антагонистический характер. Активаторы и репрессоры транскрипции часто конкурируют за одни и те же участки связывания промотора. Кроме того, участки связывания пары антагонистов могут не совпадать полностью, но перекрываться таким образом, что связывание одного регулятора не дает возможности взаимодействия промотора со вторым. Синергисты связывают различные регуляторные участки, и часто кооперативно взаимодействуют друг с другом, то есть посадка одного регулятора на промотор облегчает присоединение другого.

Пример. Взаимодействие факторов транскрипции рассмотрим на примере факторов, участвующих в регуляции гиббереллин-активируемых генов растений.

В промоторах гиббереллин-активируемых гидролазных генов в клетках алейронового слоя семян ячменя выявлены несколько районов, существенных для регуляции экспрессии. Совокупность всех этих участков называют гиббереллин-чувствительным комплексом, или GARC (GA-response complex). Функциональный анализ гиббереллин-активируемых генов позволил выявить несколько регуляторных мотивов, характерных для промоторов гиббереллин-чувствительных генов: элемент гиббереллинового ответа (GARE — GA-response elements — TAACAAA), пиримидиновый бокс (C/TCTTTT), TATCCAC бокс, CAACTC бокс и Box1/O2S-подобный элемент. По-видимому, только GARE и пиримидиновый бокс являются обязательными компонентами GARC. Остальные мотивы присутствуют в промоторах в разных сочетаниях. Различия в промоторах гиббереллин-регулируемых генов, вероятно, связаны с количественными и качественными характеристиками гиббереллинового ответа.

Каждая из обнаруженных последовательностей связывается специфическими транскрипционными факторами, которые оказывают как активирующее, так и репрессирующее действие. Известно, что GARE и пиримидиновый бокс специфически связываются репрессорами и активаторами, которые конкурируют за одни и те же последовательности. В неактивном состоянии участок GARE связан репрессором транскрипции HRT, а пиримидиновый бокс — с димером белка BPBF.

При стимуляции клеток гиббереллином активируются MYB-гены, кодирующие транскрипционный активатор GAMYB, который является антагонистом HRT, то есть конкурирует с ним за GARE-мотив. Также в ответ на действие гормона в ядре повышается концентрация белка SAD, который в гомодимерной форме вытесняет димеры BPBF из пиримидинового бокса. По существующей модели считается, что активатор GAMYB может взаимодействовать с SAD и BPBF, но для активации гиббереллин-чувствительных генов принципиальное значение имеет комбинация факторов SAD–GAMYB. Комбинация BPBF–GAMYB даже в отсутствие репрессора HRT делает невозможным сборку преинициаторного комплекса на промоторе гиббереллин-активируемых генов.

РОЛЬ МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Сборка транскрипционного комплекса зависит, главным образом, от связывания промотора транскрипционными факторами, однако следует отметить, что эффективность взаимодействия *транс*-факторов с *цис*-элементами во многом определяется состоянием нуклеосом. Таким образом, одним из событий, связанных с активацией экспрессии генов, является избирательная модификация нуклеосомных гистонов, в результате которой соответствующие участки генома становятся более «привлекательными» для *транс*-факторов.

В настоящее время известно, что роль гистонового кода может проявляться не только в долговременном поддерживании транскрипционно активного состояния различных участков генома и его наследовании в клеточных клонах. Многие исследования показывают, что некоторые кратковременные изменения транскрипционной активности также могут сопровождаться модификацией гистонов. Пока еще нет достаточного количества материала для формулирования концепции универсального гистонового кода, вовлеченного в индукцию транскрипционной активности. Тем не менее, существуют неопровержимые доказательства того, что **инициация транскрипции генов сопровождается строго определенными комбинациями ковалентных модификаций гистонов**, причем при активации разных генов вовлекаются различные наборы модификаций.

В качестве примера рассмотрим значение посттрансляционных модификаций гистонов при активации генов человека *IFN*-β и *pS2* (табл. 6).

Таблица 6. Модификации гистонов, вовлеченные в формирование транскрипционных комплексов при активации генов человека *IFN*-β (по Agalioti T., Chen G., Thanos D., 2002) и *pS2* (по Daujat et al., 2002). Для гена *pS2* указана последовательность модификаций

Фермент	Индуктор	Модификации гистонов		
IFN-β	вирусная инфекция	ацетилирование H4/K8, H3/K9, H3/K14		
pS2	стимуляция эстрогеном	1) ацетилирование H3/K18	2) ацетилирование H3/K23	3) метилирование H3/R17

Активация человеческого гена *IFN*-β в ответ на вирусную инфекцию сопровождается ацетилированием трех лизиновых остатков: **H4/K8, H3/K9 и H3/K14.** Как оказалось, все эти модификации были необходимы для взаимодействия нуклеосомы с активирующими комплексами. Связывание осуществлялось через белковые субъединицы, имеющие бромодомены (**H4/**acK8 связывался с комплексом **SWI/SNF, а H3/acK9 и H3/**acK14 — с TFIID, **через двойной** бромодомен субъединицы **TAFII250).** В дальнейшем активирующие комплексы стимулируют сборку транскрипционного комплекса, включающего РНК-полимеразу.

