

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

© МАЙБОРОДА А.А. – 2017
УДК: 616.056.7

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТЕОМА В ОНТОГЕНЕЗЕ (СООБЩЕНИЕ 2) АКТИВАЦИЯ И РЕПРЕССИЯ ЧАСТИ ГЕНОМА: ЗАКОНОМЕРНЫЕ СОБЫТИЯ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Аскольд Александрович Майборода
(Иркутский государственный медицинский университет, ректор – д.м.н., проф. И.В. Малов)

Резюме. Все разнообразие типов клеток многоклеточного организма имеют одинаковое количество и неизменную последовательность нуклеотидов ДНК. Различия между клетками зависят от **активности различных генов**. В клетках разных типов транскрибируют разные наборы генов, которые синтезируют разные наборы белков. Активность генов контролируют белки, которые являются производными других генов. Взаимодействуют не гены, а продукты их деятельности. Ферментная природа модификаций, осуществляемая белками-ферментами, оставляет за ДНК функцию всех вариантов ацетилирования, метилирования, фосфорилирования и т.п., а постоянное участие модифицированных белков в процессах репликации, гетерохроматизации, инактивации X-хромосомы, импринтирования аллелей демонстрирует обязательное участие транскрипционной системы ДНК в классических взаимодействиях генома и протеома.

Ключевые слова: геном; протеом; онтогенез; модификации; эпигенетика.

GENETIC REGULATION OF PROTEOM IN ONTOGENESIS (MESSAGE 2). ACTIVATION AND REPRESSION OF THE PART OF THE GENOM: REGULAR EVENTS IN ONTOGENESIS

A.A. Mayboroda
(Irkutsk State Medical University, Russia)

Summary. All the various types of cells of a multicellular organism have the same number and constant sequence of DNA nucleotides. Differences between cells depend on the activity of different genes. In cells of different types different sets of genes are transcribed, that synthesize different sets of proteins. The activity of genes is controlled by proteins that are derivatives of other genes. They interact not with the genes, but with the products of their activity. The enzymatic nature of modifications performed by enzyme proteins leaves the DNA function of all variants of acetylation, methylation, phosphorylation, etc., and the constant participation of modified proteins during replication, heterochromatization, inactivation of the X chromosome, imprinting of alleles demonstrates the obligatory participation of the transcriptional DNA system in constant interaction of the genome and proteome.

Key words: genome; proteome; ontogenesis; epigenetics.

Фенотипическое разнообразие клеток зависит от дифференциальной активности генов и транскрибирующей системы ДНК [2,4,5,6,7], продуцирующей соответствующие белки, специфичность которых и определяет в итоге морфологию и физиологию клеточных типов (рис. 1 на с. 2 обложки).

В ДНК человеческой зиготы имеется 25 000 генов, которые постоянно воспроизводятся во всех дочерних клетках, т.е. имеют потенциально одинаковый геном – потенциально одинаковую генетическую программу, в которой закодировано «**все обо всем**». Однако в каждом конкретном случае реализуется только **часть программы** «все обо всем» (эпителиальным клеткам нужны специфические белки, а не белки клеток селезенки, или наоборот), поэтому нефункционирующая часть генома клетки репрессирована, а гены специфической транскрипции активированы. основополагающий принцип действия генов путем активации – репрессии в процессе онтогенеза реализуется на разных уровнях геномной организации (аллельном, геномном, хромосомном), обеспечивая процессы клеточной дифференцировки, выравнивание дозы генов, импринтинг и др. В составе генов, кодирующих развитие, гены клеточной дифференцировки занимают одно из приоритетных мест [3].

Переключение экспрессии глобиновых генов в онтогенезе млекопитающих. У человека в процессе эмбрионального онтогенеза происходит последовательная смена трех форм эритроцитов: первичных, вторичных и зрелых. Эритроциты образуются в разное время онтогенеза, в разных местах гемопоэза и отличаются по составу глобинов. Различают эмбриональные и зрелый гемоглобины.

Эмбриональный гемоглобин синтезируется в пер-

вичных эритроцитах (мегалоцитах). Мегалоциты образуются из стволовых кроветворных клеток внутри сосудов кровяных островков, формирующихся в стенке эмбрионального желточного мешка. В части мегалоцитов ядра удаляются, в результате формируется популяция ядерных и безъядерных клеток.

Фетальный гемоглобин синтезируется во вторичных эритроцитах, которые, подобно первичным, образуются из стволовых кроветворных клеток; но местом образования эритроцитов являются экстраваскулярные участки мезенхимы, врастающие внутрь печеночных долек. Аналогичный процесс происходит в селезенке.

Зрелый гемоглобин синтезируется в эритроцитах костного мозга. Кроветворная стволовая клетка через стадию эритробласта дает начало зрелому эритроциту. Зрелые эритроциты еще в костном мозге теряют ядра и в периферическую кровь поступают без ядер. Гемоглобин синтезирован заранее.

Эмбриональный и фетальный гемоглобины обладают большим сродством к кислороду, чем зрелый гемоглобин, в чем и проявляется главная физиологическая суть смены анатомического места гемопоэза эритроцитов и разного состава глобинов в молекуле.

Каждая молекула гемоглобина состоит из двух пар полипептидных цепей. Небольшие различия аминокислотного состава цепей определяют название и тип гемоглобина. В частности, нормальный гемоглобин взрослых людей обозначается как гемоглобин А (HbA). HbA – это тетрамер, представленный двумя α - и двумя β -цепями; каждая α -цепь имеет 141 аминокислотный остаток, β -цепь – 146. Кроме HbA у человека различают еще пять гемоглобинов, три из которых относятся к эмбриональному HbG₁, HbG₂, HbF, один – к фетальному

(HbF) и один – к зрелому гемоглобину (HbA₂). В отличие от HbA эти гемоглобины имеют небольшие различия аминокислотного состава в α- или в β-цепи, и поэтому эти цепи названы α- и β-подобные цепи гемоглобинов (рис. 2, 4).

Очевидно, что синтез глобинов кодируют соответствующие гены. Установлено, что эти гены организованы в кластеры. Различают α- и β-кластеры, а также α- и β-подобные кластеры глобиновых генов. Гены α- и α-подобных кластеров расположены в 16 хромосоме, а гены β и β-подобных кластеров – в 11 хромосоме. **Все кластеры содержат гены, ответственные за синтез эмбриональных и зрелых форм гемоглобина («все обо всем»)**. Однако на разных этапах онтогенеза происходит контролируемое включение и выключение экспрессии генов, приводящие к синтезу белков, варианты которых закрывают разные потребности разных периодов эмбрионального развития. Так, первичные эритроциты синтезируют три формы гемоглобина: HbG, HbG₂ и HbP; во вторичных эритроцитах гемоглобин на 70% представлен формой α₂γ₂, т. е. HbF; зрелые эритроциты на 97% представлены формой α₂β₂, т. е. HbA (рис. 3).

