

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе
протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой,
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

Е. А. Бессолицына

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Модуль 3

Реорганизация геномов

Конспект лекций

Учебно-методическое пособие

Киров 2011

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Е. А. БЕССОЛИЦЫНА

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Модуль 3

Реорганизация геномов

Конспект лекций

Учебно-методическое пособие

Киров

2011

УДК

К

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения

Рецензент

доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВПО «ВятГУ»,

кандидат биологических наук

О. Н. Шуплецова

Бессолицына Е. А.

К

Молекулярная генетика конспект лекций модуль 3 «Реорганизация геномов»: учебно-методическое пособие / Е. А. Бессолицына – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 89 с.

УДК

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения для изучения дисциплины «Молекулярная генетика».

Тех. редактор Е. В. Кайгородцева

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

Оглавление

Механизмы геномных перестроек: рекомбинация	6
Гомологичная рекомбинация	7
Механизм гомологичной рекомбинации	10
Гомологичная рекомбинация у эукариот	13
Кроссинговер или мейотическая рекомбинация	14
Генная конверсия	16
Сайт-специфическая рекомбинация	20
Мобильные элементы бактерий	26
Нечетные транспозоны. Репликативная транспозиция (Tn3)	28
Четные транспозоны. Консервативная транспозиция (Tn10)	29
Мобильные элементы эукариот	31
Незаконная рекомбинация	34
Рекомбинационные перестройки генов	36
Перестройки хроматина	38
Включение комплексов ремоделирования в определенные участки хромосом	43
Модификация гистонов — это ключевой фактор изменения структуры хроматина	46
Ацетилирование гистонов	50
Связь метилирования ДНК и гистонов	57
Переходы между состояниями хроматина происходят через модификацию его компонентов	59
Фосфорилирование гистонов	61
Эпигенетика	62
Распределение гетерохроматина	63
Образование гетерохроматина	65
Репрессоры и активаторы: белки-антагонисты Polycomb и Trithorax	69
Преобразования X-хромосомы	73
Поддерживающая метилаза обеспечивает воспроизводство статуса метилирования ДНК	78
Метилирование ДНК обуславливает импринтинг	81
Импринтинг генов с противоположной половой специфичностью может контролироваться из одного центра на хромосоме	84
Эпигенетические эффекты могут наследоваться	85

Механизмы геномных перестроек: рекомбинация

Геном живых организмов не является статичной структурой поэтому в нем периодически происходят перестройки, причины этих перестроек самые разнообразные: защита при повреждениях генома (СОС-репарация), достижение большего варьирования наследуемых признаков (кроссинговер), умножение уже имеющихся признаков (генная конверсия, перестройка генов иммуноглобулинов), а так же «собственная инициатива» как паразитов (вирусов), так и сателлитов (мобильные генетические элементы) генома. Но механизмов три – общая или гомологичная, неспецифическая или случайная и сайтспецифическая рекомбинация.

Рекомбинацией в общем смысле слова можно назвать возникновение новых последовательностей ДНК за счет разрывов и перевоссоединений предсуществующих молекул. Это понятие объединяет обширный круг разнообразных биологических явлений, роль которых будет рассмотрена по мере их описания.

Существуют три типа рекомбинации: общая, или гомологичная, сайт-специфическая и случайная или негомологичная.

Общая рекомбинация. Общая рекомбинация происходит, как правило, между протяженными участками идентичных или гомологичных нуклеотидных последовательностей. Ее часто называют гомологичной рекомбинацией или кроссинговером. При общей рекомбинации происходит разрыв двух гомологичных участков ДНК, и каждый из концов одного сегмента соединяется с соответствующими участками и другого таким образом, что обе образующиеся молекулы содержат разные фрагменты обеих участвующих в рекомбинации ДНК. На самом деле сайты, по которым происходят разрыв и воссоединение каждой их двух цепей, очень часто не совпадают.

Сайт-специфическая рекомбинация это процесс рекомбинации, в котором участвуют короткие (до 25 нт) фрагменты ДНК, которые могут быть

как только в одной из рекомбинирующих ДНК так и в обеих. Примером такого процесса является встройка фага λ в молекулу *E.coli*.

Негомологичная рекомбинация. Рекомбинация между негомологичными нуклеотидными последовательностями происходит в клетках прокариот и дрожжей достаточно редко, а в клетках млекопитающих - весьма часто. К негомологичной рекомбинации можно отнести процесс случайного встраивания вирусной или плазмидной ДНК, в ДНК клеток животных, в результате чего в реплицирующихся геномах вирусов появляется множество делеций и дупликаций.

Рассмотрим все эти типы подробнее.

Гомологичная рекомбинация

Как было сказано выше для протекания этого процесса необходимо существование протяженных гомологичных участков ДНК. Обычно общая рекомбинация происходит между гомологичными и аллельными участками разных молекул ДНК, но она может произойти и между гомологичными, но не аллельными областями рекомбинирующих молекул. В таком случае один из продуктов рекомбинации утрачивает часть ДНК, а другой приобретает "лишний" сегмент. Такой процесс получил название неравного кроссинговера. Иногда рекомбинация происходит между неаллельными участками одной и той же хромосомы (например, между повторяющимися последовательностями ДНК) с соответствующей потерей области, лежащей между сайтами рекомбинации. В отличие от уже рассмотренных случаев некоторые рекомбинационные события не реципрокны; как следствии, один из образовавшихся продуктов идентичен одной из исходных молекул, а другой отличается от обоих партнеров. Такой процесс часто называется геной конверсией.

Необходимость этих протяженных участков позволяет предположить, что в этом процессе участвует комплементарное спаривание между цепями ДНК, принадлежащими разным рекомбинирующим дуплексам. Это предположение было достаточно четко экспериментально обосновано, и в настоящее время

можно считать общепринятым, что гомологичная рекомбинация происходит через образование промежуточного соединения, называемого структурой Холидея или полухиазмой. В полухиазме осуществлено комплементарное спаривание между одноцепочечными участками, принадлежащими разным родительским молекулам ДНК. В результате в полухиазме имеются гетеродуплексные районы. Этот факт, как и многие другие особенности общей рекомбинации, был установлен в генетических опытах на дрожжах и других аскомицетах, поскольку при работе с этими организмами можно проследить за всеми продуктами индивидуального рекомбинационного события. Действительно, в результате мейоза у диплоидных дрожжей, гетерозиготных по какому-либо гену, образуются гаплоидные споры, которые иногда дают начало колонии, состоящей из двух секторов, одного — с одним аллелем родительской гетерозиготы и другого — с другим аллелем. Это значит, что спора, давшая начало такой колонии, несла оба аллеля в одной молекуле ДНК, т. е. соответствующий участок хромосомы этой споры был гетеродуплексным. Описанное явление называется постмейотической сегрегацией.

Структура Холидея способна свободно перемещаться в обе стороны вдоль рекомбинирующих молекул ДНК. При этом обе гомологичные молекулы вращаются вокруг своей оси, а гетеродуплексный участок удлиняется или укорачивается в зависимости от направления смещения полухиазмы. Такой процесс может быть активным или может происходить спонтанно, за счет вращательной диффузии; называется он миграцией ветви. Так как развернутая полухиазма представляет собой крестообразную структуру, ее можно разрезать двумя способами. В одном случае окажется, что рекомбинирующие молекулы обменялись сравнительно короткими одноцепочечными участками, образовавшими гетеродуплексные районы. При другом способе рекомбинирующие молекулы обмениваются своими частями, находящимися по обе стороны от места образования полухиазмы, часто именно этот случай называют собственно рекомбинацией.



Рисунок 1: Схема генной конверсии

Как уже говорилось, цепи ДНК в гетеродуплексе могут быть не полностью комплементарны друг другу. Судьба гетеродуплексных районов, образовавшихся в результате рекомбинации, может быть двойкой: если неспаренные основания гетеродуплекса не репарируются, то после репликации каждая цепь ДНК даст дуплекс с такой же последовательностью, как у молекулы ДНК, из которой она произошла

(в случае рекомбинации в мейозе это приведет к пост-мейотической сегрегации); если же произойдет репарация неспаренных оснований, то информация, заключавшаяся в одной из цепей гетеродуплекса, исчезнет и заменится на информацию другой цепи. В отличие от других случаев рекомбинации в этом последнем случае один из двух возможных рекомбинантных продуктов исчезает и превращается (англ. convert) в другой, поэтому этот вариант рекомбинации называют генной конверсией.

Механизм гомологичной рекомбинации

Как и во всех процессах в клетке, рекомбинация обеспечивается за счет активности ферментов. Наиболее подробно белки рекомбинации изучены у бактерий, в частности у *E. coli*. У этого организма практически все виды гомологичной рекомбинации зависят от функционирования гена *recA*. Продукт которого белок RecA является основным белком обеспечивающим образование гетеродуплекса. Анализ ферментативной активности этого белка показал, что RecA (молекулярная масса около 40 кД) является ДНК-зависимой АТФазой,

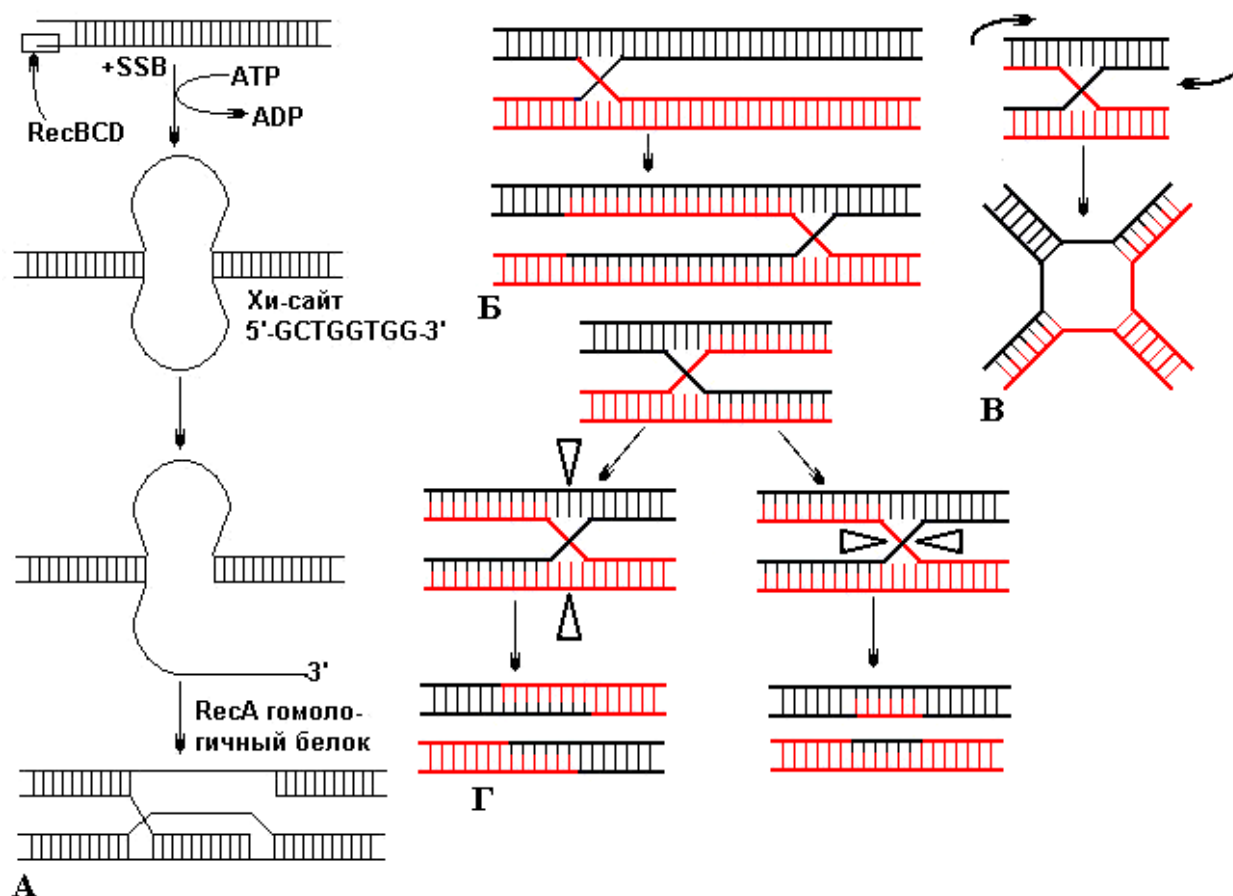


Рисунок 2: Гомологичная рекомбинация: А - механизм рекомбинации; Б — миграция ветви; В — структура пулухиазмы; Г — варианты разрезания пулухиазмы
 способной заменять одну из цепей дуплекса ДНК на гомологичную. Одна из реакций, которую может проводить очищенный RecA-белок *in vitro*, — образование так называемой D-петли. Для осуществления этой реакции RecA-белок покрывает одноцепочечную ДНК и такой комплекс связывается с двуцепочечной ДНК. Затем происходит перемещение однонитевой ДНК вдоль дуплекса до тех пор, пока не будет найден участок гомологии (если это

возможно). Процесс поиска является активным и требует гидролиза АТФ. Показано, что дуплекс ДНК в комплексе с RecA-белком и одноцепочечной ДНК заметно раскручен (вне зависимости от того, гомологична однонитевая ДНК дуплексу или нет); по всей вероятности, это облегчает поиск гомологии. После того как гомология найдена, RecA-белок проводит замену одной цепи ДНК на другую в активном процессе, требующем гидролиза АТФ и имеющем вполне определенную направленность: перенос начинается с 3'-конца и продолжается в направлении от 3' к 5'. Другими словами, RecA-белок активно проводит однонитевую миграцию ветви. Более того, при наличии второго свободного конца RecA-белок способен обменивать цепи ДНК между двумя дуплексами, продвигая вдоль ДНК (миграция ветви) образовавшуюся таким образом структуру Холлидея.

Однако для начала поиска гомологии и дальнейшего обмена цепями необходимо наличие одноцепочечной ДНК.