В некоторых случаях исследователям удалось продемонстрировать, что инициация транскрипции вовлекает каскад последовательных событий, каждое из которых зависит от предшествующего и определяет последующее. Ковалентные модификации в определенных сайтах гистоновых хвостов стимулируют (или облегчают) связывание: 1) следующих ферментов, модифицирующих другие гистоны, или 2) очередных элементов, участвующих в сборке транскрипционного комплекса. Такую последовательность наблюдали при активации гена *pS2* эстрогеном. Через 15 минут стимуляции эстрогеном в клетках активировалась гистоновая ацетилтрансфераза **CBP, ацетилирующая H3/K18. Только** после этого события происходит ацетилирование **H3/K23, а затем** вовлечение аргининовой гистоновой метилтрансферазы **CARM1,** которая метилирует **H3/R17.** Завершаются последовательные модификации сборкой транскрипционного комплекса.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ К ГЛАВЕ 3

Особенности регуляции экспрессии эукариотических генов

1. Опишите основные различия в структуре генома эукариот и прокариот.
2. Почему активность экспрессии генов зависит от структуры хроматина?
3. В чем заключаются основные различия в механизмах регуляции экспрессии генов у прокариот и эукариот?
4. Что такое эпистатическое взаимодействие генов и в чем оно выражается?
5. Какие особенности регуляции экспрессии генов у эукариот определяются структурой хроматина?

Структура и функциональное состояние хроматина

1. Чем хроматин эукариот отличается от прокариотического?
2. Что такое гетерохроматин и эухроматин?
3. Какие существуют представления о возникновении и роли гетерохроматина?
4. Существуют ли в геноме современных эукариот транспозонные элементы и какое они имеют значение?
5. Объясните различие между конститутивным и факультативным хроматином.
6. Что Вам известно о роли гетерохроматина?
7. Для чего нужна избирательная конденсация хроматина?
8. Как изменяется третичная структура хроматина в процессе дифференциации клеток?
9. Чем отличается хроматин различных специализированных клеток многоклеточного организма?
10. Что такое эпигенетическая регуляция?
11. Объясните, как Вы понимаете термин «сайленсинг».
12. Какие Вы знаете молекулярные признаки состояния хроматина?
13. Какие элементы хроматина можно использовать в качестве маркеров его состояния?
14. Что Вам известно о структурных особенностях хроматиновых белков?
15. Что такое бромодомены и хромодомены? Для каких белков характерны эти структурные элементы?
16. Чем отличаются активная и репрессированная Х-хромосомы в клетках женского организма млекопитающих?

17. Что такое Х-инактивационный центр?
18. Какую функцию выполняют РНК Xist и Tsix?

Механизмы клеточной памяти

1. Чем отличается воспроизводящее деление клеток от дифференциального?
2. Приведите примеры воспроизводящего и дифференциального деления клеток.
3. Какими механизмами должны обладать клетки для наследования дифференцированного состояния?
4. Как клеточные клоны «запоминают» свою «специализацию» после дифференциации?
5. Что такое клеточная память?
6. Какие механизмы обеспечивают клеточную память?
7. Как Вы понимаете термин «эпигенетическая информация»?
8. Что такое гистоновый код?
9. Каким посттрансляционным модификациям подвергаются нуклеосомные гистоны?
10. Какие сайты ковалентной модификации гистоновых белков Вы знаете?
11. Какими ферментами устанавливается гистоновый код?
12. Какие модификации гистонов имеют принципиальное значение для поддержания структуры хроматина?
13. Все ли модификации обеспечивают наследование структуры хроматина?
14. Как ацетилирование гистонов влияет на структуру хроматина?
15. Какое значение имеет метилирование гистонов?
16. Что такое убиквитинирование гистонов?
17. Почему процесс убиквитинирования важен для ремоделирования хроматина?
18. Какой гистон имеет наибольшее количество сайтов фосфорилирования?
19. Какое значение имеет фосфорилирование гистона H1 в процессах деления клетки?
20. Почему гистоновый код следует рассматривать как комбинацию модификаций?
21. Как образуются новые нуклеосомы? Значение фактора сборки хроматина **CAF1?**
22. Какую роль выполняет цитоплазматическая гистоновая ацетилтрансфераза (HAT) B-типа?