В β-кластере кроме пяти активных генов имеется один псевдоген. Псевдогены обозначаются буквой Ψ перед названием гена, в данном случае – Ψβ. Псевдогены имеют последовательности, гомологичные последовательностям функциональных генов, но при этом не синтезируют белки. Псевдогены являются результатом мутаций, которые затрагивают какой-либо этап экспрессии гена (мутация в промоторе, делеция сайтов сплайсинга, мутации, нарушающие рамку считывания). Псевдогены не функционируют, считаются тупиками эволюции, однако они сохраняются в геноме. Механизмы, ответственные за дупликацию и перестройку, сохраняются внутри кластера как для функциональных, так и для псевдогенов.

Края кластера β-глобина замыкают гиперчувствительные сайты (гиперчувствительные к ДНК-азе I). Группа из четырех 5'-концевых гиперчувствительных сайтов расположена на 20 т.п.н. выше β-глобинового кластера, ниже кластера имеется одиночный 3'-концевой гиперчувствительный сайт (рис. 4). Гиперчувствительность сайтов к ДНК-азе I является индикатором присутствия на ДНК разных белков, выполняющих регуляторную функцию [2,7,19]. Гиперчувствительные сайты регистрируются в промоторах, ориджинах, центромерах и в других функционально активных участках генома [5].

Роль 5'-концевых гиперчувствительных сайтов в регуляции действия глобиновых генов оказалась решающей. Первоначально в группе больных было установлено, что при наличии всех β-глобиновых генов у лиц, имеющих делеции на 20 п.н. выше β-глобинового кластера, экспрессия глобиновых генов не происходит [12]. Далее было продемонстрировано, что при искусственном внедрении в геном мыши гена β-глобина человека со всеми регуляторными последовательностями, но без 5'-концевых гиперчувствительных сайтов трансген не экспрессируется. Для экспрессии трансгена требуется наличие всех четырех 5'-концевых гиперчувствительных сайтов. В связи с этим вся группа 5'-концевых гиперчувствительных сайтов получила название «**участок контроля над локусом**» (*locus control region, LCR*).

Последовательность работы генов глобинового кластера строго лимитирована. Очевидная роль LCR в регуляции действия структурных генов, кодирующих во время эмбрионального периода пять разных глобинов, остается не конкретизированной. Действительно, определена последовательность нуклеотидов β-глобиновых генов, а также последовательность аминокислот в молекуле глобинов, но нет ответа на главный вопрос о молекулярных механизмах переключения экспрессии генов: кто же включает, а затем выключает экспрессию генов в глобиновых кластерах?

Активность генов контролируют белки, которые являются производными других генов. Взаимодействуют

не гены, а продукты их деятельности. Механизм включения предполагает этапы ремоделирования хроматина обеспечивающие доступ к регуляторным частям гена и последующую активацию промотора и энхансера, а механизм локального поддержания хроматина в неактивном состоянии реализуется через репрессию промотора или энхансера. Предполагается, что гиперчувствительные сайты 5'-конца ремоделируют хроматин и делают доступными факторы транскрипции к промоторной части глобиновых генов. Кто же регулирует включение и выключение экспрессии глобиновых генов – остается загадкой.

Инактивация X-хромосомы. Достоверно установлено, что в соматических клетках здоровых женщин одна X-хромосома инактивируется в начале эмбрионального развития [23]. Интактная X-хромосома (Xi) уравнивает экспрессию генов этой хромосомы у обоих полов. В норме существует равная вероятность того, что клетки инактивируют X-хромосому, полученную либо от матери, либо от отца. Однако процессу окончательной инактивации X-хромосомы в организме матери предшествует событие избирательной инактивации отцовской X-хромосомы. На самых ранних стадиях эмбрионального развития (включая стадию морулы) отцовская X-хромосома избирательно инактивируется во всех клетках [14]. На стадии бластоцисты перед имплантацией X-хромосома отца вновь активируется, и самка получает две генетически равноценные хромосомы. Показано, что дальнейший выбор инактивации отцовской или материнской X-хромосомы случаен. Поэтому постулируется правило равной вероятности инактивации отцовской или материнской X-хромосомы в норме у всех потомков.

Установлено, что инактивирование X-хромосомы осуществляется некодирующей РНК, которая повышено экспрессируется и находится в тесной ассоциации с неактивной X-хромосомой [18]. В **полосе Xp13 картирован центр X-инактивации (XiC)**, который содержит *ген XiST*.

Ген специфической транскрипции инактивированной X-хромосомы оказался ключевым управляющим локусом X-инактивации. *Ген XiST* экспрессируется только в аллеле на неактивной X-хромосоме; в активной X-хромосоме он отключен и в мужских, и в женских клетках. X-инактивация не может происходить в отсутствие гена, поэтому *ген XiST признается генетическим центром регуляции X-инактивации*.

Инактивированная X-хромосома остается «молчащей» на протяжении всех последующих постмитотических состояний, т.е. демонстрирует постоянную форму неработающих (выключенных) *генов*, и поэтому послужила (естественной) моделью для многочисленных исследований генетических механизмов сайленсинга и структуры хроматина.

Итак, *ген XiST* в неактивной хромосоме остается включенным, синтезированная им РНК связывается с хромосомой и покрывает ее; образовавшийся комплекс *XiST*-РНК рекрутирует механизм химической модификации гистоновых белков. В процессе химической модификации гистонов была замечена закономерность, проявляющаяся падением уровня ацетилирования остатков лизина и последующего увеличения уровня их метилирования. Важно отметить, что Xi оказалась обогащенной метилированием H3K27 и убиквитинилированием гистона H2A по лизину 119 в отличие от центрального хроматина аутосом. Вслед за метилированием гистонов по N-«хвостам» происходит метилирование ДНК. Повышается уровень негистонового белка HP1. Последовательная смена перечисленных модификаций гистонов и ДНК придают неактивной X-хромосоме в соматических клетках типичную структуру, которая видна в клеточном ядре в виде плотной ДНК, известную как тельце Барра или тельце полового хроматина, и являющуюся цитологическим проявлением неактивной X-хромосомы.