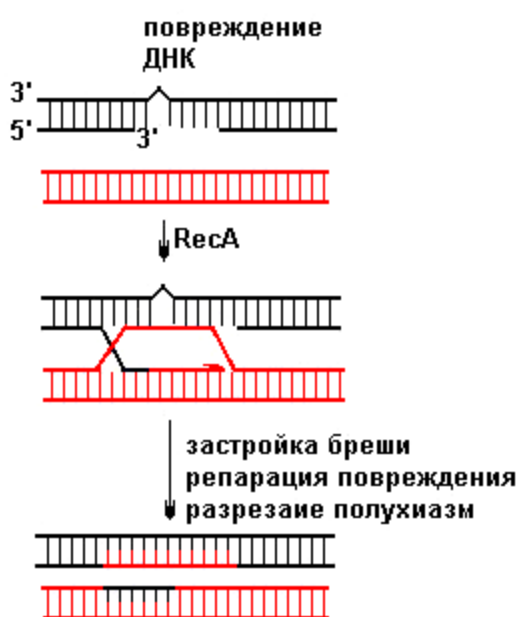


Рисунок 3: Механизм репаративной рекомбинации

У *E. coli* эта ДНК может образовываться несколькими путями в зависимости от того какие нуклеазы «ассистируют» RecA-белку в ходе рекомбинации. Наиболее эффективным является так называемый RecBC-путь, зависящий, как следует из названия, от продуктов генов *recB* и *recC* кодирующих две из трех субъединицы одного фермента — экзонуклеазы V или нуклеазы RecBCD.

RecBC путь рекомбинации активируется в бактериях при наличии двуцепочечных концов ДНК, которые могут возникнуть при радиоактивном облучении ДНК. Нуклеаза RecBCD узнает свободный конец ДНК, присоединяется к нему и осуществляет следующую любопытную реакцию. Используя энергию гидролиза АТФ, фермент перемещается вдоль ДНК и, подобно хеликазам, расплетает дуплекс ДНК. В отличие от других

хеликаз RecBCD-белок позволяет ДНК ренатурировать, но расплетание происходит с большей скоростью, чем восстановление дуплекса, поэтому по мере продвижения нуклеазы RecBCD вдоль ДНК постепенно образуются все более протяженные одностранные петли. Если фермент встречает определенную последовательность ДНК, называемую *хи-сайтом*, то он вносит в нее одноцепочечный разрыв. В результате одна из петель превращается в длинный одностранный «хвост». Нетрудно видеть, что такая структура является идеальной для дальнейшего взаимодействия с RecA-белком. Любопытно, что последовательность *хи-сайта* асимметрична и разрезается нуклеазой RecBCD лишь в том случае, если она «подъезжает» к *хи-сайту* с нужной стороны.

Для успешного протекания рекомбинации так же необходим SSB-белок, который покрывает образованную в результате действия RecBCD-белка одноцепочечную ДНК и предохраняет ее от действия нуклеазы: без SSB-белка нуклеаза RecBCD *in vitro*, вместо того чтобы осуществлять описанную реакцию, деградирует обе цепи ДНК, начиная с конца. Кроме того, SSB-белок способствует действию RecA-белка. Мутации по гену *ssb* заметно влияют на рекомбинацию. Рекомбинация не заканчивается образованием полухиазмы. Эта структура должна быть еще соответствующим образом разрезана. За этот процесс отвечают продукты генов *gvaA* (тетрамер присоединяющийся к структуре Холидея), *gvaB*, *gvaC* (нуклеаза разрезающая структуру Холидея) все эти белки образуют резольвасому. В гомологичной рекомбинации также могут принимать участие топоизомеразы. Например, создаваемая ДНК-гиразой отрицательная сверхспирализация заметно облегчает образование D-петель, поскольку последний процесс снимает механические напряжения, существующие в сверхспиральных молекулах.

Так как рекомбинация у бактерий требует образования двух и одноцепочечных разрывов ДНК, можно предположить, что этот процесс участвует в «залечивании» то есть репарации ДНК. Часто ДНК полимеразы пропускает тиминные димеры и разрывы ДНК в результате образуются бреши. И единственный способ безошибочной репарации таких повреждений — это

использовать в качестве эталона второй полученный при репликации дуплекса ДНК, т. е. использовать рекомбинацию для репарации повреждения. У *E. coli* эту задачу способен выполнить RecA-белок вместе с ферментами репарации. Для RecA-белка одноцепочечный участок двуспиральной молекулы ДНК, содержащий повреждение, является «излюбленным» участком связывания. Связавшись с таким местом, RecA-белок вовлекает его в рекомбинационное взаимодействие с гомологичным неповрежденным дуплексом, причем как разорванная, так и поврежденная цепи ДНК оказываются спаренными с неповрежденными комплементарными цепями, что позволяет их репарацию описанными в предыдущей главе репарационными системами. Таким путем осуществляется пострепликативная, или рекомбинационная, репарация.

Аналогичным образом за счет рекомбинации происходит репарация двуцепочечных разрывов ДНК. Из изложенного следует, что, по крайней мере у бактерий, системы репарации и рекомбинации сложным образом переплетены и связаны между собой.

Гомологичная рекомбинация у эукариот

У эукариот рекомбинация более распространена чем у бактерий но известно о ней на данный момент значительно меньше.

Рекомбинация может происходить между гомологичными генами соматических клеток многоклеточных или при вегетативном росте одноклеточных эукариот. Частота этой рекомбинации очень невелика, поскольку такая, *митотическая*, рекомбинация может сопровождаться нежелательными последствиями (например, возникновением мозаицизма). Большинство случаев митотической рекомбинации, по-видимому, связаны с репарацией. Действительно, митотическую рекомбинацию можно существенно стимулировать, повредив ДНК, например облучением.

Механизм митотической рекомбинации сравнительно хорошо изучен у дрожжей. На этом объекте показано, что в соответствии с вышеизложенным двуцепочечные разрывы в ДНК на несколько порядков стимулируют

рекомбинацию. Стимулирующее действие оказывает не только разрыв, но и двуцепочечная брешь.

Ферментативный аппарат, осуществляющий рекомбинацию у эукариот, как правило, не известен, хотя ясно, что выявление ферментов эукариотической рекомбинации — дело ближайших нескольких лет. Похоже, что центральную роль в рекомбинации должен играть белок, напоминающий Rec-A-белок *E. coli*. Действительно, у низшего эукариотического организма *Usiilago maydis* выделен такой RecA-подобный белок — продукт гена *reel*. Его свойства в целом напоминают свойства RecA-белка, но перенос цепи с одного дуплекса ДНК на другой белок Reel начинает с 5'-конца. Любопытное свойство белка Reel состоит в том, что в ходе АТФ-зависимого поиска гомологии и гомологичного спаривания он, видимо, образует структуру ДНК, в которой цепи не закручены друг вокруг друга (в ограниченной степени это относится и к RecA-белку *E. coli*). Достигается это за счет того, что в комплексе с белком Reel ДНК находится частично в обычной В-форме, а частично в левозакрученной Z-форме, т. е. делает виток влево, виток вправо. Поэтому не исключено, что последовательности ДНК, способные легко переходить в Z-форму (альтернирующие пурин-пиримидиновые последовательности), служат участками предпочтительной инициации рекомбинации. У дрожжей выделен аналог RecA Rad51 также участвующий в репарации. Аналог Rad51 у человека HsRad51 так же белок репарации, в комплексе с ним у человека выделены белки BRCA1 и BRCA2.

Кроссинговер или мейотическая рекомбинация

В мейозе у эукариот гомологичные хромосомы, полученные организмом от отца и от матери, расходятся по разным клеткам. Правильное расхождение, при котором гомологи каждой пары расходятся в первом делении мейоза по разным дочерним клеткам, обеспечивается тем, что гомологичные хромосомы узнают друг друга и спариваются на всем своем протяжении (синапс). Две вытянутые друг вдоль друга гомологичные хромосомы образуют в профазе

первого деления мейоза особую структуру, так называемый синаптонемный комплекс.

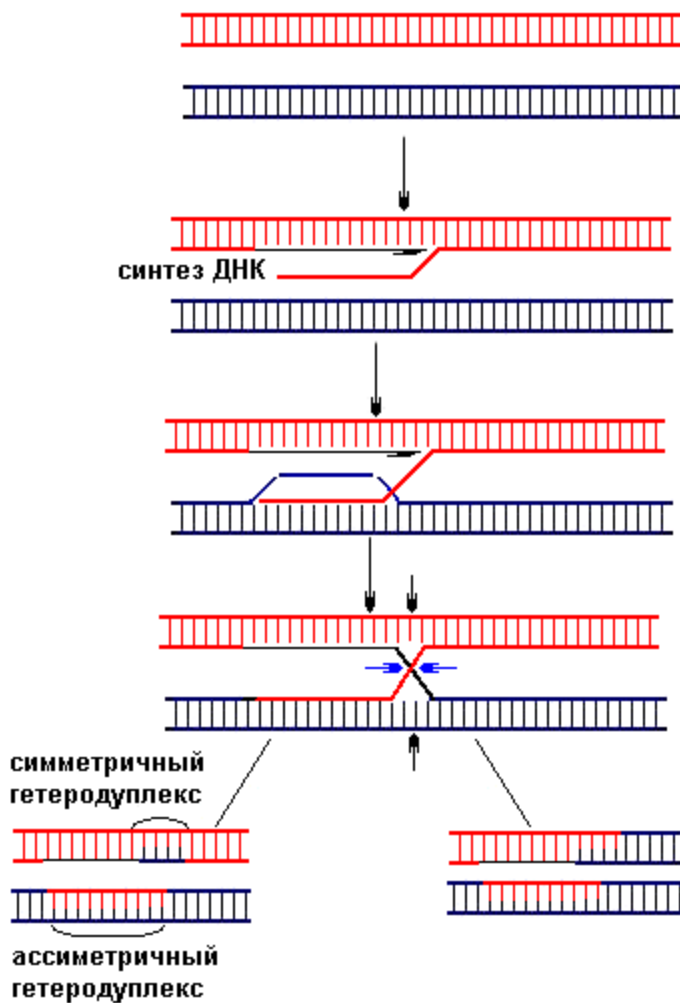


Рисунок 4: Механизм мейотической рекомбинации, модель Мезелсона-Рэддинга

Молекулярное строение синаптонемного комплекса не ясно, но считается, что эта структура, обеспечивающая гомологичное спаривание хромосом, способствует рекомбинации между ними. Собственно рекомбинация проходит, по-видимому, в специализированных структурах, наблюдающихся на синаптонемном комплексе и называемых рекомбинационными узелками. Рекомбинационный обмен, кроссинговер, между гомологичными хромосомами в мейозе играет важную роль. Когда перед первым делением мейоза хромосомы конденсируются, то

сестринские хроматиды удерживаются вместе, но из-за кроссинговера между несестринскими хроматидами гомологичные хромосомы тоже оказываются связанными в участках кроссинговера, называемых хиазмами. Такое связывание гомологов обеспечивает их правильную ориентацию на экваторе делящейся клетки и последующее упорядоченное расхождение по дочерним клеткам. Таким образом, возникшие благодаря гомологичной рекомбинации хиазмы выполняют в первом делении мейоза функцию, аналогичную функции центромер в митозе (второе деление мейоза напоминает обычный митоз,

упорядоченную сегрегацию хромосом во втором делении обеспечивают центромеры).

Механизм образования синаптонемного комплекса и ферментативный аппарат, обеспечивающий рекомбинацию в мейозе, не изучены, однако большое количество генетических данных, полученных в основном на аскомицетах, указывает на то, что происходит при рекомбинации с ДНК. Мейотическую рекомбинацию сопровождают как генная конверсия, так и постмейотическая сегрегация в том месте, где произошел кроссинговер; значит, этот вид рекомбинации проходит через образование полухиазм и гетеродуплексных участков ДНК. Многие данные по рекомбинации в мейозе можно объяснить с помощью модели рекомбинации-репарации двуцепочечного разрыва, предложенной для митотической рекомбинации, но есть и другая модель, предложенная в свое время специально для объяснения данных по мейотической рекомбинации и лучше объясняющая некоторые детали процесса. Генная конверсия в этой модели является следствием репарации гетеродуплекса в сторону одной из родительских молекул, отсутствие репарации приводит к постмейотической сегрегации. В настоящее время показано, что двуцепочечный разрыв может инициировать рекомбинацию в мейозе, но, как правило, рекомбинация начинается с одноцепочечного разрыва в соответствии с моделью Мезелсона — Рэддинга.

Кроме систем рекомбинации, выполняющих общие функции, например рекомбинацию в мейозе у эукариот или рекомбинационную репарацию у всех организмов, существуют специализированные системы гомологичной рекомбинации, выполняющие ту или иную частную задачу. Примером такой рекомбинации может служить генная конверсия.

Генная конверсия

Примеры специализированных систем общей рекомбинации можно найти у паразитов, которые с их помощью борются с иммунной системой организмов-хозяев. Так, у гонококков, вызывающих гонорею, имеется много копий генов, кодирующих иммунологически различные варианты пилина — белка,

образующего пили (ворсинки) на поверхности этих бактерий и являющегося одним из основных факторов вирулентности (пили обеспечивают прикрепление гонококков к эпителию мочеполовой системы). Экспрессируются лишь те гены, которые находятся в локусах, называемых *pile*, они и определяют, какой пилин представлен на поверхности клеток. С довольно высокой частотой ген *pitE* утрачивается и бактерия лишается пилей, но за счет рекомбинационного взаимодействия (скорее всего генной конверсии) «остатков» гена *pile* с каким-нибудь из молчащих генов, расположенных в других местах, в локусах *pilS_t*, восстанавливается новый ген *pitE* с последовательностью, характерной для гена *pilS_t* донора информации при рекомбинации. Таким способом гонококки сравнительно часто меняют иммунологические свойства пилей и не позволяют развиваться эффективному иммунному ответу.

Совершенно аналогичную стратегию использует возбудитель возвратного тифа *Borelia*, который за счет рекомбинации время от времени меняет структуру поверхностного белка, являющегося главным антигеном, распознаваемым иммунной системой человеческого организма.

Рекомбинационные переключения поверхностных антигенов патогенных микроорганизмов характерны не только для бактерий. Этот способ ускользания патогена от действия защитных средств организма был, собственно, и открыт на эукариотическом болезнетворном агенте — возбудителе сонной болезни *Trypanosoma brucei*. Как и вышеописанные бактерии, трипаносомы имеют множество копий генов так называемого переменного поверхностного гликопротеина, но экспрессируется только одна копия. Обычно экспрессирующаяся копия находится на конце той или иной хромосомы (в теломерной области). Замена экспрессирующейся копии на новую происходит в результате гомологичной рекомбинации, приводящей к обмену теломерами между хромосомами или в результате генной конверсии с участием экспрессирующейся копии и молчащей копии, расположенной в каком-нибудь другом месте генома трипаносомы. На этой сравнительно хорошо изученной системе показано, что кроссинговер или конверсия могут не только заменить

один ген на другой в предназначенном для экспрессии участке генома, но способны увеличивать разнообразие поверхностных гликопротеинов за счет того, что при рекомбинации возможен перенос не целого гена, а его части и образование гибридного, т. е. нового, варианта гена.