23. Какое значение имеют негистоновые белки в наследовании структуры хроматина?
24. Что такое ремоделирование хроматина?
25. Как осуществляется активация хроматина?
26. Какие механизмы репрессии хроматина Вам известны?
27. Какое значение имеет метилирование ДНК?
28. Какие существуют предположения о возникновении и эволюции процесса метилирования цитозина?
29. Объясните, почему 5-метилцитозин обладает мутагенными свойствами.
30. Как в геноме распределены метилированные участки ДНК?
31. Можно ли метилированные цитозины считать эпигенетическими метками и почему?
32. Как осуществляется механизм наследования схемы метилирования ДНК?
33. Что Вам известно о взаимодействии ферментов и регуляторных белков, участвующих в установлении и расшифровке гистонового кода?
34. Является ли механизм метилирования ДНК универсальным и как можно объяснить отсутствие процессов метилирования ДНК у некоторых эукариот?
35. Что такое тотипотентность?
36. Обоснуйте возможность клонирования многоклеточных организмов.
37. Что такое дедифференциация?
38. Какие механизмы лежат в основе дедифференциации?
39. Почему клонировать растения значительно легче, чем животных?
40. Что такое реконструированная зигота?
41. Какую роль играет цитоплазма реконструированной зиготы в процессах дифференциации?
42. Чем обусловливаются неудачи в клонировании отдельных видов млекопитающих?
43. С помощью какого механизма стираются эпигенетические метки?
44. Что Вы знаете о механизмах клеточной памяти, связанных с перестройкой ДНК?
45. Опишите обратимые перестройки ДНК (инверсия промотора, кассетный механизм).
46. У каких организмов клеточную память обеспечивают необратимые перестройки ДНК?

Регуляция транскрипции у эукариот

1. Что такое *цис*-активные элементы и *транс*-активные факторы?
2. Какими способами контролируется активность транскрипционных регуляторов?
3. Какие возможны взаимодействия между факторами транскрипции?
4. Какова роль модификации гистонов в инициации транскрипции?

УКАЗАТЕЛЬ ТЕРМИНОВ

А

аденилатциклаза 137
аденин 35, 55, 76, 80, 185
аденозин 95
5-азацитидин 188
аллолактоза 135, 136
амилоза 8
амилопектин 8
аргинин 74, 165, 166
аттенуатор 141, 142
аттенуация 139–143
ацетилтрансфераза гистоновые (HAT) 169, 212
  ацетилтрансфераза гистоновая B-типа (цитоплазматическая) 175

Б

ρ-белок 84, 85; *см. также* ρ-фактор
белок, активирующий катаболитный ген (БАК); *см.* CAP
бластоциста 199
блок Прибнова; *см.* Прибнова блок
блок Хогнесса; *см.* Хогнесса блок

Г

гемицеллюлозы 8
геном 17, 45–47, 70, 103, 128, 142, 152, 153, 163, 172, 183
генотип 4, 5
гены 23, 42, 66, 69–74, 102, 112, 113, 134, 137, 138, 185, 186, 200
  локус цветения C (FLC) 180
  моноцистронные 70, 73
  независимые 72, 84
  опероны
    lac-оперон 76, 134–138
    trp-оперон 138–143
  перекрывающиеся 74
  прерывистые 73
  транскриптон 72
гиббереллин-чувствительный комплекс 210
гираза 130
гистидиновая фосфотрансфераза 208
гистон
  H1 40–43, 172
  H2a 40, 41, 165, 166, 170, 174
  H2b 39–41, 165, 166, 170–174
  H3 40, 157, 158, 160, 165–181, 198, 199, 211, 212
  H4 39, 40, 157, 158, 165–176, 181, 198, 199, 211, 212
гликоген 8
гликогенфосфорилаза; *см.* фосфорилаза гликогена
глицин 14, 21, 142
гормоны
  стероидные 209
  цитокинин 194
гуанин 35, 80, 183
гуанозин 95, 108

Д

деацетилаза гистоновая (HDAC) 170, 179, 180, 188, 189, 198
дедифференциация 191, 194
дифференциально метилированные районы 186
дифференциация 178
ДНК 5, 6, 11, 14–18, 35–42, 47–70, 74, 76, 80–84, 86, 89, 91, 108, 111, 121, 128–131, 135, 136, 148, 151–159, 162, 164–191, 196, 198, 200, 202, 204, 209
  сателлитная 154, 186, 204
ДНК-лигаза 58
ДНК-полимераза
  ДНК-полимераза III 54, 57
домен
  HPt; *см.* гистидиновая фосфотрансфераза
  бромодомен 158, 212
  хромодомен 180