Авторы ранних светомикроскопических исследований подчеркивали, что тельце Барра (Xi) обладает свойствами гетерохроматина, отличительными качествами которого являются: транскрипционное «молчание», репликация в поздней S-фазе, конденсированный внешний облик. Поэтому после того, как были показаны последовательные этапы инактивации: Xist-РНК, модификация гистонов, метилирование гистонов, сочетание метилирования ДНК и присоединение негистоновых белков, возникло представление, что эти сочетания и взаимодействия приводят к формированию хроматина. Не вызывает сомнений, что гетерохроматизация Xi демонстрирует картину скоординированной и тщательно регулируемой последовательности событий. Однако по системе регуляции возникает естественный вопрос о существовании механизма причинно-следственной зависимости между последовательными событиями, приводящими к гетерохроматизации (инактивации) Xi. Мнение о том, что X-инактивация – конечный результат серии параллельных процессов [13], из которых лишь некоторые являются взаимозависимыми, требует уточнения, поскольку некоторые не относятся к этапу Xist-РНК, которая необходима и достаточна для включения последующих событий формирования гетерохроматина [17]. В то же время показано, что удаление целого ряда модифицированных гистонов (триметилирование H3 лизина 27 и убиквитинирования H2A) недостаточно для реактивации хромосомы Xi [25], при этом следует подчеркнуть, что Xist-РНК может установить X-инактивацию в эмбриональных клетках на очень ранней стадии (несколько бластомеров), но не в более позднее время [30]. Таким образом, ген *Hist* и его продукт (некодирующая РНК) обеспечивают X-инактивацию, которая сопровождается появлением модификаций, появление и функционирование которых находится под генетическим контролем. В этой связи показательным является состояние низкого и позднего метилирования цитозина на Xi и высокая степень метилирования островков CpG. Современное представление о влиянии роли метилирования на уровень экспрессии генов позволяет отойти от неопределенности: «степень метилирования генов» и увязать метилирование островков CpG, расположенных в промоторной зоне гена *Hist* с неактивным состоянием ДНК. В то же время необязательность метилирования для X-инактивации продемонстрирована в опытах [25,26,27] на мышах, у которых отсутствовали все три метилтрансферазы (*Dnmt1*, *Dnmta*, *Dnmtb*), а случайная X-инактивация осуществлялась нормальным образом.

Очень важно подчеркнуть, что не все гены в X-хромосоме подвержены инактивации [14]. Около 15% генов Xi избегают инактивации и экспрессируются как в активных, так и в неактивных X-хромосомах. Еще для 10% генов показана переменная инактивация, т.е. инактивация у одних женщин и отсутствие инактивации у других. Большинство генов, избежавших инактивации, расположены на Xp плече [8,9].

Особое место в общей системе представлений об инактивации X-хромосомы занимают сведения о том, что инактивация совпадает по времени с имплантацией бластоцисты. И еще очень важная деталь: образование полового хроматина происходит не во всех клетках зародыша, в частности, в ядрах ооцитов и ооцитах у трехмесячного зародыша человека состояние гетерохроматизации не выражено.

Таким образом, часть генома в процессе X-инактивации переводится в неактивное состояние. X-инактивация находится под генетическим контролем. Ген *Hist* является генетическим центром регуляции X-инактивации, но природа сигнала к X-инактивации остается пока неизвестной. Сравнительный анализ позволяет сделать предположение о том, что на роль источника сигнала может претендовать консервативная последовательность длиной 100-300 п.н. главного транскрипционного аппарата [6]. Показано позднее и

необязательное для инактивации X-хромосомы метилирование CpG.

Геномный импринтинг. Геномный импринтинг (ГИ) – нормальный процесс инактивации, который затрагивает не менее ста аллелей в хромосомах половых клеток млекопитающих у одного из родителей (рис. 5). Геномный импринтинг в норме обеспечивает экспрессию только одного аллеля из двух унаследованных. В большинстве описанных случаев импринтированность генов обусловлена специфическим метилированием участка ДНК на хромосомах отца или на хромосомах матери (рис. 6). Геномный импринтинг происходит при гаметогенезе до оплодотворения и инактивирует гомологичные аллели отца или матери. Как результат, различают отцовский и материнский паттерн метилирования, а метилирование аллелей в гаметах называют импринтированностью. При этом хромосома может нести только материнский или только отцовский паттерн метилирования; имеются группы импринтируемых генов, в которых может импринтироваться только отцовский или только материнский аллель. Феномен импринтинга считается классическим примером специфического метилирования ДНК в половых клетках, в которых с учетом половой принадлежности паттерн метилирования воспроизводится в каждой гамете. Однако интенсивное исследование молекулярных механизмов импринтинга высветило роль и участие некодирующих РНК и белков, способных связываться с неметилированной ДНК в регуляции геномного импринтинга [12,13].

Таким образом, импринтинг – нормальное, закономерное событие в процессе гаметогенеза у млекопитающих. Очевидно, что основным признаком импринтированных генов является экспрессия в тканях только одного аллеля: либо материнского, либо отцовского. Терминологически различают: а) материнский экспрессируемый импринтируемый ген и б) отцовский экспрессируемый импринтированный ген.

В процессе гаметогенеза импринтинг может нарушаться. Нарушение импринтинга в результате генетических поломок (делеции, однородительские дисомии, мутации центра импринтинга и др.) блокирует экспрессию в соответствующих участках хромосом в гаметах отца или матери. Все варианты генетических поломок приводят к одному результату: исчезает экспрессия одного из необходимых для нормального развития аллелей.

Иллюстрацией роли геномного импринтинга в определении менделевского наследования (нарушение правила направления скрещивания) могут служить хорошо изученные синдромы Прадера-Вилли и Ангельмана. Гены, мутации в которых проявляются названными синдромами расположены в длинном плече 15 хромосомы (15q11-q13). В норме регион 15q11-q13 содержит участок Прадера-Вилли (ПВ) и Ангельмана (Аа), которые по-разному экспрессируются у отца и у матери (рис. 6).

Синдром Прадера-Вилли – заболевание, возникающее как следствие отсутствия экспрессии генов в хромосоме 15q11-q13 отцовского происхождения. Утрата отцовских генов у 70% пациентов происходит путем делегирования участка 15q11-q13 (рис. 7), у 25% – через однородительскую материнскую дисомию, а около 5% пациентов имеют мутацию в пределах центра импринтинга. Частота синдрома ПВ варьирует в пределах 1/10 000-1/250 000 в разных популяциях.

Фенотипически при синдроме ПВ регистрируют состояние младенческой гипотонии, задержку развития и роста как следствие плохого питания в течение первого года жизни. Однако в период между первым и шестым годами развивается гиперфагия. Чрезмерный беспорядочный аппетит и низкий метаболизм приводят к ожирению, которые являются главными причинами смерти. В строении тела имеются отличительные черты: низкий рост, V-образная (перевернутая) верхняя губа, гипопигментация волос, глаз и кожи, небольшие кисти рук и стопы, гипогонадизм. Типичны разные формы умствен-

ной отсталости, а также замкнутость, беспокойство и несчастливое состояние.

Синдром Ангельмана – заболевание, возникающее как следствие отсутствия экспрессии генов в хромосоме 15g11-g13 материнского происхождения. Утрата материнских генов у 70% пациентов происходит путем делеции 15g11-g13 материнского происхождения, и такие особи имеют генетическую информацию в регионе 15g11-g13, происходящую только от отца (рис. 7).

Фенотипически при синдроме Аа регистрируется малый рост, скачущая, пританцовывающая походка, широко расставленные руки. Необычное лицо с широким ртом и выдающейся нижней челюстью. Больные Аа страдают задержкой развития, отсутствием или минимальными речевыми навыками, атаксией, судорогами и эпилептическими припадками. Подвержены приступам необъяснимого смеха и имеют счастливое настроение.

Эти синдромы демонстрируют, что отсутствие генетического материала в одном регионе (15g11-g13) определяет выраженные фенотипические различия в зависимости от родительского происхождения.