Во всех трех описанных случаях паразитические микроорганизмы используют обычный клеточный рекомбинационный аппарат, а единственная «тактическая хитрость» состоит в организации соответствующих генов: имеется экспрессирующая копия и множество различающихся между собой молчащих. Большое количество последних обеспечивает сравнительно случайный выбор копии для замены и заметную частоту процесса, хотя рекомбинация идет с относительно низкой частотой, которая оказывается достаточной лишь в силу огромных размеров популяций патогенных микроорганизмов. В тех случаях, когда необходима высокая частота рекомбинации, рекомбинационный аппарат клетки должен быть снабжен дополнительными белками. Пример такого рода хорошо изучен на системе смены типа спаривания у дрожжей.

Гаплоидные дрожжи — сахаромидеты — бывают двух типов

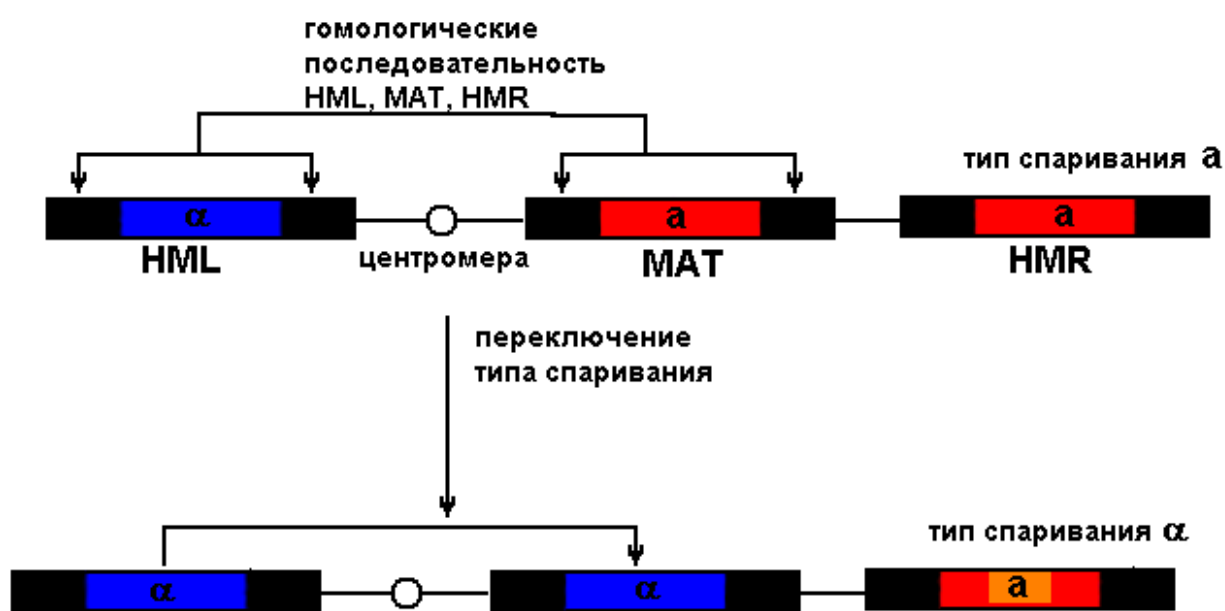


Рисунок 5: Генная конверсия, на примере механизма переключения типа спаривания у дрожжей

спаривания. Клетки разных типов спаривания умеют находить друг друга и образовывать a/α -диплоиды, способные претерпевать мейоз с образованием четырех гаплоидных спор. У некоторых (гомоталлических) штаммов дрожжей происходит эффективное переключение типа спаривания: дрожжи α -типа способны превращаться в дрожжи a -типа, и наоборот. Такое переключение связано со специализированной системой гомологичной рекомбинации. У дрожжей имеется три копии генов, ответственных за тип спаривания. Все три копии расположены на одной хромосоме, но экспрессируются гены лишь одной из них, расположенной в локусе MAT. Слева и справа от MAT-локуса на значительном расстоянии находятся молчащие копии: HML α , содержащая информацию, необходимую для того, чтобы дрожжи были a -типа спаривания, и HMR α с информацией, определяющей α -тип спаривания. Последовательность ДНК в MAT-локусе идентична либо левой (MAT α -дрожжи), либо правой (MAT a -дрожжи) молчащей копии. В дрожжах, способных к переключению, с очень высокой частотой происходит замена информации, содержащейся в MAT-локусе, на информацию одной из молчащих копий генов типа спаривания. Показано, что замена происходит путем генной конверсии по механизму репарации двуцепочечного разрыва ДНК. Процесс инициирует специальная сайт-специфическая эндонуклеаза, продукт гена HO, которая вносит разрыв в определенную последовательность ДНК MAT-локуса. Репарация разрыва в гаплоидных клетках может происходить лишь рекомбинационным путем, с использованием в качестве эталона HML-или HMR-копий генов типа спаривания. В одном случае переключения не произойдет, поскольку последовательности ДНК в MAT-локусе и в одной из молчащих копий идентичны, а в другом случае произойдет следующее: экзонуклеазы расширят разрыв до тех пор, пока концы образовавшейся брешки не окажутся гомологичными соответствующим участкам молчащей копии генов, определяющих противоположный тип спаривания. Затем ДНК этих генов используется в качестве матрицы для застройки брешки, т. е. содержащаяся в MAT-локусе информация утрачивается и заменяется на

информацию генов другого типа спаривания. В диплоидных *a/α* дрожжах экспрессируются два MAT-локуса: *a* и *α*. В такой ситуации ген HO не работает и никаких переключений не происходит. Таким образом, приспособление дрожжевой клетки для переключения типа спаривания фактически состоит из одного фермента — сайт-специфической эндонуклеазы.

Сайт-специфическая рекомбинация

Сайт-специфическая рекомбинация происходит между специфическими последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков гомологии, обычно 15-30 п.н. Она широко распространена у прокариот и низших эукариот. Сайт-специфическая рекомбинация обеспечивает интеграцию (включение) ДНК умеренных фагов в хромосомы бактерий, инверсию (изменение ориентации) отдельных участков ДНК в хромосомах бактерий и бактериофагов и в так называемой 2-микронной плазмиде дрожжей, а также другие процессы, играющие важную роль в циклах развития фагов и бактерий. Редкий, если не единственный, но зато жизненно важный пример сайт-специфической рекомбинации у многоклеточных животных - перестройки в последовательностях ДНК, кодирующих иммуноглобулины, - белковые молекулы, распознающие тот или иной антиген при иммунном ответе у позвоночных.

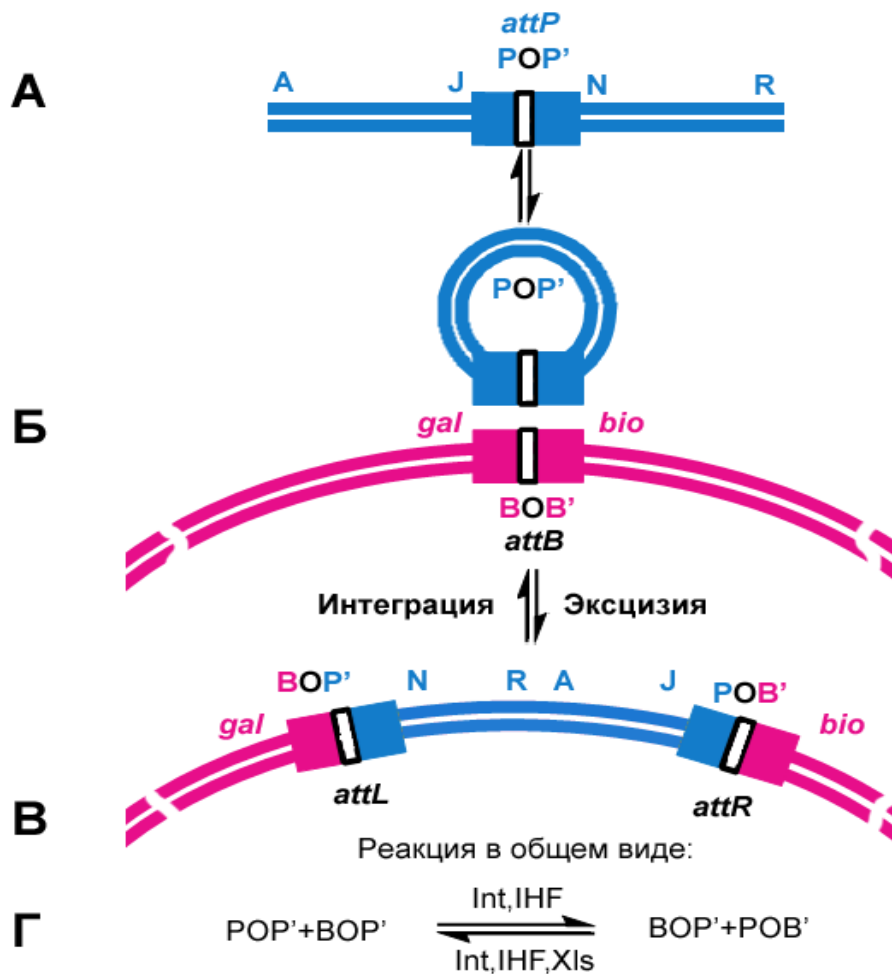


Рисунок 6: Схема сайт-специфической рекомбинации у фага лямбда. Линии соответствуют цепям ДНК, две параллельные линии - дуплексу. Синим цветом изображена ДНК фага, красным - часть кольцевой хромосомы *E. coli*. P , P' и B , B' - последовательности сайтов $attP$ и $attB$ соответственно, окружающие центральную часть (O). A , J , N и R - гены фага. а - линейная (вирионная) ДНК фага; б - ДНК фага после инфекции в клетку *E. coli* замыкается в кольцо, и находящийся в ней сайт $attP$ вступает в рекомбинацию с сайтом $attB$ в хромосоме бактерии. в - продукт рекомбинации - профаг в составе хромосомы бактерии; г - запись процесса рекомбинации в общем виде.

Наиболее изучена она у умеренного бактериофага лямбда. После инфекции в клетку *E. coli* линейная вирионная двуцепочечная ДНК фага замыкается в кольцо за счет имеющихся на ее концах комплементарных одноцепочечных последовательностей. Последующее развитие фага может идти по пути интеграции в хромосому бактерии между генами *gal* и *bio*. Интеграция происходит путем рекомбинации между особыми att

(attachment)-сайтами: $attP$ в хромосоме фага и $attB$ в хромосоме бактерии. Интегрированный фаг называется профагом. Он фланкирован рекомбинантными сайтами $attL$ (левый) и $attR$ (правый). Вырезание (эксцизия) профага из хромосомы происходит в обратной последовательности событий.

Из нее видно, что в интегративной рекомбинации участвуют сайты attP и attB, продукт фагового гена *int* (интеграза) и белок IHF (Integration Host Factor) *E. coli*. Для эксцизии необходимы сайты attL и attR, те же белки и еще продукт фагового гена *xis*. Сайты attP и attB неравноценны. Первый устроен сложно. При размере около 270 п.н. он состоит из центральной части O и двух примыкающих к ней частей: P и P'. Внутри сайта attP располагаются участки связывания с интегразой и белками IHF и Xis. Сайт attB устроен проще. Его размер всего 23 п.н., гомология с attP ограничена центральной частью из 15 п.н., в которой имеются два сайта связывания с интегразой. Интеграза является топоизомеразой типа I, но только сайт-специфической. В результате образования комплекса интегразы с attP-сайтом и белком IHF формируется сложно уложенная нуклеопротеидная структура, которая захватывает сайт attB. В этой структуре последовательности ДНК att-сайтов связываются за счет взаимодействий между субъединицами интегразы и затем подвергаются согласованному расщеплению.

Как и все топоизомеразы I, интеграза делает разрыв в одной цепи каждого дуплекса, и в месте разрыва образуются 3'-P и 5'-ОН-концы ДНК. Фермент ковалентно связывается с 3'-P-концом, благодаря чему энергия разорванной фосфодиэфирной связи сохраняется, и для последующего замыкания разрыва, осуществляемого тем же ферментом, не требуется дополнительной энергии. Этим топоизомеразы отличаются от ДНК-лигаз, использующих для сшивания концов цепей ДНК энергию, освобождающуюся за счет гидролиза соединений типа АТФ. Поэтому разрыв полинуклеотидной цепи, образуемый топоизомеразой, называют "временным" в отличие от фиксированных одноцепочечных разрывов, производимых эндонуклеазами. При этом интеграза может осуществлять