дрожжи 25–27, 30, 32, 65, 66, 106, 112, 158, 168, 171, 173, 201

З

закрытый двойной комплекс 83
зигота 161, 192–199, 202

И

индуктор 132–134
инсулятор 79
интрон 73, 86, 96–98, 101, 106–108, 112

К

кальмодулин 7
клонирование 191, 192, 196, 197
код
  гистоновый 165, 167, 175, 189, 211
  эпигенетический 18, 167
комплекс, определяющий вырезание интрона 99
кор-фермент 82, 83
корепрессор 132–134
кэп 96
лактоза 134, 135, 136, 137
лактозный оперон; *см.* гены/опероны/lac-оперон
лиганд 209
лизин 40, 41, 58, 74, 108, 142, 158, 165–173, 180, 199

М

матрица 9, 10, 13, 14, 35, 54, 57, 63, 65, 68, 80, 84, 86, 91
мейоз 198, 199
мессенджеры (низкомолекулярные сигнальные посредники)
  cAMP 137, 138, 208
7-метилгуанозин 95
метилтрансфераза гистоновая (HMT) 122, 169, 180, 182, 187–190
5-метилцитозин 183, 185
митоз 43, 151, 159, 164, 168, 172, 177, 179, 188, 198, 199
мобильные генетические элементы 152, 183
«Модель тромбона» 59

Н

нонсенс-супрессия 26, 27, 30, 33
нуклеоид 38
нуклеосома 40, 41, 60, 122, 156, 165, 166, 169–179, 188, 211, 212

О

обратная транскриптаза 15, 65; *см. также* ревертаза
оогонии 197
ооцит 42, 195, 197–199
оператор 72, 132, 135, 136, 139
опероны 132–139, 144, 145, 149
открытый двойной комплекс 83

П

палиндром 48, 84, 85, 114, 140
пектиновые вещества 8
пептидил-тРНК 27
пирофосфатаза 54
праймер 57, 58, 59, 60, 63
преинициаторный комплекс 78, 89, 90, 95, 204, 208, 210
Прибнова блок 76, 77, 78
пролин 21
промотор 70–72, 75–77, 82, 83, 87, 112, 132–134, 137–139, 186, 200, 201, 204, 211
протеинкиназы
  протеинкиназа A 208

Р

ревертаза 15
регуляторы ответа (RR) 208
регуляция
  аутогенная 145
  эпигенетическая 197
ремоделирование хроматина 171, 197
репликационный глаз 57
репликация 37, 61, 131
ретротранспозоны 152
рецепторы ядерные 209
рибулозобисфосфаткарбоксилаза 102
РНК
  sat-транскрипты 80, 81
  Tsix 160–162
  Xist 160–162
  гетерогенная ядерная 94, 97
  малые интерферирующие РНК 69, 81, 116–120, 182
    miРНК 80, 116–121
    siРНК 80, 81, 116, 120–122, 182
  малые цитоплазматические РНК 80, 115
  малые ядерные РНК 80, 99, 100, 110, 111
  малые ядрышковые РНК 72, 80, 81, 109, 111, 113
    boxC/D 113, 114
    boxH/ACA 113–115

матричная (информационная) 9, 16, 17, 26, 53, 68, 69, 73, 80, 81, 86, 93–96, 101–104, 115, 116, 119–121, 144, 145, 202
рибосомная (рРНК) 72, 73, 80, 106, 108, 109, 112, 114, 115, 145, 186
транспортная (тРНК) 27, 72, 73, 80, 104–107, 109
РНК-праймаза 57, 59
РНК-редактирование 17, 93, 106
РНК-эдитинг; *см.* РНК-редактирование
РНКаза
Dicer 118, 120, 182
РНКаза D 106
РНКаза P 106, 108, 109

С

сайленсинг (генов) 155
серин 27, 41, 43, 165, 166, 171, 172
спейсер 47
сперматогонии 197
сперматозоид 198
сплайсинг 16, 17, 73, 93, 96–98, 101–103, 106–108, 112, 206
альтернативный 101, 103
сплайсосома 97–101
стоп-кодон 26, 27, 74

Т

TATA-блок 77, 88, 89
TATA-связывающий белок 88
теломера 64, 65, 67
теломераза 64-66, 111
терминатор
ρ-зависимый 140
ρ-независимый 86, 138, 140–142
тимин 35, 183
топоизомеразы
топоизомеразы I 51
топоизомеразы II 51, 129
точка начала репликации 48
транскрипционные факторы 75, 103, 149, 150, 164, 179, 205–210
транспозоны 121, 152, 153, 183
триптофан 138–143
триптофановый оперон; *см.* trp-оперон