Установлено, что гены, мутации в которых ответственные за проявление симптомов ПВ и Аа, расположены в регионе 15g11-g13; однако какой конкретный ген затрагивается мутацией установлено только для Аа. Показано, что первопричиной Аа является ген UBE 3A [20,21,24,30]. После материнской делеции в 15g11-g13 прекращается экспрессия UBE 3A в клетках Пуркинью. Конкретный ген для ПВ не установлен.

Гены геномного импринтинга. Окончательное доказательство существования геномного импринтинга у млекопитающих было получено после идентификации генов, демонстрирующих специфическую родительскую экспрессию. В 1991 году открыты и описаны три импринтируемых гена мыши [10,11,15,16,17]:

– *Ген Igf2r* (Insulin-like growth factor type 2 receptor) – матерински экспрессируемый импринтируемый ген, рецептора ростового фактора. Месторасположение в 6 хромосоме человека и в 17 хромосоме мыши;

– *Ген Igf2* (Insulin-like growth factor type 2) – отцовски экспрессируемый импринтируемый ген, функционирующий как инсулиноподобный фактор роста IGF-II. Месторасположение – 11 хромосома человека, 7 хромосома мыши;

– *Ген H19* – матерински экспрессируемый импринтируемый ген, являющийся геном некодирующей РНК (nc РНК).

Сегодня картировано около 100 импринтируемых генов в хромосомах мыши и человека. Оказалось, что большинство из них собраны в кластеры [29]. Число генов в кластерах колеблется от трех до десяти генов. Описано одиннадцать кластеров импринтированных генов мыши распределенных на 8 хромосомах. Примечательно, что одиночные импринтируемые гены были зарегистрированы только на трех хромосомах [16].

Таким образом большинство импринтированных генов собраны в **кластеры**.

Возникает естественное предположение о наличии единого центра регуляции кластерных генов импринтинга, аналогичного подобному у глобиновых генов (LCR) тоже имеющих кластерную организацию. Подробное изучение шести кластерных генов человека и мыши (*Igf2r*, *Igf2*, *Keng1*, *Gnas*, *Dik1* и *Pus*) показало наличие нуклеотидной последовательности ДНК, метилированной на одной хромосоме у всех шести кластеров [16]. Такие метилированные последовательности обозначены как гаметические DMR (Differentially DNA – Methylated Region). Гаметические DMR устанавливаются в одной гамете и сохраняются в диплоидных клетках только на одной родительской хромосоме. В четырех кластерах (*Igf2r*, *Keng1*, *Gnas*, *FWS*) гаметическая DMR устанавливается в оогенезе, а в двух кластерах приобретаетается в сперматогенезе, что и позволяет различать материнский и отцовский типы метилирования. При

исследовании кластера *Igf2r* установлено [28], что делеция гаметического DMR, расположенного «выше» гена H19, но «ниже» гена *Igf2r* приводит к утрате импринтинга независимо от родительского происхождения. Эти результаты позволили отнести DMR *Igf2r* к элементу контроля импринтингом (*imprint control element, ICE*). Просматривается некая аналогия с действием LCR глобиновых кластеров. Однако реальность оказалась более сложной.

Дело в том, что заметной отличительной особенностью кластерных генов импринтинга является наличие у большинства из них некодирующих РНК (nc РНК), которые по разному реагируют на состояние метилирования ДНК. В частности в кластерах *Igf2r*, *Igf2*, *Keng* и *Dik1* хромосома, несущая метилированный DMR, экспрессирует множество мРНК, но не экспрессирует nc РНК, а хромосома с неметилированным DMR экспрессирует nc РНК, но репрессирует мРНК (рис. 8).

Кроме особых взаимоотношений в системе «метилирование – nc РНК», установлено участие белка CTCF способного связываться с неметилированной ДНК, в регуляции импринтинга. В частности белок CTCF на материнской аллели связывается с ICE и блокирует доступ *Igf2* к энхансеру, который является общим с H19. Блокада ICE представляет H19 исключительный доступ к энхансеру. На отцовском аллеле ICE метилируется в мужской зародышевой линии и предотвращает связывание белка CTCF с ICE, но не препятствует действию энхансера, который активирует экспрессию *Igf2* и *Ius2* (рис. 8).

Таким образом, в регуляции геномного импринтинга как общебиологического события в онтогенезе млекопитающих используются разнообразные варианты взаимодействия молекулярных сигналов, которые в одной хромосоме используют механизм инактивации путем блокады ДНК белком (ICE+белок), а в гомологичной хромосоме метилирование ДНК определяет доступ энхансера к экспрессии генов.

Заключение. Количество ДНК в клетках млекопитающих организмов (от зиготы до конечных этапов клеточной дифференцировки) **остается постоянным**. Строгое удвоение ДНК сопровождает митоз и обеспечивает постоянство количества ДНК в соматических клетках.

Последовательность нуклеотидов во всех клеточных хромосомах так же не меняется и **остается постоянной**. В основе клеточной специализации (дифференцировки) лежит не потеря или приобретение генов, а изменение **активности генов**. Активность генов регулируется. Все молекулярно-генетические события реализуются специфической последовательностью белковых синтезов. В клетке нет ни одного белка, который бы не был продуктом ДНК. Взаимодействуют не гены, а продукты их деятельности. Белки не изменяют последовательности ДНК, но изменяют активность генов.

Клеточный геном организован по принципу «все обо всем». В каждой клетке потенциально имеется полная программа, которая может обеспечить морфологические и функциональные особенности любой из 200 известных нам типов клеток. Но в каждом конкретном случае используется та часть программы, которая обеспечивает тканевую специфичность или клеток эпителия, или клеток печени и т.п. Геном в своем функционировании предпочитает принцип – **«исключить ненужную часть»**, принципу – **«создать заново новую программу в каждом из 200 случаев»**.

Особенностями структурной организации генома является его нуклеосомная организация, в которой геном и протеом составляют единый комплекс. Структурная организация хроматина определяет состояние активности генов и исключает их бесконтрольную регуляцию. Гены в состоянии стандартной нуклеосомной организации не экспрессируют. Нуклеосома препятствует бесконтрольной экспрессии. Выключенное, но способное к экспрессии состояние генома превра-

щает процесс регуляции в одну операцию – включение! В составе клеточного генома различимы гены, которые могут быть активированы, и гены выключенные, выключенные гены маркированы метилированием цитозина, или состоянием гетерохроматизации. Обе группы генов организованы в нуклеосомы.

ДНК в состоянии нуклеосомной организации недоступна для факторов транскрипции и РНК-полимеразы. Процесс смещения гистонов, открывающий доступ к ДНК, получил название «ремоделирование хроматина». Ремоделирование хроматина и узнавание промоторов транскрипции производится единым белковым комплексом. Комплексы ремоделирования хроматина не содержат элементов, специфичных к конкретным последовательностям ДНК, они взаимодействуют либо с белками-активаторами, либо с белками-репрессорами транскрипции. Многие коактиваторы обладают гистонацетилазной активностью, направленной на временное ацетилирование «хвостов» гистонов.