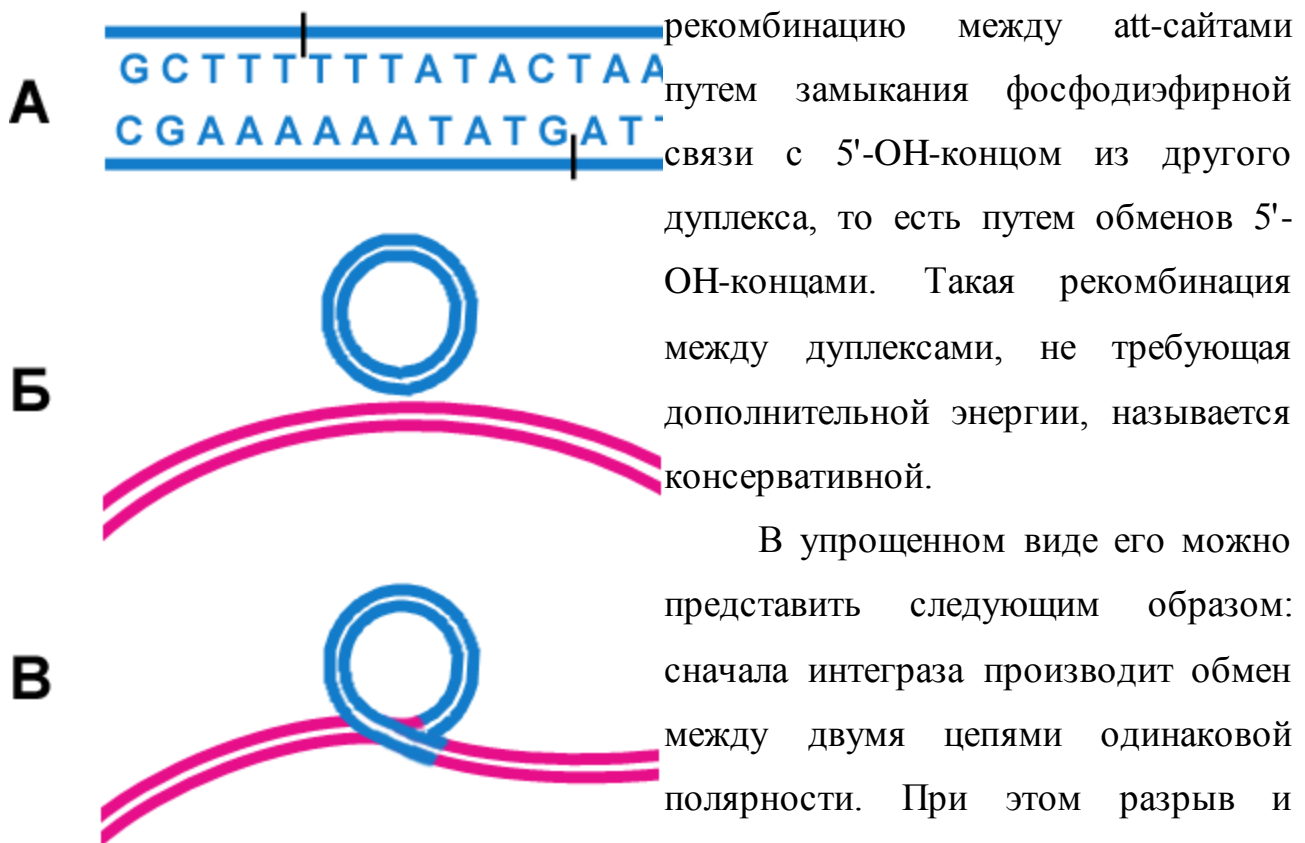


Рисунок 7: Схема двух основных этапов интегративной рекомбинации у фага лямбда: а - нуклеотидная последовательность att-сайтов в центральной части O. Вертикальные черточки указывают сайты разрывов, предшествующих обмену цепями между attP и attB; б - промежуточная структура, образовавшаяся после обмена между двумя цепями ДНК одинаковой полярности в att-сайтах. Физически она соответствует полухиазме Холлидея; в - продукт завершённой рекомбинации.

В упрощенном виде его можно представить следующим образом: сначала интегразы производят обмен между двумя цепями одинаковой полярности. При этом разрыв и воссоединение цепей происходят между строго определенными нуклеотидами в центральной части att-сайтов. В результате возникает структура, физически соответствующая полухиазме Холлидея. Затем на расстоянии 7 п.н. происходит вторая пара обменов между двумя другими цепями, не участвовавшими в первом обмене.

Вторая пара обменов приводит к интеграции фага; интегрированный профаг фланкирован рекомбинантными сайтами attL и attR. Предполагается, что для катализа этой реакции необходимы четыре субъединицы интегразы, связанные в att-сайтах.

Важно отметить, что все изученные ферменты, непосредственно осуществляющие сайт-специфическую рекомбинацию у фагов и бактерий, а также белок, катализирующий инверсию в 2-микронной плазмиде дрожжей,

являются сайт-специфическими топоизомеразами I. По уровню гомологии их аминокислотных последовательностей и механизму катализируемых реакций их разделяют на две группы: представителями первой группы являются уже рассмотренная нами интеграза фага лямбда, интегразы других умеренных фагов и белок, катализирующий сайт-специфическую рекомбинацию в плазмиде дрожжей, ко второй относят инвертазы бактерий и фагов и некоторые другие ферменты сайт-специфической рекомбинации. Сайт-специфическая рекомбинация, катализируемая ферментами второй группы, происходит по более простой схеме, чем в случае интеграз. Рассмотрим ее на примере инвертазы фага Mu. В центральной части своей хромосомы фаг содержит особый сегмент G размером около 3 т.п.н. Сегмент имеет на концах инвертированные (обращенные) повторы длиной около 30 п.н. В каждом повторе, в свою очередь, имеется специфический рекомбинационный сайт. Инвертаза проводит рекомбинацию между этими сайтами. Четыре субъединицы фермента, по одной субъединице на каждую цепь ДНК, делают "временные" разрывы в обеих цепях каждого рекомбинационного сайта, то есть одновременно расщепляют все четыре цепи, образуя 5'-P и 3'-ОН-концы. При этом разрывы цепей в каждом дуплексе происходят на расстоянии 2 п.н., так что 3'-конец как бы выступает. Фермент ковалентно связывается с 5'-концами. Затем одна часть первого дуплекса меняется местами с такой же частью второго дуплекса, после чего восстанавливаются фосфодиэфирные связи во всех четырех цепях.

Приведенная реакция, как и большинство из процессов, осуществляемых инвертазами у бактерий кишечной группы и их фагов, входит в особую систему сайт-специфических инверсий ДНК, получившую название Din (от DNA inversions). Помимо фага Mu сайт-специфические инверсии обнаружены у умеренного фага P1 и энтеробактерий *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*. Инверсии специальных сегментов хромосом, ограниченных обращенными повторами ДНК длиной около 30 п.н., происходят с высокой частотой путем рекомбинации в этих повторах. Меняя ориентацию

определенных генов относительно их промоторов, инверсии приводят к включению одних генов и выключению других. Это один из примеров регуляции работы генов путем специфических перестроек ДНК. Они имеют приспособительное значение. Например, у *S. typhimurium* инверсии сегмента H переключают гены H1 и H2, кодирующие разные типы белка флагеллина, из которого построены жгутики, что позволяет этой патогенной для мышей бактерии менять поверхностный антиген и тем самым ускользать от действия иммунной системы хозяина. У фагов инверсии переключают гены, кодирующие разные белки хвостовых отростков, что приводит к смене хозяев - бактерий, в которых может размножаться фаг.

В качестве конкретного примера вернемся к системе инверсий G-сегмента у фага Mu. Сегмент содержит четыре гена: U, U', Sv и Sv'. Два последних представлены в сегменте только своими переменными частями, тогда как их общая константная часть Sc вместе с промотором P примыкает к сегменту слева. Справа от сегмента G расположен ген инвертазы gin. При одной ориентации сегмента (G^+) транскрибируются гены Sv и U, при противоположной ориентации (G^-) функционируют гены Sv' и U'. В первом случае фаг размножается на *E. coli B*, *E. coli K12* и *S. typhimurium*, во втором - на *E. coli C*, *Citrobacter freundii*, *Shigella sonnei* и др. Следует особо отметить, что все работающие в системе Din инвертазы фагов и бактерий заменяют друг друга в рекомбинации *in vitro*. Это обусловлено их общим происхождением: инвертазы гомологичны между собой на 60-70% и их рекомбинационные сайты в обращенных повторах на концах инвертируемых сегментов также гомологичны. Завершая описание сайт-специфической рекомбинации отметим ее принципиальные отличия от гомологичной рекомбинации. В случае последней молекулы ДНК узнают друг друга путем прямого сопоставления их последовательностей через посредство рекомбиназ типа белка RecA. Для этого в ДНК вводятся специальные пресинаптические повреждения, высвобождающие одноцепочечные участки ДНК, что и лежит в основе узнавания гомологичных последовательностей. Напротив, при сайт-

специфической рекомбинации главную роль в синапсисе играет взаимное узнавание белков, связанных с рекомбинационными сайтами. Эти сайты совсем короткие, и гомология между ними непосредственно для синапсиса несущественна. Она важна для связывания со специфическими белками и для обмена цепями между сайтами.

Еще один вид сайт-специфической рекомбинации — перемещение мобильных генетических элементов.

В начале 1940-х годов американская исследовательница Барбара МакКлинток открыла существование гена или локуса, который вызывал повышенные частоты хромосомных перестроек у кукурузы. Среди потомков от скрещивания, в котором оба родителя несли такие перестройки, появлялись нестабильные мутации с неожиданно высокой частотой. В 1948 году она опубликовала результаты исследований этого локуса, вызывающего разрывы хромосом, сделав вывод, что он был совершенно необычным поскольку мог перемещаться из одного участка хромосомы в другой. Б. МакКлинток назвала феномен перемещения транспозицией.

Мобильные элементы бактерий

Эти элементы содержат только минимальное число генов, необходимых для мобилизации элемента и его инсерции в новый участок хромосомы, IS-элементы являются обычным компонентом бактериальных хромосом и плазмид. Три инсерционных элемента - *IS1*, *IS2*, и *IS10R* представлены в геноме *E. coli* в 0-30 копиях. Их размеры варьируют от 768 до 1329 п.н. Некоторое число копий этих элементов встречается в плазмидах. Они содержат ген транспозазы. На концах IS-элементов находятся инвертированные повторы IR, длина которых варьирует от 22 до 41 п.н. В участке встраивания IS-элементов в геномной ДНК образуется дупликация размером от 5 до 9 п.н..

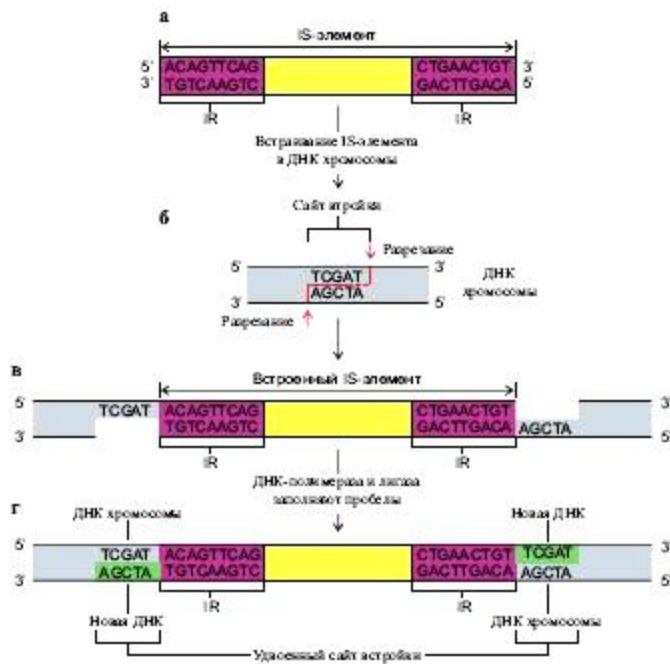


Рисунок 8: Схема строения и инсерции IS-элемента в хомосомную ДНК бактерии. а - IS-элемент с IR-повторами длиной 9 п.н. б - образование двуцепочечного надреза в ДНК бактерии. в - инсерция IS-элемента в участке надреза. г - достраивание фрагмента ДНК в участке надреза и дупликация фрагментов геномной ДНК

использованием энзимов репликационной машины клетки хозяина. Транспозиция происходит с использованием транспозазы, которая опознает IR последовательности, где и инициируется транспозиция. Мутации в IR фрагментах влияют на частоту транспозиции. Частота транспозиций варьирует между 10^{-5} и 10^{-7} на одно поколение.

Транспозонами (Tp-элементами) называют сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но содержащие, кроме того, гены, не имеющие непосредственного отношения к транспозиции. Транспозоны могут нести гены устойчивости к антибиотикам, гены токсинов или гены дополнительных ферментов клеточного метаболизма. У бактерий выделено два типа транспозонов, различающихся по типу транспозиции.

Поскольку IS-элементы встраиваются в любой участок ДНК, они часто вызывают мутации, разрушая либо кодирующие или регуляторные последовательности. Промоторы в самом IS-элементе могут влиять на экспрессию соседних генов. Из-за присутствия IS-элементов в хромосоме кроссинговер между ними может вызывать делеции и инверсии. В процессе встраивания IS-элементов происходит точное копирование уже встроенного элемента, затем старая копия остается на месте, а вновь синтезированная внедряется в новый сайт. Репликация новой копии происходит с

Нечетные транспозоны. Репликативная транспозиция (Tn3)

У транспозона Tn3 имеется два гена, необходимых для его перемещения,

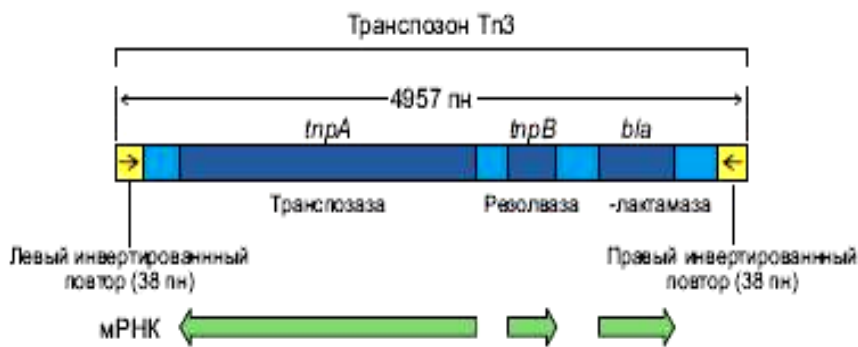
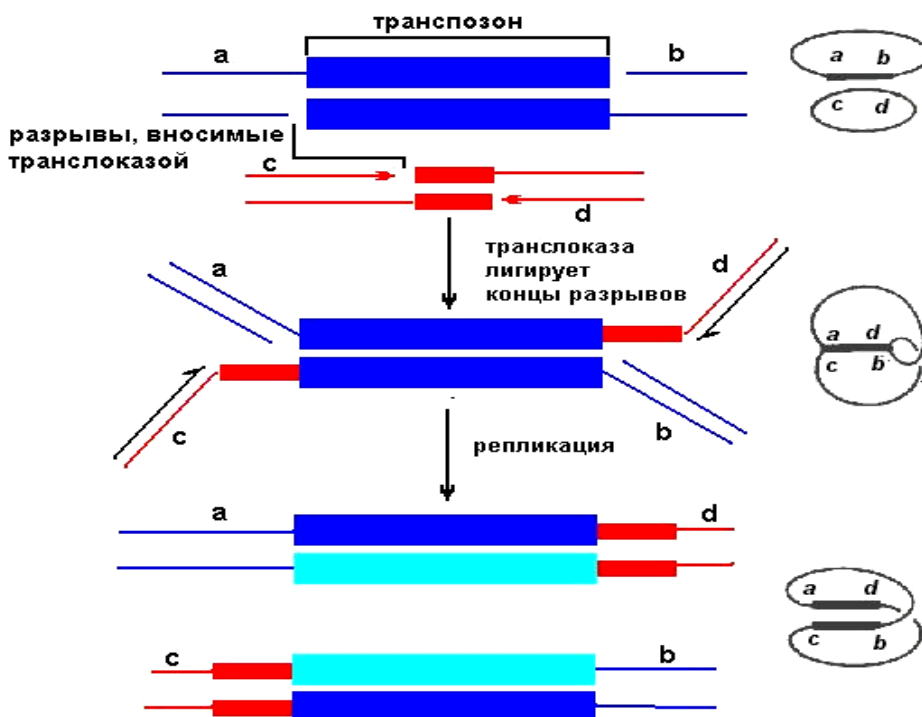