У

убиквитин 41, 166, 170, 171
убиквитинирование 170, 171
уридин 80, 141, 151, 183

Ф

ρ-фактор 84, 86
σ-фактор 82, 83
фактор сборки хроматина CAF1 173
факторы, ассоциированные с TBP 87
факторы транскрипции
общие факторы транскрипции 87, 88; *см. также* GTFs
репрессор транскрипции 210
специфические активаторы транскрипции 87, 88, 204, 210
ARF (auxin response factors) 207
EREBP (ERE-binding proteins) 206
фенотип 4, 27, 69
фосфодиэстераза 137
фрагменты Оказаки 57, 60, 108

Х

Хогнесса блок 77
холофермент 82, 83
хроматин
гетерохроматин 148–159, 169
конститутивный 66, 154
факультативный 154
эухроматин 149

Ц

целлюлоза 8
цис-активные элементы 71, 204, 206
ARE (auxin response elements) 207
ERE (ethylene response element) 206
цис/транс тест 69
цистрон 69, 70
цитозин 35, 55, 80, 148, 157, 160, 167, 183, 185, 187–190
шаперон 7, 32, 33, 209

Э

экзон 16, 73, 97, 98, 101, 108
экспрессия генов 11, 40–44, 52, 66, 68, 70–72, 76, 77, 86, 111, 120, 121, 128–139, 144, 146, 148–150, 152–154, 156, 160–164, 169, 170, 176–180, 183, 201, 204, 206, 211
энхансер 78, 79
эпигенез 155, 168

Я

яйцеклетка 191–199
энуклеированная 191, 194

A

ADP 58
AMP 58, 108, 137
Arabidopsis 173, 180
ATP 32, 51, 58, 74, 108, 129, 130, 137, 173, 174, 179, 189

C

CAAT-блок 78
Caenorhabditis elegans 190
CAP 137, 138
CHROMOMETHYLASE3 189
Cucurbita maxima 121
Cyclops divulsus 202
Cyclops strenuum 202

D

Drosophila melanogaster 73, 153, 172, 190

E

eRF-1 27
eRF-3 26, 27
Escherihia coli 72, 73, 81, 82, 86, 108, 129, 134, 138, 144, 186

G

GDP 108
GTFs (транскрипционные факторы общие) 87
GTP 108

H

HP1 173, 189

K

K^+-канал 103

L

LHP1 (LIKE HP1) 189

M

me^7G 95, 96
Mediator комплекс 87

N

non-TAF коактиваторы 88

P

poly(A)-полимераза 104
Polycomb 44, 173, 177, 180
PSI-фактор 26, 27

R

RISC (РНК-индуцируемый репрессирующий комплекс) 118, 119

S

Saccharomyces cerevisiae 60, 61, 158, 170, 171, 181, 190, 201
Salmonella 200
Schizosaccharomyces pombe 158, 190
SMC белок (structural maintenance of chromosomes) 38
SSB-белки 50
SUP35 26, 30
SUP45 27

T

TBP; *см. также* TATA-связывающий белок
Tetrahymena thermophila 108
trp-оперон 138, 139, 142, 143

X

X-инактивационный центр 160, 161
X-хромосома 155, 159–162
Xenopus laevis 185

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ И РЕКОМЕНДОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рефф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: В 5-ти т.: Пер. с англ. / Под ред. Г. П. Георгиева. — М.: Мир, 1986–1987.
2. Альтшулер М. Л., Северин С. Е., Глухов А. И. Теломераза в свете современных представлений о злокачественной трансформации клетки // Биохимия. — 2003. — Т. 68, вып.12. — С. 1587–1596.
3. Ашмарин И. П. Молекулярная биология: Избр. разделы. — Л.: Медицина, ЛО, 1974. — 360 с.
4. Богданов А. А. Теломеры и теломераза // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 12. — С. 12–18.
5. Бреслер С. Е. Молекулярная биология. — М.: Наука, ЛО, 1973. — 577 с.
6. Гвоздев В. А Подвижная ДНК эукариот. Часть 1. Структура, механизмы перемещения и роль подвижных елементов в поддержании целостности хромосом. Часть 2. Роль в регуляции активности генов и еволюция генома // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 8. — С. 8–21.
7. Гоголевский П. А., Здановский В.М. Клонирование //Проблемы репродукции. — 1998. — № 3. — С. 11–16.
8. Даниленко Н. Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. — Минск: Техналогія, 2003. — 494 с.
9. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика, 1998 из интернет-ресурса: http://www.nsu.ru/biology/courses/genetics/index.html.
10. Загребельный С. Н. Молекулярная биология с основами молекулярной генетики. — Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та, 1980. — 96 с.
11. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология: В 3 т.: Пер. с нем. / Под ред. В. А. Енгельгардта. — М.: Мир, 1982.
12. Инге-Вечтомов С. Г. Прионы дрожжей и центральная догма молекулярной биологии // Вестник РАН. — 2000. — Т. 70, № 4. — С. 299–306.
13. Калинин Ф. Л. Основы молекулярной биологии. — К.: Вища школа, 1978. — 488 с.
14. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х томах: Пер. с англ. / Под ред. В. А. Енгельгардта. — М.: Мир, 1985.