Протеом в соматических клетках представлен громадным количеством белков, среди которых выделяется группа белков, способных к ковалентным модификациям [1]. Модификации придают белкам новые физико-химические свойства, и модификации обратимы. Эти качества обеспечивают белкам роль посредников в системах регуляции активного или репрессивного состояний генома. Особое место в системе активации и репрессии генома играют модификации «хвостов» белков гистоновых октамеров (ацетилирование, метилирование, убиквитилирование и др.). Важность модификаций подтверждена в опытах, где показано, в частности, что при потере ацетилированных «хвостов» гистонов H3 и H4 клетки теряют жизнеспособность. Модифицированные белки – постоянные участники процессов репликации, транскрипции и гетерохроматизации. Способность гистоновых белков к различным модификациям (ацетилирование, метилирование, убиквитилирование и др.) увеличивает функциональные возможности постоянного числа «хвостов» гистонов, поскольку модификации на короткое время изменяют их химическую индивидуальность, а модифицированные аминокислоты «хвостов», в свою очередь, взаимодействуют со специфическими для данной модификации белками. Ацетилирование, метилирование и убиквитилирование гистонов может сопровождать либо процессы активации, либо процессы репрессии. Практически все ковалентные модификации временны и обратимы. Одни и те же модификации демонстрируют временное участие в одном из двух вариантов действия генов (активном-неактивном) как обязательные элементы разных по назначению процессов регуляции. Поэтому поиски выразительных вариантов модифицированных белков, которые маркируют этапы регуляции действия генов, должны вестись с учетом участия этих маркеров либо в процессах активации, либо в процессах репрессии.

Малоперспективным следует считать оценку роли только одной формы модификаций как маркера активации или репрессии, оценка сочетанного и последовательного участия двух-трех форм модификаций является более перспективной. В частности установлено, что метилирование гистонов и метилирование ДНК взаимосвязаны и взаимодействуют по типу положительной обратной связи. При этом Ac³Lys гистона H3 подвергается деацетилированию, становится субстратом для метилирования, переводится в состояние Me³Lys и обеспечивает ДНК-метилазе сайт для связывания с CpG [7]. Возникает претензия на роль фрагмента гистонного кода.

Инактивация Xi то же демонстрирует картину скоординированной и регулируемой последовательности событий, приводящих к гетерохроматизации: Xiist-РНК, падение ацетилирования лизина, последующее необычное метилирование H3K27 и убикватинилирование гистона H2A по ¹⁹L, метилирование ДНК и повышение

уровня негистонного белка HP1. Однако в цепи событий X-гетерохроматизации наблюдаются различия по сравнению с гетерохроматизацией центрального хроматина аутосом.

Наличие у человека единственной формы модификации ДНК, путем метилирования цитозина, делает более перспективной использование метилирования ДНК, как выразительного маркера в системе регуляции. В частности присутствие неметилированных островков CpG в промоторах и 5'-концевых доменах потенциально активных генов соматических клеток, позволили определить тканеспецифические маркеры метилирования ДНК и разработать метод их детекции в плазме крови. Вызывает восхищение, то изыскание с каким были использованы особенности тканеспецифического метилирования ДНК, группой авторов из 31 сотрудника [22], для определения органной локализации патологического процесса.

Метилирование цитозина в ДНК связано с активным или репрессивным состоянием части генома. Тотальное метилирование или неметилирование островков CpG определяют репрессированные или способные к экспрессии состояния хроматина. Однако модель инсулятора *Jgf2*-кластера демонстрирует более тонкое участие метилирования ДНК в процессах регуляции. Метилированный JSE, метилируя промотор пс РНК H19, препятствует образованию инсулятора, но при этом гены *Jgf2* и *Jns2* экспрессируются. Необходимое разнообразие вариантов регуляции достигается присутствием белков, которые могут взаимодействовать не только с ДНК, но и с метилированной ДНК. Две одинаковые последовательности ДНК могут быть связаны с белками или быть метилированными, производя разный эффект (рис. 7).

Репрессия части генома на разных этапах онтогенеза и на разных уровнях геномной организации – закономерные события. На рис. 1 представлено примерное количество генов, которые участвуют в функционировании разных типов клеток человека. В каждом случае этих генов значительно меньше 25 000 генов, постоянно воспроизводимых во всех соматических клетках. Репрессивное состояние части генома достигается разными способами. Однако все нефункционирующие части генома (псевдогены, гетерохроматин инактивированной X-хромосомы, центральный хроматин, импринтированные аллели) сохраняют способность к репликации и воспроизводятся в дочерних клетках.

А что может делать ДНК? Ответ давно известен: реплицировать саму себя и транскрибировать большое количество разных белков. Поскольку в основе репликации ДНК лежит многочисленная транскрипционная синтезы, то единственной функцией ДНК следует признать способность транскрибировать и транслировать, т.е. производить специфические белки: ДНК→РНК→Белок. Очевидно, что ферментативная природа модификаций, осуществляемая белками-ферментами, оставляет за ДНК функцию всех вариантов ацетилирования, метилирования, фосфорилирования и т.п., а постоянное участие модифицированных белков в процессах репликации, гетерохроматизации, инактивации X-хромосомы, импринтирования аллелей демонстрируют обязательное участие транскрипционной системы ДНК в постоянном взаимодействии генома и протеома. Никакого эпигенома и никакой эпигенетики, только протеом и геном в состоянии классического генетического взаимодействия.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Прозрачность исследования. Исследование не имело спонсорской поддержки. Исследователь несет полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и иных взаимодействиях. Автор разработал концепцию и дизайн исследования

и написал рукопись. Окончательная версия рукописи была им одобрена, автор не получал гонорар за исследо-

вание.