Рисунок 9: Структура несложного транспозона Tn3. Он имеет три гена в центральном районе: *bla* кодирует бэта-лактамазу (разрушает антибиотики, такие как пеницилин или ампициллин); *tnpA* кодирует транспозазу; *tnpB* кодирует резолвазу (вовлечена в процесс транспозиции). Короткие инвертированные повторы на концах не связаны с IS-элементами

tnpA и *tnpR* один из которых, *tnpA*, кодирует транспозазу со свойствами, похожими на свойства фермента фага Ми. Транспозаза образует одноцепочечные разрезы таким образом чтобы образовалось два активных 3'-конца. В результате действия

транспозазы Tn3 почти всегда образуются коинтеграта. Чтобы произошло разделение



коинтеграта на исходные репликоны (один из которых приобрел новую копию транспозона), необходимо действие продукта гена *tnpR*, называемого

Рисунок 10: Схема репликативной транспозиции

(*resolvase* от англ. *resolution* — разрешение). Оказалось, что этот фермент

резолвазой

проводит типичную реакцию сайт-специфической рекомбинации по специальным последовательностям ДНК, имеющимся в составе транспозона и называемым *res*. Резолваза осуществляет сайт-специфическую рекомбинацию лишь в том случае, если два *res*-сайта находятся на одной молекуле ДНК в прямой ориентации друг относительно друга, т. е. резолваза устроена как раз так, чтобы разрезать коинтеграта на исходные репликоны. Механизм действия резолвазы в общих чертах такой же, как и у других ферментов сайт-специфической рекомбинации, например Gin-белка фага Mu или Cge-белка фага P1.

Четные транспозоны. Консервативная транспозиция (Tn10)

Перемещение по крайней мере некоторых транспозонов и IS-элементов происходит путем их вырезания с места старой локализации с последующим

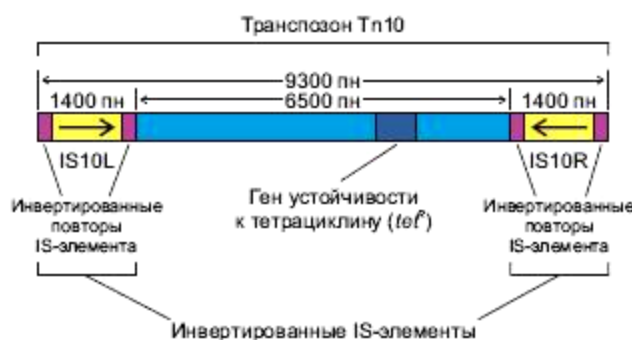


Рисунок 11: Структура сложного транспозона Tn 10: в геноме E. coli центральный район несущий ген или гены, такие как ген сопротивляемости к тетрациклину, фланкированные прямыми или инвертированными IS элементами. В свою очередь IS элементы имеют собственные терминальные инвертированные повторы

встраиванием в какое-нибудь другое место того же или нового репликона.

Такой механизм называется консервативным в отличие от полуконсервативной репликативной транспозиции. В принципе

консервативная транспозиция может

происходить при незначительной

модификации уже описанной схемы

репликативной транспозиции.

Действительно если после

образования промежуточной

структуры, в которой концы

транспозона объединены с концами

ДНК-мишени, вместо репликации произойдут разрывы еще двух цепей ДНК, связывающих транспозон со старым местом его локализации, то окажется, что транспозон со старого места вырезался и встроился в новое, а для завершения процесса потребуется лишь ограниченный репаративный синтез ДНК. В этом

случае на месте старой локализации транспозона остается двуцепочечный разрыв ДНК- В то же время известно, что перемещение бактериальных транспозонов, как правило, не сопровождается их исчезновением из старого участка локализации. Поэтому предполагают, что вырезание транспозона вызывает «самоубийство донора» — деградацию той конкретной молекулы ДНК, в которой произошло вырезание.

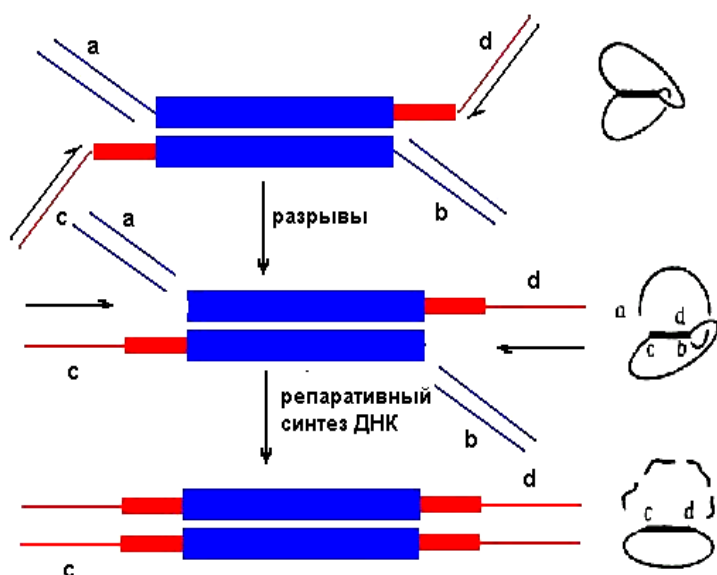


Рисунок 12: Схема консервативной транспозиции

заражает все новые молекулы ДНК. Однако и транспозиция по консервативному механизму приводит к тому же эффекту. Используя этот механизм мобильные элементы удивительным образом усовершенствовали его. Оказалось, что синтез транспозазы и активность концов мобильного элемента в реакции транспозиции зависят от состояния метилирования ДНК. Например, у IS 10, фланкирующего ген устойчивости к тетрациклину в транспозоне Tn10, в промоторе гена транспозазы и в одном из инвертированных концевых повторов имеются последовательности GATC, которые метилирует метилаза *E. coli dam*. Как уже отмечалось, сайты метилирования полностью метилированы до репликации ДНК, но после репликации они в течение некоторого времени полуметилированы. Именно это полуметилированное состояние существенно активирует и концы IS-элемента, и синтез транспозазы. В результате частота вырезания транспозона из полуметилированной ДНК на несколько порядков

ДНК, в которой произошло вырезание.

Нельзя не отметить, что механизм консервативной транспозиции на первый взгляд уступает полуконсервативному механизму репликативной транспозиции. Действительно, в последнем случае происходит не только перемещение мобильного элемента с места на место, но и его размножение, он как бы

выше, чем из ДНК, полностью метилированной. Другими словами, транспозон; «чувствует», прореплицировался он или нет. Способность вырезаться сразу после репликации снимает все «недостатки» механизма консервативного вырезания-встраивания. Во-первых, обеспечивается сохранение мобильного элемента на прежнем месте, так как элемент вырезается лишь из одной из двух молекул ДНК, образовавшихся после репликации. Наличие второй копии допускает, в принципе, рекомбинационную репарацию оставшегося после вырезания транспозона двуцепочечного разрыва, хотя не ясно, действительно ли она происходит или имеет место «самоубийство донора». Во-вторых, чувствительность к метилированию обеспечивает дополнительную регуляцию транспозиции: при передаче транспозона в новую бактериальную клетку в составе трансмиссивной или мобилизуемой плазмиды он сразу оказывается в полуметилированном состоянии (при конъюгации передается одна цепь ДНК, которая достраивается до дуплекса в реципиентной клетке), что повышает вероятность его перемещения в другие репликоны клетки-реципиента.

Мобильные элементы эукариот

Выделяют также два класса ретротранспозоны и транспозоны.

Ретротранспозоны сходны по структуре и поведению с ретровирусами (размножаются через РНК имеют обратную транскриптазу или используют клеточную). Элементы этого типа встречаются у дрозофилы (*copia-like*), у дрожжей (*Ty*), у грызунов (*IAP* и *VL30*), у человека (*THE*), у кукурузы (*BS1*).

Также к ним относятся SINE (short interspersed nuclear sequences) и LINE (long interspersed nuclear sequences). Элементы SINE - это фрагменты длиной 100-300 п.н., чередующиеся с уникальными последовательностями от 1000 до 2000 п.н. длиной. Элементы LINE имеют длину более 5 т.п.н., они чередуются с уникальными последовательностями до 35 т.п.н. длиной. Как SINE, так и LINE представлены семействами, состоящими из одинаковых элементов.

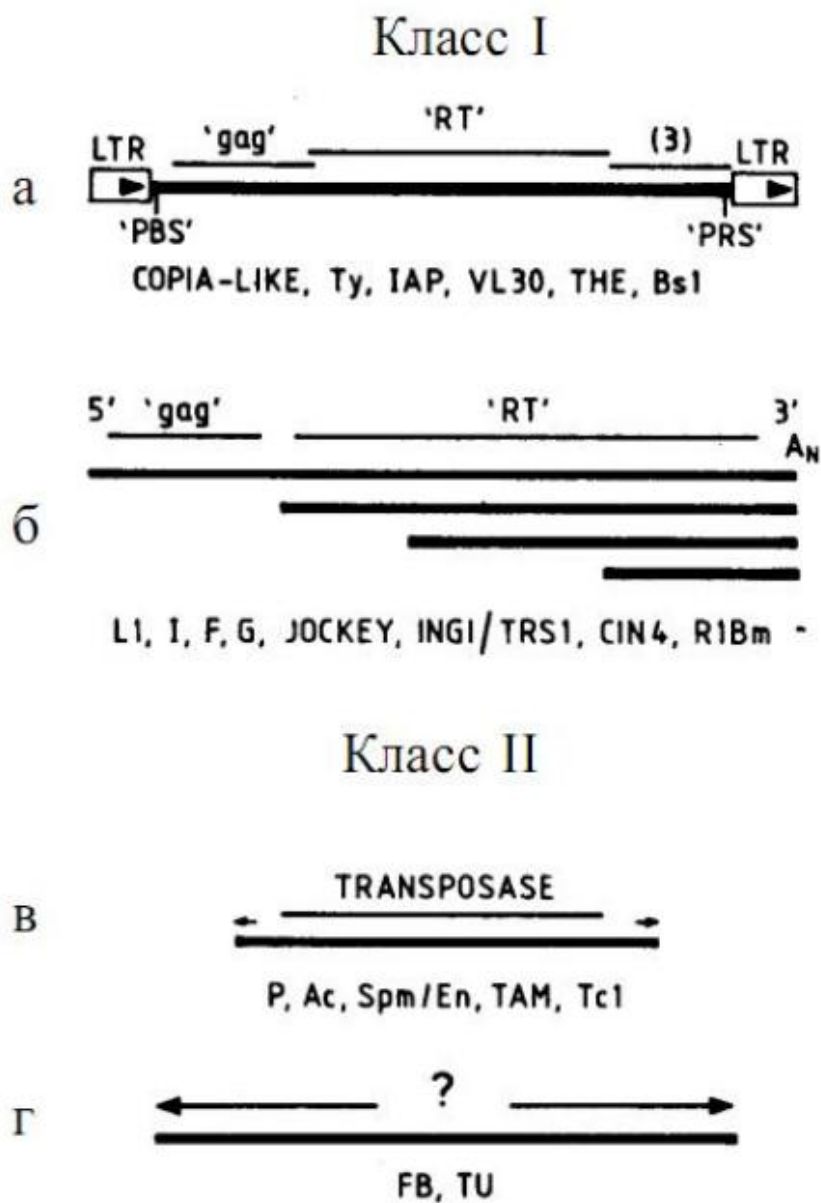


Рисунок 13: Структура мобильных элементов 4х различных типов у эукариот: а, б - мобильные элементы класса I, которые, как полагают, транспозируют через посредничество РНК; в, г - мобильные элементы, транспозирующие непосредственно через ДНК

В геноме человека SINE широко представлено семейством элементов Alu. Члены этого семейства имеют длину 300 п.н. и повторены от 300000 до 500000 раз в геноме. Около 3% генома человека приходится на долю этих повторов. Одно из семейств, принадлежащих LINE, это LINE-1 (или L1-элемент). Полагают, что в геноме человека присутствует от 50 до 100 тыс. копий L1-элемента, т.е. он представляет около 5% генома. Максимальная длина этих элементов составляет 6500 п.н., хотя таких элементов в геноме не более 3500. Остальные же копии по аналогии с Ds элементами кукурузы имеют внутренние делеции различной длины. Полноразмерные L1 элементы содержат большие открытые рамки считывания, имеющие гомологию с известными обратными транскриптазами. Транспозоны перемещаются по механизму консервативной транспозиции. Например *P* и *hobo* у дрозофилы,

В геноме человека SINE широко представлено семейством элементов Alu. Члены этого семейства имеют длину 300 п.н. и повторены от 300000 до 500000 раз в геноме. Около 3% генома человека приходится на долю этих повторов. Одно из семейств, принадлежащих LINE, это LINE-1 (или L1-элемент). Полагают, что в геноме человека присутствует от 50 до 100 тыс. копий L1-элемента, т.е. он представляет около 5% генома. Максимальная длина этих элементов составляет 6500 п.н., хотя таких элементов в геноме не более 3500. Остальные же копии по аналогии с Ds элементами кукурузы имеют внутренние делеции различной длины. Полноразмерные L1 элементы содержат большие открытые рамки считывания, имеющие гомологию с известными обратными транскриптазами. Транспозоны перемещаются по механизму консервативной транспозиции. Например *P* и *hobo* у дрозофилы,

Ac/Ds и *Spm/En* у кукурузы, *Tam* у *Antirrhinum majus* и *Tel* у нематоды *C. elegans* Ту дрожжей. Все они имеют короткие инвертированные повторы на концах. *P*, *Ac* и *Spm/E* кодируют по крайней мере одну функцию транспозазы, поскольку элементы с внутренними делениями могут перемещаться только в присутствии полных элементов.