15. Льюин Б. Гены: Пер. с англ. / Под ред. Г. П. Георгиева. — М.: Мир, 1987. — 544 с.
16. Макарова Ю. А., Крамеров Д. А. Некодирующие РНК // Биохимия. — 2007. — 72, № 11. — С. 1427–1448.
17. Пермяков Е. А. Кальцийсвязывающие белки. — М.: Наука, 1993. — 192 с.
18. Уотсон Дж. Молекулярная биология гена: Пер. с англ. / Под ред. В. А. Енгельгардта. — М.: Мир, 1967. — 462 с.
19. Шпаковский Г. В., Лебеденко Е. Н. Молекулярная эволюция и структура субъединиц ядерных РНК-полимераз эукариот в свете экзон-интронной организации их генов // Биоорганическая химия. — 1999. — 25, № 11. — С. 828–837.
20. Agalioti T., Chen G., Thanos D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene // Cell. — 2002. — 111. — P. 381–392.
21. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular biology of the cell. 4-th edition. — Garland Science Publishing, 2002.
22. Avramova Z. V. Heterochromatin in Animals and Plants. Similarities and Differences // Plant Physiol. — 2002. — 129. — P. 40–49.
23. Bachellerie J.-P. , Cavaillé J., Hüttenhofer A. The expanding snoRNA world /Review // Biochimie. — 2002. — 84, № 8. — P. 775–790.
24. Bartel B., Bartel D. P. MicroRNAs: At the Root of Plant Development? // Plant Physiol. — 2003. — 132. — P.709–717.
25. Black D. L. Splicing in the inner ear: A familiar tune, but what are the instruments? // Neuron. — 1998. — 20. — P. 165–168.
26. Bleecker A.B., Kende H. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants // Annual Review of Cell and Developmental Biology. — 2000. — 16. — P. 1–18.
27. Brown J. W. S., Shaw P. J. Small Nucleolar RNAs and Pre-rRNA Processing in Plants // Plant Cell. — 1998. — 10. — P. 649–658.
28. Calkoven C.F., Geert A.B. Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity // Biochem. J. — 1996. — 317. — P. 329–342.
29. Clark A.L., Docherty K. Negative regulation of transcription in eukaryotes // Biochem.J. — 1993. — 295. — P. 521–541.
30. Eckardt N. A. Small RNA on the Move // The Plant Cell. — 2004. — 16. — P. 1951–1954.
31. Ganot P., Bortolin M.-L., Kiss T. Site-specific pseudouridine formation in pre-ribosomal RNA is guide by small nucleolar RNAs // Cell. — 1997. — 89. — P. 799–809.
32. Gerasimova T.I., Corces V.G. Boundary and insulator elements in chromosomes // Curr. Opinion Genet. Develop. — 1996. — 6. — P. 185–192.
33. Guarente L. Transcriptional coactivators in yeast and beyond // Trends Biochem. Sci. — 1995. — 20. — P. 517–521.

34. Hassan A. H., Prochasson P., Neely K. E., Galasinski S. C., Chandy M., Carrozza M. J., Workman J. L. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes // Cell. — 2002. — 111. — P. 369–379.
35. Jolly C., Metz A., Govin J., Vigneron M., Turner B. M., Khochbin S. Vourc'h C. Stress-induced transcription of satellite III repeats // J. Cell Biol. — 2004. — 164, N. 1. — P. 25–33
36. Johnson L. N., O'Reilly M. Control by phosphorelation // Curr. Opin. Struct. Biol. — 1996. — 6. — P. 762–769.
37. Kakimoto T. Perception and signal transduction of cytokinins // Annu. Rev. Plant Biol. — 2003. — 54. — P. 605–627.
38. Kim J.-M., Liu H., Tazaki M., Nagata M., Aoki F. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis // J. Cell Biol. — 2003. — 162. — P. 37–46.
39. Kiss-Laszlo Z., Henry Y., Bachellerie J.-P., Caizergues-ferrer M., Kiss T. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs // Cell. — 1996. — 85. — P. 1077–1088.
40. Latchman D.S. Eukaryotic transcription factors // Biochem J. — 1990. — 270. — P. 281–289.
41. Lee J. T., Davidow L. S., Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre // Nat Genet. — 1999. — 21. — P. 400–404.
42. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-4* encode small RNAs with antisence complementarity to *lin-14* // Cell. — 1993. — 75. — P. 843-854.
43. Leyser O. Molecular genetics of auxin signaling // Annual Review of Plant Biology. — 2002. — 53. — P. 377-398.
44. Lindroth A. M., Cao X., Jackson J. P., Zilberman D., McCallum C. M., Henikoff S., Jacobsen S. E. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for Maintenance of CpXpG Methylation // Science. — 2001. — 292. — P. 2077–2080.
45. Lohrmann J., Harter K. Plant Two-Component Signaling Systems and the Role of Response Regulators // Plant Physiol. — 2002. — 128. — P. 363–369.
46. Macknight R., Duroux M., Laurie R., Dijkwel P., Simpson G., Dean C. Functional significance of the alternative transcript processing of the Arsbidopsis floral promoter FCA // Plant Cell. — 2002. — 14. — P. 877–888.
47. McCarthy J.E.G. Posttranscriptional control of gene expression in yeast // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — 62. — P. 1492–1553.
48. Metz A., Soret J., Vourc'h C., Tazi J., Jolly C. A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules // J. Cell Sci. — 2004. — 117. — P. 4551–4558.