Работа поступила в редакцию: 14.08.2017 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. – Пер. с англ. – Т. I. – М.: Мир, 1994. – 504 с.
2. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. – Пер. с англ. – Т. II. – М.: Мир, 1994. – 539 с.
3. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. – Пер. с англ. – Т. III. – М.: Мир, 1994. – 504 с.
4. Жимулев И.Ф. Общая молекулярная генетика. – Новосибирск: Сибирское университетское изд-во, 2003. – 478 с.
5. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. – М.: Высшая школа, 1989. – 592 с.
6. Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 264 с.
7. Льюин Б. Гены. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с.
8. Майборода А.А. Дифференцировка пола: норма и патология // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2016. – Т. 140. №1. – С.88-91.
9. Ньюсбаум Р.Л., Мак-Иннес Р.Р., Виллард Х.В. Медицинская генетика. – Пер. с англ. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 624 с.
10. Barlow D.P., et al. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the T-me locus // Nature. – 1991. – Vol. 349. – P.84-87.
11. Barlow D.P., Bartolomei M.S. Геномный импринтинг у млекопитающих. – М.: Техносфера, 2013. – С.348-367.
12. Bartolomei M.S., et al. Parental imprinting of the mouse H19 gene // Nature. – 1991. – Vol. 351. – P.153-155.
13. Bell A.C., Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene // Nature. – 2000. – Vol. 405. – P.482-485.
14. Brockdorff N., Turner B. Компенсация дозы у млекопитающих. Л. Эпигенетика. – М.: Техносфера, 2013. – С.312-332.
15. Carred L., Willard H.F. X inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P.400-404.
16. De Chirara, et al. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene // Cell. – 1991. – Vol. 64. – P.849-859.
17. Ferguson-Smith A.C., et al. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7 // Nature. – 1991. – Vol. 351. – P.667-670.
18. Heard E., Mongelard E., Arnauld D., et al. Human XIST yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1999. – Vol. 96. – P.6841-6846.
19. Gross D.S., Garrard W.T. Nuclease hypersensitive sites in chromatin // Ann. Rev. Biochem. – 1988. – Vol. 57. – P.159-197.
20. Jiang Y.H., et al. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p. 53 and deficit is of contextual learning and long-term potentiation (see comments) // Neuron. – 1998. – Vol. 21. – P.799-811.
21. Kishino T., et al. ИБЕ3А/Е-6-АР mutations cause Angelman syndrome // Nat. Genet. – 1997. – Vol. 15. – P.70-73.
22. Lehmann-Werman R., et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patters of circulating DNA // Proceedings of the National Academy of sciences USA. – 2016. – Vol. 113. №13. – P.E1826-E1834.
23. Lyon M.F. X-chromosome inactivation: a report hypotheses // Cytogenet. Cell. Genet. – 1998. – Vol. 80. – P.133-137.
24. Matsuura T., et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome // Nat. Genet. – 1997. – Vol. 15. – P.74-77.
25. Plath K., Talbot D., Harrier K.M., et al. Developmentally regulated alterations in Polycomb repressive complex L proteins on the inactive X-chromosome // J. Cell. Biol. – 2004. – Vol. 167. – P.1025-1035.
26. Sado T., Okuno M., Li E., Sasaki H. De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation // Development 2004. – Vol. 131. – P.975-982.
27. Sado T., Fenner M.H., Tan S.S., et al. X-inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: Distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation // Dev. Biol. – 2000. – Vol. 225. – P.294-303.
28. Thorvaldsen J.L., et al. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2 // Genes. Dev. – 1998. – Vol. 12. – P.3693-3702.
29. Verona R.E., et al. Genomic imprinting: Intricacies of epigenetic regulation in clusters // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2003. – Vol. 19. – P.237-259.
30. Wutz A., Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation // Mol. Cell. – 2000. – Vol. 5. – P.695-705.

REFERENCES

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., et al. Molecular cell biology. – Trans. with English. – Vol. I. – Moscow: Mir, 1994. – 504 p. (in Russian)
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., et al. Molecular cell biology. – Trans. with English. – Vol. II. – Moscow: Mir, 1994. – 539 p. (in Russian)
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., et al. Molecular cell biology. – Trans. with English. – Vol. III. – Moscow: Mir, 1994. – 504 p. (in Russian)
4. Zhimulev I.F. General molecular genetics. – Novosibirsk: Sibirskoye universitetskoye izd-vo, 2003. – 478 p. (in Russian)
5. Inge-Vechtomov S.G. Genetics with the basics of breeding. – Moscow: Vysshaya shkola, 1989. – 592 p. (in Russian)
6. Korochkin L.I. Biology of individual development. – Moscow: Izd-vo MGU, 2002. – 264 p. (in Russian)
7. Lewin B. Genes. – Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy, 2012. – 896 p. (in Russian)
8. Mayboroda A.A. Differentiation of sex: norma and pathology // Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk). – 2016. – Vol. 140. №1. – P.88-91. (in Russian)
9. Newsbaum R., McRains R.R., Willard H.V. Medical genetics. – Trans. with English. – Moscow: GEOTAR-Media, 2010. – 624 p. (in Russian)
10. Barlow D.P., et al. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the T-me locus // Nature. – 1991. – Vol. 349. – P.84-87.
11. Barlow D.P., Bartolomei M.S. Genomic imprinting in mammals. – Moscow: Technosphere, 2013. – P.348-367. (in Russian)
12. Bartolomei M.S., et al. Parental imprinting of the mouse H19 gene // Nature. – 1991. – Vol. 351. – P.153-155.
13. Bell A.C., Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene // Nature. – 2000. – Vol. 405. – P.482-485.
14. Brockdorff N., Turner B. Compensation of the dose in mammals. Epigenetics. – Moscow: Technosphere, 2013. – P. 312-332. (in Russian)
15. Carred L., Willard H.F. X inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P.400-404.
16. De Chirara, et al. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene // Cell. – 1991. – Vol. 64. – P.849-859.
17. Ferguson-Smith A.C., et al. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7 // Nature. – 1991. – Vol. 351. – P.667-670.
18. Heard E., Mongelard E., Arnauld D., et al. Human XIST yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1999. – Vol. 96. – P.6841-6846.
19. Gross D.S., Garrard W.T. Nuclease hypersensitive sites in chromatin // Ann. Rev. Biochem. – 1988. – Vol. 57. – P.159-197.
20. Jiang Y.H., et al. Mutation of the Angelman ubiquitin

ligase in mice causes increased cytoplasmic p. 53 and deficit is of contextual learning and long-term potentiation (see comments) // *Neuron*. – 1998. – Vol. 21. – P.799-811.

21. *Kishino T., et al.* UBE3A/E-6-AP mutations cause Angelman syndrome // *Nat. Genet.* – 1997. – Vol. 15. – P.70-73.

22. *Lehmann-Werman R., et al.* Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA // *Proceedings of the National Academy of sciences USA*. – 2016. – Vol. 113. №13. – P.E1826-E1834.

23. *Lyon M.F.* X-chromosome inactivation: a report hypotheses // *Cytogenet. Cell. Genet.* – 1998. – Vol. 80. – P.133-137.

24. *Matsuura T., et al.* De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome // *Nat. Genet.* – 1997. – Vol. 15. – P.74-77.

25. *Plath K., Talbot D., Harrier K.M., et al.* Developmentally regulated alterations in Polycomb repressive complex L proteins on the inactive X-chromosome // *J. Cell. Biol.* – 2004. – Vol. 167.

– P.1025-1035.

26. *Sado T., Okuno M., Li E., Sasaki H.* De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation // *Development* 2004. – Vol. 131. – P.975-982.

27. *Sado T., Fenner M.H., Tan S.S., et al.* X-inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: Distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation // *Dev. Biol.* – 2000. – Vol. 225. – P.294-303.

28. *Thorvaldsen J.L., et al.* Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and *Jgf2* // *Genes. Dev.* – 1998. – Vol. 12. – P.3693-3702.

29. *Verona R.E., et al.* Genomic imprinting: Intricacies of epigenetic regulation in clusters // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 19. – P.237-259.