Мобильные элементы часто получают названия, отражающие их способность к перемещению: Магеллан, "Бигль", *hobo* - бродяга, *gypsy* - цыган, *flea* - блоха, *burdock* - репейник, *jockey* -наездник и т.д. Они отличаются друг от друга по следующим характеристикам:

1. По размерам - средние размеры — 5, т.п.н., причем самый маленький -"элемент 1360" -1.176 т.п.н., самый большой - "17,6" - имеет размер 7,4 т.п.н.
2. По числу копий: от 1 до 120 копий на геном.
3. По наличию и размерам длинных концевых повторов (ДКП-LTR). Они могут иметь длину 270-840 п.н., быть прямыми или обратными.
4. По индукции дупликаций в сайте встраивания - 4-6 п.н.

Незаконная рекомбинация

Незаконная рекомбинация - это сборная группа процессов, где рекомбинация происходит без гомологии между молекулами ДНК, и при этом без участия механизмов сайт-специфической рекомбинации или транспозиций. В качестве примеров можно привести захват ретровирусом некоторых клеточных генов при его эксцизии из хромосомы хозяйской клетки, а также интеграцию фрагментов ДНК, вводимых в клетки позвоночных с помощью микроинъекций. Механизмы незаконной рекомбинации малоизучены. Общим для них является соединение концов негомологичных молекул ДНК.

Впервые механизм одной из реакций незаконной рекомбинации был описан японским исследователем Х. Икедой с сотрудниками в 1982 году. В опыте *in vitro* эти авторы продемонстрировали рекомбинацию между полностью негомологичными ДНК плазмиды pBR322 и фага лямбда, катализируемую высокоочищенной топоизомеразой II (ДНК-гиразой) *E. coli*.

Согласно модели, предложенной авторами, две молекулы гиразы, каждая из которых состоит из двух пар субъединиц, временно разрывают в обеих молекулах обе цепи ДНК, удерживая их концы. Затем они обмениваются парами субъединиц вместе с удерживаемыми концами разных ДНК-партнеров и сшивают концы дуплексов. Позднее Икеда показал такую рекомбинацию и *in vivo* в клетках *E. coli*. К настоящему времени накоплены данные об участии топоизомераз обоих типов в незаконной рекомбинации у бактерий и эукариот.

В последнее десятилетие у амфибий и млекопитающих обнаружены ферменты, связывающие двуцепочечные концы ДНК независимо от их гомологии. Природа этих белков до последнего времени оставалась неясной. Сенсационный прорыв в данной области возник в 1994-1995 годах в результате исследования мутантов грызунов, проявляющих повышенную по сравнению с нормальными особями чувствительность к ионизирующим излучениям. Известно, что ионизирующие излучения вызывают двуцепочечные разрывы ДНК, то есть разрывы хромосом, для заживления которых в нормальной клетке существуют специальные системы репарации. У мутантов они нарушены. Кроме того, у мутантов оказалась подавленной и интеграция в хромосомы фрагментов ДНК, искусственно введенных в клетки. Это неудивительно, поскольку у млекопитающих в основе процессов как интеграции чужеродной ДНК, так и репарации двуцепочечных разрывов лежит соединение концов разорванных двуцепочечных ДНК, обходящееся без гомологии, то есть оба процесса осуществляются по механизму незаконной рекомбинации (в отличие от дрожжей и бактерий, у которых они основаны на гомологичной рекомбинации). Неожиданным оказался тот факт, что мутанты проявили неспособность к рекомбинационным перестройкам в кодирующих иммуноглобулины последовательностях ДНК, а это означает, что незаконная рекомбинация играет важную роль и в этих перестройках. Таким образом, было выяснено, что в рекомбинации иммуноглобулиновых последовательностей ДНК задействованы два разных механизма. Ранние этапы - образование сайт-специфических двуцепочечных разрывов происходят по типу сайт-

специфической, а поздние - воссоединение концов разрывов - по механизму незаконной рекомбинации. Выявлен и фермент, ответственный за такую незаконную рекомбинацию: указанные выше радиочувствительные мутанты оказались дефектными по ДНК-зависимой протеинкиназе. Фермент активируется, связываясь со свободными концами ДНК независимо от их происхождения, и соединяет эти концы.

Нетрудно заметить, что незаконная рекомбинация, подобно сайт-специфической рекомбинации и транспозициям, может приводить к хромосомным перестройкам. В живой клетке разрывы хромосом, являющиеся одним из источников незаконной рекомбинации, могут спонтанно возникать в ходе репликации, транскрипции и репарации ДНК. Однако нельзя исключить возможность того, что произвольное комбинирование разорванных концов эукариотической хромосомы может ограничиваться структурной организацией хроматина, фиксирующей эти концы.

Рекомбинационные перестройки генов

Рассмотрены далеко не все примеры рекомбинационных систем, ведущих к перестройкам в генетическом материале. Их много, и их роль разнообразна. Как и в случае гомологичной рекомбинации, процессы, основанные на негомологичной рекомбинации, играют большую роль в эволюции, но их функции проявляются особенно значимо в онтогенезе как прокариотических, так и эукариотических организмов.

Сайт-специфическая рекомбинация играет ключевую роль в жизненных циклах умеренных бактериофагов. Умеренные фаги могут развиваться в клетках бактерий двумя способами: либо путем литического цикла, либо путем так называемой лизогенизации, то есть в качестве внутриклеточных паразитов, где репликация их генетического материала находится под контролем клетки. За это их и называют умеренными. Многие умеренные фаги, такие, как лямбда, не могут существовать в лизогенизированной клетке в автономном виде. Их ДНК обязательно должна интегрироваться в бактериальную хромосому и реплицироваться вместе с ней. А процесс интеграции невозможен без сайт-

специфической рекомбинации, как, впрочем, и обратный процесс вырезания ДНК фага из хромосомы при индукции литического цикла, что тоже случается в жизни умеренного фага. У некоторых умеренных фагов и некоторых бактерий сайт-специфическая рекомбинация участвует в регуляции работы генов (сайт-специфические инверсии и т.д.).

Биологическая роль транспозиций и лежащих в их основе подвижных генетических элементов огромна. Подвижные элементы достигли большого разнообразия и распространились среди представителей всех систематических групп живого мира. У некоторых организмов они составляют существенную часть генетического материала: у дрозофилы и человека на их долю приходится, по оценкам разных исследователей, 5-10% геномной ДНК. Зачем нужно столько "лишней" ДНК, пока непонятно. В качестве частичного объяснения можно предполагать, что избыточная ДНК является материалом для эволюции. Полностью биологическая роль подвижных элементов будет выяснена нескоро.

Кратко перечислим несколько примеров генетических эффектов, вызываемых подвижными элементами. Так они могут встраиваться в кодирующие рамки генов. Нетрудно представить, что это приводит к полной инактивации генов и возникновению мутаций. Кроме того, подвижные элементы могут интегрировать в межгенные участки генома и изменять активность расположенных рядом генов, так как сами элементы содержат в своем составе сильные промоторы. Подвижные элементы склонны вызывать в районе их локализации хромосомные перестройки, преимущественно делеции. Следует особо отметить осуществляемый ими перенос генов устойчивости к антибиотикам, лекарственным препаратам и ядам от одной бактерии к другой. Такой перенос называют горизонтальным в отличие от вертикальной передачи генов в ряду поколений клеток при их размножении. Горизонтальный перенос генов создает серьезные проблемы для эпидемиологов.

Изучение биологического значения незаконной рекомбинации находится в начальной стадии. Укажем на ее участие в захвате ретровирусами онкогенов

из хромосомы клетки организма хозяина, в воссоединении разорванных концов хромосом в клетках млекопитающих, в формировании генов иммуноглобулинов. В последнее время внимание исследователей все больше и больше привлекают так называемые запрограммированные рекомбинационные перестройки генетического материала, закономерно происходящие на определенных стадиях жизненного цикла многих организмов и, как правило, являющиеся одним из механизмов регуляции работы генов.

Долгое время считалось, что все перестройки генома эукариот связаны с изменениями ДНК. Но ДНК эукариот имеют сложный механизм упаковки и образует комплекс с белками называемый хроматином. Цитологи изучают хроматин достаточно давно и знают о существовании двух типов хроматина эухроматин и гетерохроматин. Эухроматин слабо конденсирован, плохо окрашивается, электронпрозрачен при электронной микроскопии и транскрипционно активен. Гетерохроматин сильно конденсирован, хорошо окрашивается, электронплотен при электронной микроскопии и транскрипционно неактивен. Эти данные привели к тому, что изучением хроматина занялись молекулярные биологи (еще один яркий пример перекрывания сфер интересов разных наук). Накопление собранных им данных привело к возникновению теории, что перестройки могут происходить на уровне хроматина, не затрагивая самой молекулы ДНК.

Перестройки хроматина

Процесс наведения изменений в структуре хроматина называют **ремоделированием хроматина**. В это понятие входит смещение гистонов, требующее энергзатрат. Чтобы высвободить гистоны из хроматина, необходимо разрушить множество контактов белков между собой и с ДНК, для прекращения этих контактов нужна энергия. Смещение нуклеосом осуществляется неким фактором, гидролизующим АТФ. Когда гис-тоновый октамер покидает ДНК, с ней могут связаться другие белки (в данном случае, факторы транскрипции и РНК-полимераза). Возможны схемы трех типов

ремоделирования, которые могут быть воспроизведены и охарактеризованы *in vitro*:



Рисунок 14: Комплексы ремоделирования могут заставить нуклеосомы «скользить» вдоль ДНК. Они также могут демонтировать отдельные нуклеосомы или корректировать размер межнуклеосомных интервалов (связующих сегментов ДНК)

смещение одного или нескольких октамеров с ДНК, с образованием пробела в нуклеосомной организации (то есть участка ДНК, свободного от нуклеосом).

Ремоделирование хроматина чаще всего применяется в промоторах генов, предназначенных для транскрипции. Оно, как правило, необходимо, чтобы аппарат транскрипции смог получить доступ к промотору. Ремоделирование хроматина может потребоваться и в других случаях, например при репарации поврежденной ДНК.

Самый распространенный вариант ремоделирования — это смещение с ДНК одного или нескольких гистоновых октамеров. Что такое событие произошло, можно заметить по изменению паттерна «лестницы» на электрофореграмме ДНК (той области, где она лишилась нуклеосомной «протекции») после расщепления хроматина микрококковой нуклеазой. В

Гистоновые октамеры могут скользить вдоль ДНК, со сдвигом нуклеиновой кислоты относительно массива белков. Это меняет расположение конкретных последовательностей ДНК на поверхности нуклеосом.

Просветы между гистоновыми октамерами могут меняться, опять же с тем результатом, что позиции конкретных последовательностей ДНК относительно белков становятся другими.

Самое экстенсивное ремоделирование — это полное

пробеле свободной ДНК, который при этом возникает посреди массива - нуклеосом, нередко можно обнаружить сайт, гиперчувствительный к ДНКазе I.

Иногда ремоделирование хроматина не столь «драматично» и заключается, например, в сдвиге ротационного позиционирования одной-единственной нуклеосомы. Это изменение можно засечь по «размыванию лестницы» с шагом в 10 оснований, обычно возникающей при обработке нуклеосомы ДНКазой I. Таким образом, спектр изменений структуры хроматина (в рамках ремоделирования) достаточно широк: от небольшого сдвига в расположении нуклеосом(ы) до полного исключения нуклеосом с участка ДНК.

Ремоделированием хроматина занимаются большие белковые комплексы, использующие гидролиз АТФ для обеспечения необходимой энергии. АТФазная субъединица — это, во всех смыслах, центральная часть такого комплекса. Комплексы ремоделирования хроматина классифицируют по типу АТФазной субъединицы: комплексы, у которых эти субъединицы похожи, относят к одному семейству. Обычно у таких «родственных» комплексов и некоторые другие субъединицы тоже общие. Существует два основных типа комплексов — это SWI/SNF и ISWI (что означает «имитация SWI»). В дрожжевых клетках присутствует две разновидности комплекса SWI/SNF и три разновидности комплекса ISWI. Комплексы обоих типов есть также у мух и у людей. Каждому типу комплексов присущ свой набор ремоделирующих активностей.

Комплекс **SWI/SNF** открыли первым. Его назвали «SWI/SNF», потому что многие из его субъединиц кодируются генами, которые у дрожжей *S. cerevisiae* прежде идентифицировались в качестве носителей мутаций SWI или SNF. Эти мутации плеiotропны и по набору вызываемых дефектов похожи на мутантов, у которых утрачен С-концевой домен (или «С-концевой хвост») РНК-полимеразы II. Кроме того, мутации в SWI и SNF генетически взаимодействуют (супрессируются) мутациями в генах, кодирующих компоненты хроматина, а именно *SIN1* (кодирует негистоновый белок) и *SIN2*

(кодирует гистон H3). Продукты генов *SWI* и *SNF* требуются для экспрессии генов во множестве локусов (всего, при их инактивации, страдает экспрессия - 120, или 2%, генов *S. cerevisiae*), где комплекс SWI/SNF востребован как участник ремоделирования хроматина на промоторе или в его окрестностях.

Комплекс SWI/SNF каталитически активен *in vitro*; в дрожжевой клетке насчитывается всего лишь 150 таких комплексов. Каждый из генов, кодирующих субъединицы SWI/SNF, сам по себе не принципиален для выживания клетки; что говорит о существовании других путей ремоделирования хроматина у дрожжей. Комплекс RSC (remodels the structure of chromatin; «ремоделирует структуру хроматина») представлен у тех же дрожжей обильнее, чем SWI/SNF. Комплекс RSC действует в 700 локусах-мишенях. Отсутствие в клетке любого из описанных комплексов летально.

Комплексы SWI/SNF способны ремоделировать хроматин *in vitro* либо без потери гистонов, либо смещая с ДНК гистоновые октамеры. В реакциях обоих типов изменение структуры октамера проходит через один и тот же промежуточный этап, который может вылиться либо в переоформление нуклеосомы на той же самой молекуле ДНК, либо в смещение гистонического октамера на другую молекулу ДНК. Комплекс SWI/SNF индуцирует изменения в контактах белок-ДНК, что сопровождается изменениями чувствительности к ДНКазе I. Эти изменения остаются в силе и после того, как комплекс покинет нуклеосому. Субъединица Swi2 — это АТФаза, снабжающая комплекс энергией.