49. Myers L. C. Kornberg R. D. Mediator of transcriptional regulation // Annual Review of Biochemistry. — 2000. — 69. — P. 729–749.
50. Nikolov D. V., Burley S. K. RNA polymerase II transcription initiation // Proceedings of the National Academy of Science of USA. — 1997. — 94. — P. 15–22.
51. Reik W., Dean W., Walter J., Epigenetic reprogramming in mammalian development // Science. — 2001. — 293. — P. 1089–1093.
52. Reyes J. C., Hennig L., Gruissem W. Chromatin-Remodeling and Memory Factors. New Regulators of Plant Development // Plant Physiol. — 2002. — 130. — P. 1090–1101.
53. Rizzi N., Denegri M., Chiodi I., Corioni M., Valgardsdottir R., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G. Transcriptional Activation of a Constitutive Heterochromatic Domain of the Human Genome in Response to Heat Shock // Mol. Biol. Cell. — 2004. — 15, Is.2. — P. 543–551.
54. Serio T. R., Cashikar A. G., Kowal A. S., Sawicki G. J., Moslehi J. J., Serpell L., Arnsdorf M. F., Lindquist S. L. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant // Science. — 2000. — 289, Aug. 25. — P. 1317–1321.
55. Shay J. W., Zou Y., Hiyama E., Wright W. E. Telomerase and cancer // Hum.Mol.Genet. — 2001. — 10. — P. 677–685.
56. Struhl K. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes // Cell. — 1999. — 98. — P. 1–4.
57. Sun Tai-ping, Gubler F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants // Annual Review of Plant Biology. — 2004. — 55. — P. 197–223.
58. Sung S., Amasino R. M. Vernalization and epigenetics: how plants remember winter // Current Opinion in Plant Biology. — 2004. — 7. — P. 4–10.
59. Sunkar R., Zhu J.-K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis // Plant Cell. — 2004. — 16. — P. 2001-2019.
60. Turner B. M. Cellular memory and the histone code // Cell. — 2002. — 111. — P. 285–291.
61. Udvary A. Dividing the empire: Boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers // EMBO J. — 1999. — 18. — P. 1–8.
62. Urnov F. D. Methylation and the Genome: the Power of a Small Amendment // The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr. — 2002. — V. 132. — P. 2450–2456.
63. Wolberger C. Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. — 1999. — 28. — P. 29–56.
64. Wolffe A. P., Matzke M. A. Epigenetics: Regulation Through Repression // Science. — 1999. — 286. — P. 481–486.
65. Zhang Y., Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone teils // Genes Devel. — 2001. — 15. — P. 2343–2360.

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1
МАТЕРИАЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Биохимическая природа наследственности 4
Синтез молекул разной степени сложности 7
Концепция матричной поверхности. 9
Свойства матрицы. 10
Может ли белок выполнять роль матрицы? 13
Центральная биологическая догма 15
Конформационная наследственность белков. Прионы 18
Открытие прионов: нейродегенеративные заболевания 19
Молекулярная структура и свойства прионных белков 21
Общие сведения о конформации белков 21
Структура и свойства прионов 23
Прионы дрожжей 25
Молекулярный механизм нонсенс-супрессии 26
Представления о механизмах прионизации 28
Значение шаперонов в процессах прионизации 32
ДНК — идеальная матрица 35
Структура и компактизация ДНК 35
Организация и типы двойных спиралей ДНК 35
Компактизация ДНК прокариот. 38
Структура хроматина эукариот 40
Базовые принципы организации геномов вирусов, прокариот и эукариот 44
Особенности геномов вирусов. 45
Особенности геномов прокариот 46
Особенности геномов эукариот 47
Репликация ДНК бактерий 47
Инициация репликации бактериальной хромосомы 48
Инициация репликации ДНК плазмиды ColE1 52
Полимеризация цепей. 53
Почему праймаза не синтезирует ДНК? 59
Репликация ДНК эукариот 60
Инициация репликации ДНК 61
ДНК-полимеразы 61
Проблема концевой репликации. 63