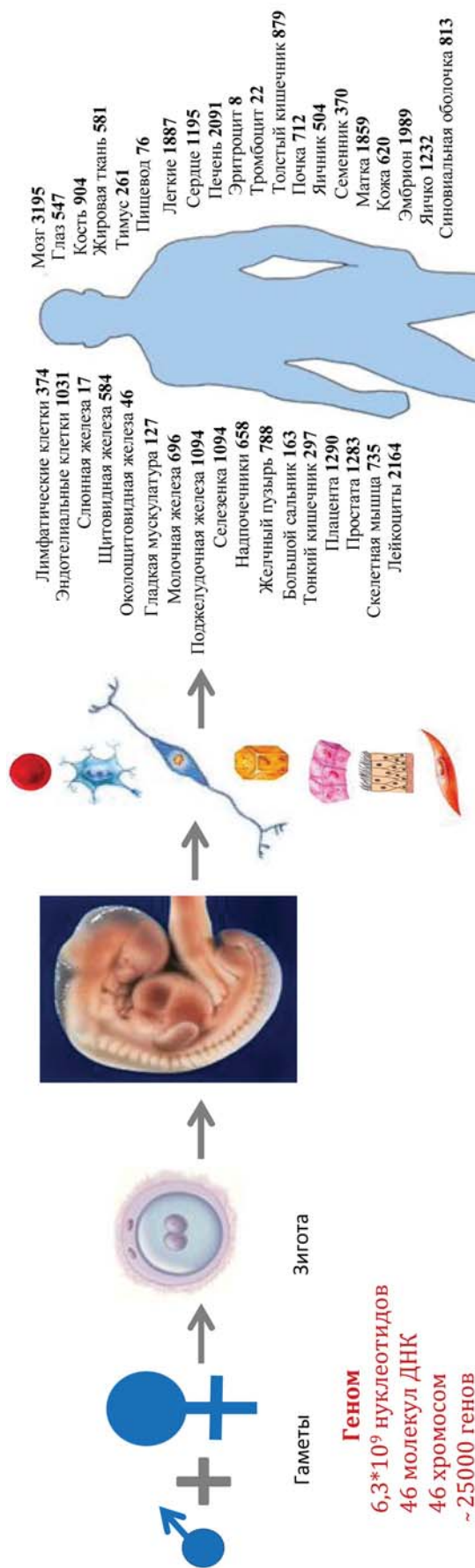
30. *Wutz A., Jaenisch R.* A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation // *Mol. Cell.* – 2000. – Vol. 5. – P.695-705.

Информация об авторе:

Майборода Аскольд Александрович – заведующий кафедрой медицинской биологии, профессор, д.б.н., 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, 1

Information About the Author:

Mayboroda Askold A. – Head of the Department of Medical Biology, Professor, Doctor of Biological Sciences, 664003, Irkutsk, Krasnogo Vosstania str., 1



Более 200 гистологических типов клеток, как результат дифференциальной активности генов и транскрибирующей системы ДНК

Примерное количество генов, вовлечённых в развитие и функционирование органов и тканей человека (цитировано по Сойфер, 1998;И. Жимулев, 2003)

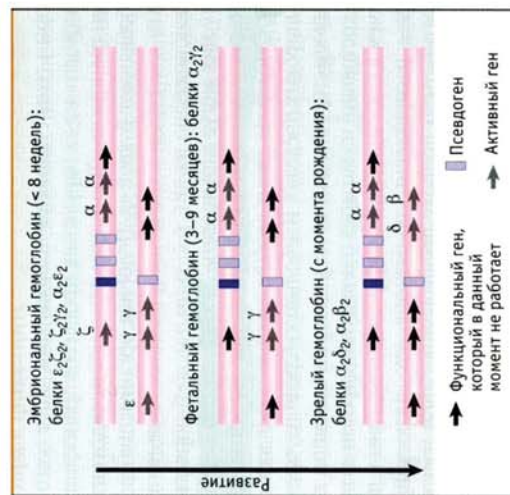


Рис.2. Последовательная экспрессии генов глобина в процессе развития [7]

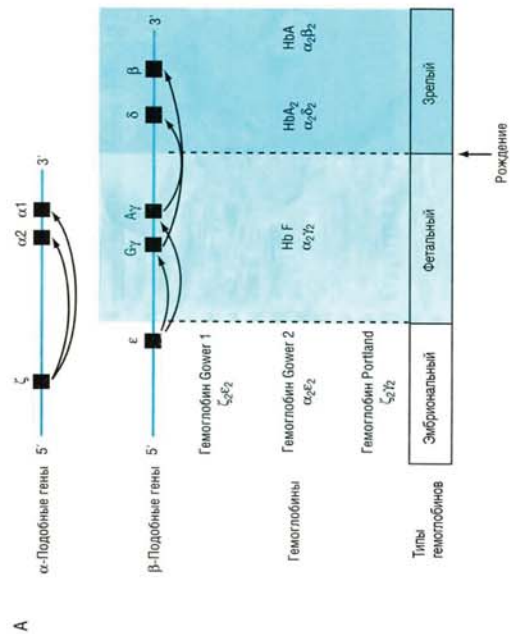


Рис. 3. Организация генов глобина у человека и гемоглобины, синтезируемые на разных этапах онтогенеза [7]



Рис.4. Четыре гиперчувствительных сайта расположены на 5'-конце, один — на 3'-конце. Группа 5'-концевых гиперчувствительных сайтов соответствует LCR[7]

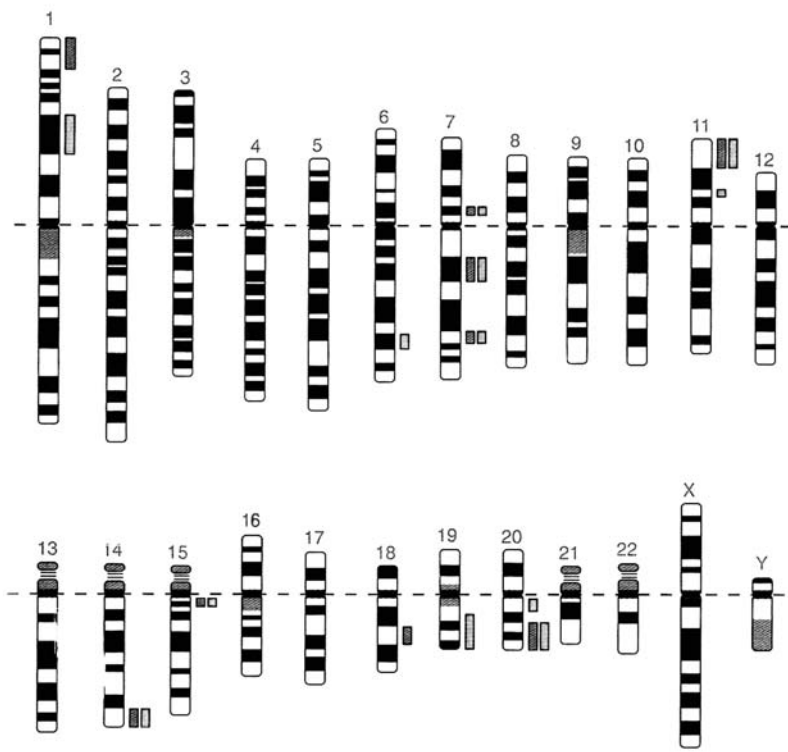


Рис.5. Карта регионов импринтинга генома человека. Копии наследуемые от матери показаны черным, наследуемые от отца — светлым [7]