Между ДНК и гистоновым октамером в любой нуклеосоме существует множество контактов. При анализе кристаллической структуры таких контактов обнаруживается четырнадцать. Чтобы октамер мог освободиться или передвинуться в другое положение, все эти контакты необходимо разорвать. Как же этого добиться? Некоторые очевидные механизмы следует исключить из рассмотрения, потому что мы знаем, что во время ремоделирования хроматина одноцепочечная ДНК не образуется, и никакой хеликазной активности с комплексами ремоделирования хроматина не ассоциировано.

Современная точка зрения состоит в том, что ремоделирующие комплексы семейств SWI/SNF и ISWI используют гидролиз АТФ для вращения ДНК на поверхности нуклеосомы. Есть косвенные свидетельства того, что это создает механическую силу, помогающую небольшому сегменту ДНК высвободиться с поверхности нуклеосомы и поменять свое положение.

Одна из важных реакций, проводимых комплексами ремоделирования, создает эффект скольжения нуклеосом. Было установлено, что комплексы семейства ISWI могут изменять позиционирование нуклеосом без отрыва гистоновых октамеров от ДНК: они движутся вдоль нее, благодаря чему реакцию назвали реакцией скольжения. Скольжение можно запретить, удалив у гистонов H4 их N-концевые «хвосты» (но функция «хвостов» в данном случае доподлинно не известна). Комплексы SWI/SNF тоже могут заставить нуклеосому поменять положение относительно последовательности ДНК; реакцию можно предотвратить внесением в ДНК барьера, что свидетельствует об истинном скольжении, при котором гистоновый октамер движется по ДНК более или менее равномерно, не теряя с ней контакта.

Одной из загадок в работе SWI/SNF являются размеры комплекса. В нем одиннадцать субъединиц, общей молекулярной массой 2×10^6 . РНК-полимераза и нуклеосомы откровенно мелки по сравнению со SWI/SNF, и трудно себе представить, каким образом множеству компонентов комплекса удастся взаимодействовать с ДНК, зафиксированной на поверхности нуклеосомы. Полностью активный комплекс транскрипции, названный «холоферментом РНК-полимеразы II», содержит саму полимеразу, все факторы TF_n (кроме TBP и Tf_nA), а также комплекс SWI/SNF, ассоциированный с C-концевым хвостом полимеразы. На практике, весь клеточный запас комплекса SWI/SNF можно экстрагировать в составе препаратов холофермента. Это, в частности, означает, что ремоделирование хроматина и узнавание промоторов транскрипции производятся единым белковым комплексом.

Включение комплексов ремоделирования в определенные участки хромосом

Как происходит нацеливание белковых комплексов ремоделирования хроматина на конкретные сайты? Сами комплексы не содержат субъединиц, специфичных к конкретным последовательностям ДНК. Наиболее вероятной является следующая модель: чтобы комплекс ремоделирования работал на промоторе, его рекрутируют (физически привлекают туда) другие белки — активаторы либо, что тоже бывает, репрессоры транскрипции.

Участие комплексов ремоделирования хроматина в активации генов было открыто через изучение факторов транскрипции, нуждающихся в этих комплексах, чтобы активировать свои гены-мишени. Одним из первых примеров был фактор GAGA, активирующий *in vitro* промотор *hsp10 D. melanogaster*. Связывание GAGA с четырьмя (СТ)₄-богатыми сайтами промотора видоизменяет нуклеосомную организацию, создает гиперчувствительный сайт и позиционирует нуклеосомы на смежных участках. Вмешательство в нуклеосомную организацию — это энергозависимый процесс, который был бы невозможен без участия ремоделирующего комплекса NURF. В результате деятельности NURF в последовательности ДНК возникает граница, задающая позиции нуклеосом на смежных участках. Тем временем фактор GAGA связывает ДНК по своим сайтам-мишеням; присутствие на ДНК фактора GAGA фиксирует хроматин в ремоделированном состоянии.

Взаимодействие комплексов ремоделирования с факторами транскрипции — это ключ к пониманию их *modus operandi*. У дрожжей фактор Swi5 активирует локус *HO*. Заметим, что Swi5 не входит в комплекс SWI/SNF. В конце митоза фактор Swi5 попадает в ядро и связывает там промотор *HO*. Затем Swi5 рекрутирует SWI/SNF и покидает промотор, оставив на нем SWI/SNF. Это означает, что фактор транскрипции может активировать промотор по принципу «ударь и беги», согласно которому фактор выполнил свою работу, как только комплекс ремоделирования хроматина связался с промотором.

Одним из первых регуляторных контуров, для которых было показано,

что в активацию гена вовлечено

изменение в нуклеосомной организации его промотора, была система *PHO*. С промотором *PH05* ассоциирован фактор типа bHLH (домен со свойствами основания, примыкающий к структуре «спираль-петля-спираль»), называемый

PHO4. Фактор *PHO4*, в ответ на нехватку фосфата, индуцирует устранение с промотора *PH05* четырех точно позиционированных нуклеосом. Этот эффект независим от транскрипции

(поскольку точно так же происходит у мутантов *TATA~*) и независим от репликации. В промоторе *PH05* есть два

сайта связывания *PHO4*. Один из них расположен между нуклеосомами и может быть связан изолированным ДНК-

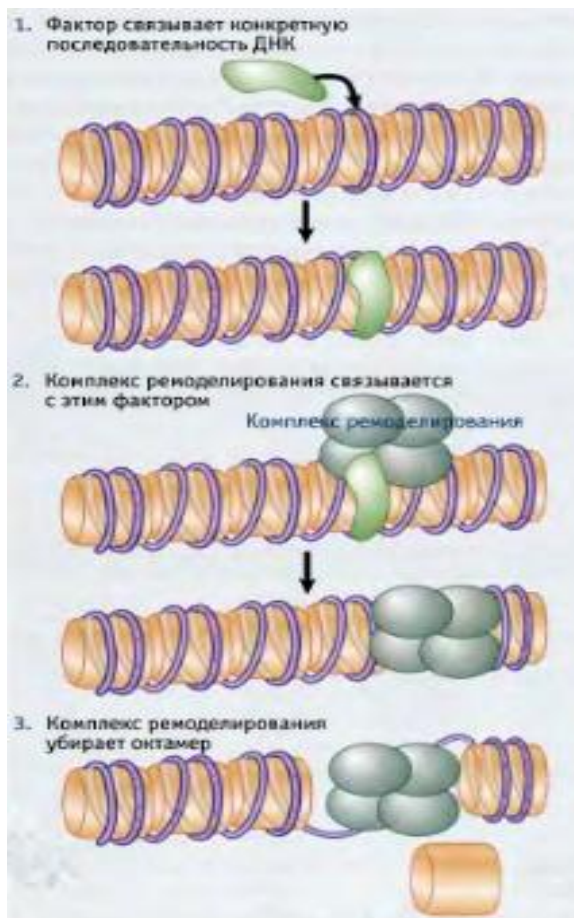


Рисунок 15: Комплекс ремоделирования связывается с хроматином через активатор (или через репрессор)

связывающим доменом *PHO4*. Другой сайт находится в нуклеосоме, где *PHO4* его не узнает. Расщепление этой нуклеосомы, дающее *PHO4* возможность связаться со вторым своим сайтом, необходимо для активации гена. Чтобы второе связывание произошло, требуется присутствие другого, активирующего транскрипцию, домена *PHO4*. Домен-активатор в белке *PHO4* можно заменить аналогичным доменом другого фактора транскрипции, VP16: развал нуклеосом пройдет с той же специфичностью. Это означает, что прицельный развал нуклеосомной организации на промоторе *PH05* обеспечивается белок-белковыми взаимодействиями, в которых участвует тот же домен фактора, который затем активирует транскрипцию: тоже через образование белок-белковых контактов, но уже не с комплексом ремоделирования хроматина, а с

собственно аппаратом транскрипции. Какой именно из комплексов ремоделирования занимается этим промотором, не известно.

Масштабное обследование дрожжевого генома на предмет расположения нуклеосом показало, что большинство сайтов связывания факторов транскрипции от нуклеосом свободно. Промоторы для РНК-полимеразы II, как правило, имеют участок -200 пн, свободный от нуклеосом и находящийся выше точки старта транскрипции. Этот участок фланкирован позиционированными нуклеосомами.

Инициация транскрипции не обязательно должна сопровождаться исключением нуклеосом. Некоторые активаторы могут связать ДНК на поверхности нуклеосомы. Элементы HRE (сокращение от английского "hormone response element") — это участки ДНК, присутствующие в промоторах некоторых генов: через них идет клеточный ответ на стимуляцию (стероидным) гормоном. В некоторых HRE нуклеосомы позиционированы со всей возможной точностью, так что рецепторы стероидных гормонов имеют гарантированный доступ к сайтам связывания. Связывание рецептора с ДНК может повлиять на ее взаимодействие с гистонами и даже повлечь за собой открывание новых сайтов связывания. Точное позиционирование нуклеосом в этом случае может требоваться либо для «презентации» ДНК в конкретной ротационной фазе, либо для белок-белковых взаимодействий между активаторами и гистонами (или другими компонентами хроматина). Таким образом, мы уже немного отошли от видения хроматина исключительно как репрессивной структуры и приблизились к рассмотрению хроматина как интерактивной сферы действия активаторов транскрипции.

Один из промоторов, нуждающихся в специфической нуклеосомной организации, — это промотор MMTV вируса. Нуклеотидная последовательность промотора MMTV содержит массив из шести частично палиндромных сайтов, каждый из которых связывается одним димером рецептора гормона (hormone receptor, HR). Все гормона HR и фактор NF1 не могут одновременно вместе эти сайты составляют элемент HRE. Кроме того, в

промоторе MMTV есть одиночный сайт связывания фактора NF1, а по соседству — два сайта для фактора OTF. Рецептор связаться со своими сайтами на свободной (безнуклеосомной) ДНК.

Будучи активирован гормоном, HR покрывает свои сайты, но не обеспечивает защиты промотора от микрококковой нуклеазы (сайты ДНК, чувствительные к этому ферменту, расположены по краям нуклеосомы). Это говорит о том, что HR связывается с ДНК на поверхности нуклеосомы. Однако до проведения стимуляции гормоном ротационное позиционирование ДНК на поверхности нуклеосомы позволяет доступ лишь к двум сайтам связывания HR. Чтобы димеры HR могли связать в HRE еще два сайта, требуется изменить ротационное позиционирование этой нуклеосомы. Изменение можно детектировать по появлению сайта, чувствительного к нуклеазам, ровно по центру нуклеосомы (как раз посередине элемента HRE). Фактор NF1 (footprint) на нуклеосоме только после стимуляции гормоном. По всей видимости, структурные изменения, обусловленные связыванием HR, способствуют связыванию NF1. Отчасти этот эффект может объясняться снятием стерического препятствия, если HR создает загромождение и препятствует связыванию NF1 со свободной ДНК, но не с ДНК в составе нуклеосомы.

Модификация гистонов — это ключевой фактор изменения структуры хроматина

Экспрессируется ген или нет, зависит от структуры хроматина и в области промотора, и в окружающем хромосомном домене. Структура хроматина может регулироваться как отдельными событиями активации, так и изменениями, затрагивающими обширную область хромосомы. Самые локальные события изменения структуры хроматина касаются лишь отдельно взятого гена-мишени, точнее, нуклеосомной организации его промотора и/или ближайших окрестностей промотора. В других случаях изменения могут затронуть более обширную область, вплоть до целой хромосомы.

Структурные изменения, охватывающие обширную область генома, контролируют потенциальную возможность экспрессии генов в этой области.

Термином **умолкание** (сайленсинг) пользуются, чтобы обозначить репрессию активности генов в некоторой локальной области хромосомы. Термин **«гетерохроматин»** используют для обозначения хромосомных областей, обширных настолько, что их можно наблюдать под микроскопом как формацию с особо компактной структурой. Оба типа изменений (умолкание или переход в гетерохроматин), по сути, одно и то же. Они обусловлены тем, что с хроматином связываются дополнительные белки и, прямо или косвенно, мешают факторам транскрипции и РНК-полимеразе активировать промоторы в данной области.

Иницируется или нет транскрипция конкретного гена, зависит от изменений (активирующих либо репрессирующих) состояния его промотора. Эти изменения зависят от взаимодействия гистонов с другими белками и с ДНК. Изменения в структуре хроматина иницируются модификацией N-концевых «хвостов» в молекулах гистонов, в особенности H3 и H4. «Хвосты» состоят из 15-30 аминокислот N-концевой области каждого из четырех гистонов сердцевины; у гистона H2A такой «хвост» есть также на C-конце. «Хвосты» H2B и H3 пропущены между сверхспиральными витками нуклеосомной ДНК. Показано, как эти «хвосты» могут быть модифицированы по нескольким сайтам посредством метилирования, ацетилирования или фосфорилирования. Другие модификации, такие как убиквитинилирование или пришивания полипептида *sumo*, тоже возможны, но не так хорошо изучены.

Ацетилирование и метилирование идут по свободной (ϵ) аминогруппе лизина. Ацетилирование нейтрализует положительный заряд, присутствующий на радикале лизина в NH_3^+ -группе. Метилироваться кроме лизина может аргинин. Фосфорилирование гистонов происходит по гидроксильной группе серина или треонина; добавление фосфатной группы приносит отрицательный заряд. Лизин может быть моно-, ди- или триметилирован (во всех трех случаях положительный заряд на радикале лизина сохраняется; аргинин может быть моно- или диметилирован (симметрично или асимметрично)).

Перечисленные модификации гистонов носят временный характер. Они могут изменить заряд молекулы белка и, следовательно, создают потенциал изменения свойств нуклеосомных октамеров. Модификация гистонов ассоциирована со структурными изменениями, происходящими в хроматине при репликации или транскрипции. Фосфорилирование разных гистонов по специфическим положениям необходимо для осуществления конкретных процессов. Например, положение ^{10}Ser в гистоне H3 фосфорилируется при конденсации хромосом во время митоза.

В синхронизированных по клеточному циклу клетках культуры и предсуществующие, и новосинтезированные гистоны сердцевин в S-фазе, по всей видимости, ацетилированы и метилированы. Далее по ходу клеточного цикла гистоны теряют эти ацетильные и метильные группы. Совпадение модификации гистонов во времени с репликацией говорит о том, что ацетилирование и метилирование гистонов могут иметь отношение к сборке нуклеосом. Было сделано предположение, что уменьшение положительных зарядов на гистонах может снижать их сродство к ДНК, способствуя более тщательному контролю сборки нуклеосом. Однако это предположение оказалось не очень состоятельно ввиду того, что нуклеосомы могут быть смонтированы (во всяком случае, *in vitro*) из не-модифицированных гистонов. Ацетилирование гистонов принципиально важно для сборки нуклеосом у дрожжей и, вероятнее всего, требуется для некоторых белок-белковых взаимодействий, происходящих на поздних стадиях сборки.