Типы генов и их структура **68**
Характеристика генетических конструкций . . . 70
Участки узнавания и связывания . . . 74
Синтез РНК **80**
Синтез РНК в *E. coli* . . . 81
Инициация транскрипции . . . 82
Типы и структура терминаторов . . . 84
Механизмы терминации . . . 85
Транскрипция белок-кодирующих генов у эукариот . . . 86
Компоненты преинициаторного комплекса . . . 87
Инициация транскрипции белок-кодирующих генов . . . 88
Полимеризация пре-мРНК . . . 90
Терминация транскрипции пре-мРНК . . . 91
Процессинг РНК **93**
Процессинг мРНК эукариот . . . 94
Кэпирование . . . 94
Сплайсинг . . . 96
Значение сплайсосомы в механизме сплайсинга . . . 98
Необычные интроны . . . 101
Альтернативный сплайсинг . . . 101
Полиаденилирование . . . 103
Процессинг тРНК у прокариот . . . 104
Сплайсинг тРНК и рРНК у низших эукариот . . . 106
Сплайсинг тРНК дрожжей . . . 106
Сплайсинг рРНК у ***Tetrahymena thermophila*** . . . 108
Синтез, строение и функции малых РНК . . . 109
Малые ядерные РНК . . . 110
Малые ядрышковые РНК . . . 111
Малые цитоплазматические РНК . . . 115
Малые интерферирующие РНК . . . 115
miРНК . . . 116
siРНК . . . 120
Контрольные вопросы к главе 1 . . . 123

Глава 2
РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У ПРОКАРИОТ

Топологическая регуляция экспрессии бактериальных генов **128**
Регуляция транскрипции оперонных генов **132**
Контроль экспрессии лактозного оперона *E. coli* . . . 134
Негативный индуцибельный контроль . . . 134
Позитивная индуцибельная регуляция . . . 137
Контроль экспрессии триптофанового оперона *E. coli* . . . 138
Негативная репрессибельная регуляция . . . 138
Аттенуация . . . 139
Аутогенный контроль экспрессии рибосомных белков **144**
Контрольные вопросы к главе 2 . . . 146

Глава 3
РЕГУЛЯЦИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ У ЭУКАРИОТ

Особенности регуляции экспрессии эукариотических генов 148
Структура и функциональное состояние хроматина 151
Возникновение и роль гетерохроматина . . . 152
Избирательная конденсация хроматина . . . 154
Молекулярные признаки состояния хроматина . . . 157
Инактивация Х-хромосомы в клетках женского организма млекопитающих . . . 159
Механизмы клеточной памяти 163
Гистоновый код . . . 165
Сайты модификации гистонов . . . 165
Значение и взаимодействие модификаций гистонов . . . 167
Ацетилирование . . . 167
Метилирование . . . 169
Убиквитинирование . . . 170
Фосфорилирование . . . 171
Комбинации модификаций . . . 172
Вовлечение гистонов в образование новых нуклеосом . . . 173
Значение негистоновых белков в наследовании структуры хроматина . . . 175
Ремоделирование хроматина . . . 177
Активация хроматина . . . 178
Репрессия хроматина . . . 179
Метилирование ДНК . . . 183
Значение и эволюция процесса метилирования цитозина . . . 183
Локализация и уровень метилирования . . . 185
Механизм наследования схемы метилирования . . . 187
Отсутствие метилирования ДНК . . . 190
Клонирование и дедифференциация . . . 191
Теоретические основы клонирования . . . 191
Клонирование растений и животных . . . 194
Молекулярные основы дедифференциации . . . 197
Механизмы клеточной памяти, связанные с перестройкой ДНК . . . 200
Обратимые перестройки ДНК . . . 200
Инверсия промотора . . . 200
Кассетный механизм . . . 201
Необратимые перестройки ДНК . . . 202
Регуляция транскрипции у эукариот 204
Регуляция транскрипции на уровне транскрипционных факторов . . . 205
Роль модификации гистонов в инициации транскрипции . . . 211
Контрольные вопросы к главе 3 . . . 213
Указатель терминов 217
Список использованной и рекомендованной литературы 221