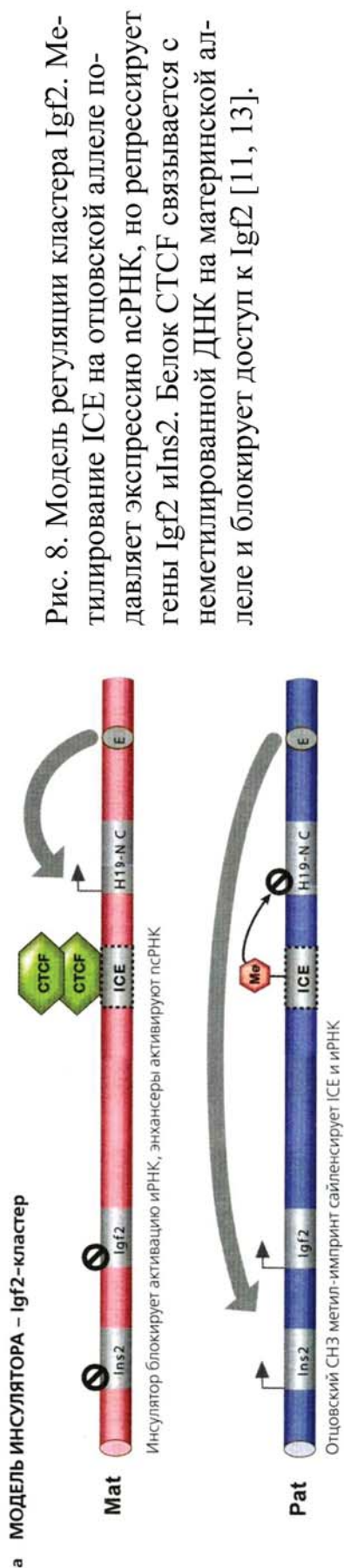


Рис. 8. Модель регуляции кластера Igf2. Метилирование ICE на отцовской аллеле подавляет экспрессию иРНК, но репрессирует гены Igf2 и Ins2. Белок CTCF связывается с неметилированной ДНК на материнской аллеле и блокирует доступ к Igf2 [11, 13].

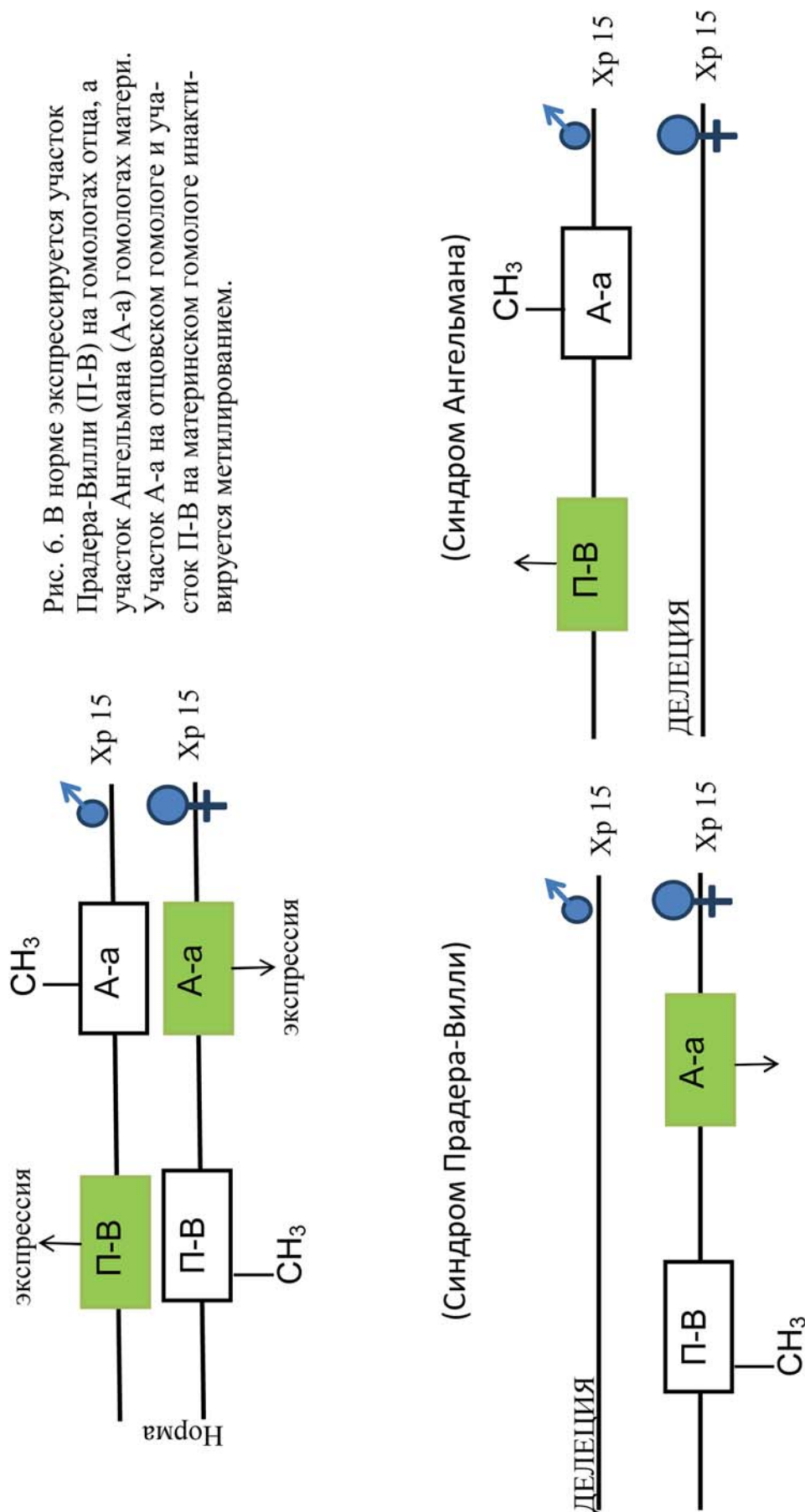


Рис. 6. В норме экспрессируется участок Прадера-Вилли (П-В) на гомологах отца, а участок Ангельмана (А-а) гомологах матери. Участок А-а на отцовском гомологе и участок П-В на материнском гомологе инактивируется метилированием.

Рис. 7. Делеции, как наиболее частые причины синдромов Прадера-Вилли (П-В) и Ангельмана (А-а), приводят к блокаде экспрессии либо участка П-В на гомологах отцовской хромосомы либо участка А-а на гомологах материнской. Заболевание проявляется в случае отсутствия экспрессии соответствующего гена.