Фосфорилирование и дефосфорилирование гистона H1 происходят в режиме, отличном от модификационного цикла других гистонов. В культивируемых клетках млекопитающих, в S-фазе, в H1 вносится по одной или по две фосфатных группы на молекулу. Позднее, при митозе, происходит более интенсивное фосфорилирование: число фосфатов в молекуле H1 доводится до шести. Под конец клеточного деления происходит удаление из H1 всех фосфатных групп. Фосфорилирование H1 катализирует киназа M-фазы, играющая в клеточном цикле роль принципиального переключателя на митоз.

На самом деле, этот фермент часто исследуют на предмет его H1-киназной активности. О фосфатазах, удаляющих фосфаты с H1 в конце митоза, известно немного.

Момент добавления к гистону H1 большинства его фосфатов породил догадки о будто бы причастности фосфорилирования H1 к митотической конденсации хромосом. Для одноклеточного простейшего *Tetrahymena* эти догадки не получили подтверждения, поскольку делеция гена *H1* нарушает общие свойства хроматина лишь незначительно. В частности, способность хроматина конденсироваться при митозе если и страдает от отсутствия H1, то довольно слабо. В целом при делеции *H1* некоторые гены активируются, другие же оказываются репрессированными, что говорит о разнообразных локальных изменениях структуры хроматина. Мутации, элиминирующие в H1 сайты фосфорилирования, фенотипа не имеют, зато мутации, имитирующие фосфорилирование, по своему фенотипу похожи на делецию *H1*. Это говорит о том, что фосфорилирование H1 нейтрализует влияние этого гистона на локальную структуру хроматина.

Искажают ли модификации гистонов непосредственно структуру нуклеосом, или эффект скорее косвенный и адресован более высоким уровням организации хроматина? Данных, которые указывали бы на разницу в свойствах нуклеосом, обусловленную именно модификацией гистонов, существует немного. Между тем, описано уже несколько случаев, когда благодаря модификации у гистонов возникают сайты связывания с негистоновыми белками, что меняет свойства хроматина.

Выборка нуклеосом, в которых гистоны подлежат модификации, может варьировать. Модификация гистонов может быть локальным событием, ограничивающимся, например, нуклеосомами одного промотора, и может носить характер глобального мероприятия в масштабах, например, целой хромосомы. Общая закономерность, в соответствии с которой ацетилирование гистонов ассоциировано с активным хроматином, метилирование гистонов ассоциировано с неактивным хроматином. Это, однако, не такое простое

правило; важны конкретные сайты, которые модифицированы (точно так же, как комбинации сайт-специфичных модификаций), и, конечно же, из общей закономерности есть исключения. Так, гистоны, метилированные по конкретному положению, обнаруживаются в активном хроматине. Мутации в одном из дрожжевых гистонацетилазных комплексов, против ожидания, препятствуют сайленсингу некоторых генов, что подчеркивает отсутствие единства среди эффектов ацетилирования.

Специфичность модификаций усугубляется тем, что многие из ферментов, катализирующих модификации, имеют свои индивидуальные сайты-мишени на конкретных гистонах. В таблице перечислены эффекты некоторых модификаций. Большинство модифицированных сайтов не подлежат альтернативным модификациям. В некоторых случаях модификация одного сайта может активировать или ингибировать модификацию другого сайта. Комбинации модификаций-сигналов, которые, согласно одной из концепций, могут использоваться в клетке для обозначения типов хроматина, иногда называют *гистоновым кодом*.

Ацетилирование гистонов

Все гистоны нуклеосомной сердцевины могут быть ацетилированы. Главные мишени для ацетилирования — это лизины в N-концевых «хвостах» гистонов H3 и H4. Ацетилирование происходит при двух разных стечениях обстоятельств: во время репликации ДНК или когда гены активируются.

Когда в S-фазе клеточного цикла геномная ДНК реплицируется, гистоны временно ацетилированы. Ацетилирование происходит до включения гистонов в нуклеосомы. Известно, что гистоны H3 и H4 к тому времени, когда они ассоциируют и образуют тетрамер H3₂-H4₂, уже ацетилированы. Тетрамер включается в состав нуклеосомы и вскоре после этого теряет свои ацетильные группы.

О важности ацетилирования гистонов при репликации говорит тот факт, что если одновременно предотвратить ацетилирование H3 и H4, то дрожжевые

клетки теряют жизнеспособность. В качестве субстратов для ацетилирования H3 и H4 дублируют друг друга, поскольку дрожжи отлично обходятся возможностью ацетилировать во время S-фазы, хотя бы один из этих гистонов. Ацетилированию отводят две возможных роли: возможно, оно требуется для узнавания гистонов факторами сборки нуклеосом, либо оно необходимо для самого процесса сборки и/или придания нуклеосомам особенной структуры.

Факторы, про которые известно, что они участвуют в сборке хроматина (нуклеосом), не отличают ацетили-рованные гистоны от неацетилированных и используют их без разбора. Следовательно, скорее всего, наличие ацетильной группы требуется для взаимодействий на последующих этапах сборки. Долгое время считалось, что ацетилирование необходимо для контроля белок-белковых взаимодействий, возникающих по мере того, как гистоны включаются в состав нуклеосом. В пользу именно этой роли говорит поведение гистонацетилазы SAS у дрожжей. Комплекс SAS связывает комплексы сборки хроматина в репликативной вилке, где он ацетирует ¹⁶Lys гистона H4. Возможно, работа комплекса SAS — это часть клеточной «программы» по учреждению паттернов ацетилирования гистонов после репликации.

Вне репликации и S-фазы, статус ацетилирования гистонов хроматина в целом коррелирует со статусом экспрессии генов, которые в нем содержатся. В хромосомном домене, содержащем активные гены, частота ацетилирования гистонов повышена; в то же время хроматин, ацетилированный по гистонам, более чувствителен к ДНКазе I, а зачастую и к микрококковой нуклеазе. Мишенью для ацетилирования служат «хвосты» гистонов в нуклеосомах. Этим отчасти объясняется, почему активный хроматин более чувствителен к нуклеазам: во многом из-за ацетилированного состояния нуклеосом в области промотора и его окрестностей, когда ген активирован.

Кроме событий, носящих локальный характер и относящихся к отдельным промоторам, изменения статуса ацетилирования бывают широкомасштабными. Это особенно характерно для половых хромосом и является частью механизма, посредством которого происходит коррекция

избыточной активности генов, вызванной присутствием двух X-хромосом в клетках особей одного пола, по сравнению с единственной X-хромосомой, в комплекте с Y-хромосомой, в клетках особей другого пола. В неактивной X-хромосоме самок млекопитающих у гистона H4 степень ацетилирования понижена. Напротив, в «суперактивной» X-хромосоме у самцов *Drosophila* степень ацетилирования гистона H4 повышена. Это говорит о том, что присутствие ацетильных групп на гистонах нуклеосом может служить предпосылкой более рыхлой (менее конденсированной), «активной», структуры. У самцов *Drosophila* X-хромосома ацетилирована прицельно по ^{16}Lys гистона H4. За это отвечает гистонацетилаза (гистонацетилтрансфераза) MOF; подход к хромосоме MOF совершает в составе большого белкового комплекса. Этот комплекс отвечает за внесение в X-хромосому общих изменений, придающих ее генетическому материалу способность экспрессироваться с повышенной интенсивностью. Массированное ацетилирование гистона H4 — это лишь одна из активностей этого комплекса.

Ацетилирование гистонов обратимо. Каждое из направлений реакции катализируется особым ферментом. Ферменты, способные ацетилировать гистоны, называют гистонацетилазами, или (более правильно) **гистонацетилтрансферазами**. Удалить у гистона ацетильную группу могут другие ферменты, **гистондеацетилазы**. Гистонацетилтрансферазы можно подразделить на две группы. Ферменты группы А действуют на гистоны, уже вошедшие в состав хроматина, и участвуют в контроле транскрипции. Ферменты группы В работают с новосинтезированными гистонами в цитоплазме и имеют отношение к сборке нуклеосом.

Для изучения обратимого ацетилирования гистонов оказались весьма полезными два вещества: трихостатин и масляная кислота. Эти вещества ингибируют гистондеацетилазы; с присутствием любого из них связано накопление в клетке ацетилированных нуклеосом. В экспериментах, где использовались эти ингибиторы, с успехом прошел проверку общий тезис о взаимосвязи ацетилирования гистонов с экспрессией генов. На самом деле,

способность масляной кислоты вызывать в хроматине изменения, подобные тем, какие бывают при активации генов, как раз и послужили первыми указаниями на взаимосвязь ацетилирования с активностью генов.

Большой прорыв в понимании смысла ацетилирования гистонов был связан с идентификацией ацетилирующих и деацетилирующих ферментов, а также с выявлением взаимоотношений этих ферментов с другими белками-участниками событий активации и репрессии, обладающими специфичностью к конкретным генам. Коренное изменение в видении смысла ацетилирования гистонов было вызвано открытием, что гистонацетилазы — это не специальные ферменты, постоянно ассоциированные с хроматином. Как выяснилось, гистонацетилтрансферазная активность свойственна многим известным активаторам транскрипции.

Зацепка появилась, когда каталитическая субъединица гистонацетилтрансферазы группы А была идентифицирована как гомолог регуляторного белка Gcn5 дрожжей. Последующие эксперименты показали, что гистонацетилтрансферазной активностью обладает сам Gcn5, с гистонами H3 и H4 в качестве субстратов. Белок Gcn5 является частью комплекса-адаптора, необходимого для взаимодействия некоторых энхансеров с промоторами их генов-мишеней. В частности, для активации гена-мишени необходима присущая комплексу-адаптору активность гистонацетилтрансферазы.

С учетом этих новых знаний можно обновить всю картину работы активаторов транскрипции. РНК-полимераза связана с гиперчувствительным сайтом, а коактиваторы ацетируют гистоны окрестных нуклеосом. Конкретных примеров такого рода на сегодняшний день известно довольно много.

Нить расследования функции Gcn5 приводит к одному из самых важных гистонацетилазных комплексов. У дрожжей Gcn5 является частью 1,8 МДа белкового комплекса. Этот Spt-Ada-Gcn5 ацетилтрансферазный комплекс, сокращенно SAGA, содержит несколько белков, участвующих в транскрипции, в том числе несколько факторов TAF₁₁. Гистонацетилтрансферазой также

является субъединица фактора TF₁₁D дрожжей, TAF₁₁145. (Вместе с гомологом, TAF₁₁250 млекопитающих, они известны под именем TAF1.) Функции TF₁₁D и SAGA отчасти перекрываются; примечательно, что дрожжи вполне способны обходиться без Gen 5 либо TF₁₁D, но страдают от делеции обоих. Это говорит о том, что для нормальной экспрессии генов гистонацетилазная активность значит очень много, и обеспечить ее в достаточном объеме готов в одиночку любой из комплексов, SAGA или TF_nD. Как можно было ожидать, судя по размерам комплекса SAGA, ацетилирование гистонов — только одна из его функций, хотя другие роли комплекса SAGA в активации генов изучены не так хорошо.

Одним из первых активаторов транскрипции, охарактеризованных в качестве гистонацетилаз, был p300/CBP (где CBP - это сокращение от CREB-bind-ing protein). Вообще-то, p300 и CBP — это разные белки, но они так похожи, что их часто объединяют. p300/CBP работает коактиватором, то есть наводит связь между активатором и аппаратом транскрипции. В этом качестве p300/CBP работает с различными активаторами, в числе которых рецепторы гормонов, AP-1 (с-Jun и с-Fos), MyoD. Коактивация может быть ингибирована регуляторными белками вирусного происхождения, E1A аденовируса или Т-антигеном SV40, которые связываются с p300/CBP и препятствуют его взаимодействию с факторами транскрипции; в этом, собственно, и заключается механизм подавления клеточной транскрипции указанными вирусами. Ингибирование функции p300/CBP — важная составляющая вклада этих вирусов в доведение клетки до опухолеродного состояния. p300/CBP ацетилюет N-концевые «хвосты» молекул гистона H4 в составе нуклеосом. Другой коактиватор, PCAF, предпочитает ацетилировать в нуклеосомах молекулы H3. p300/CBP и PCAF образуют комплекс, задействованный в активации транскрипции. Другая гистонацетилаза — коактиватор ACTR, работающий с рецепторами гормонов и не только сам ацетилюющий гистоны H3 и H4, но также привлекающий p300/CBP и PCAF к вступлению в коактивирующий комплекс. Одновременное присутствие множества

гистонацетилазных активностей в составе коактивирующего комплекса можно объяснить различиями в их специфичности к субстрату и потребность во множестве разных событий ацетилирования, для того, чтобы «разбудить» экспрессию.

Гистонацетилтрансферазы группы А, что характерно, функционируют в составе больших белковых комплексов. Существует упрощенная модель «поведения» такого комплекса. Доставка ацетилтрансферазных комплексов по месту назначения на ДНК может координироваться посредством взаимодействия комплексов с ДНК-связывающими факторами: они диктуют гистонацетилтрансферазе выбор мишени. В комплексе есть и субъединицы-эффекторы; их задача — вмешательство в структуру хроматина или непосредственно в транскрипцию. Похоже, что эффекторы (по крайней мере, некоторые из них) нуждаются в том, чтобы в поле их деятельности гистоны были ацетилированы. Соответственно, огромную роль в регуляции экспрессии генов играет деацетилирование гистонов, катализируемое гистондеацетилазами.

Ацетилирование гистонов имеет место как при репликации (на короткий промежуток времени), так и при транскрипции (в этом случае оно поддерживается вплоть до завершения геном своей активности). Игрет ли ацетилирование в каждом из этих случаев одну и ту же роль? Одна из возможностей состоит в том, что эффект ацетилирования гистонов, универсальный и однотипный, выражается через структуру нуклеосом. Ацетилирование может работать как «разрыхлитель» нуклеосомной сердцевины. Соответственно, при репликации ацетилированные гистоны могут быть с большей легкостью вмонтированы в новые формирующиеся сердцевинки, а при транскрипции эффект того же рода может быть применен с результатом вплоть до смещения гистонового октамера с ДНК. Даже если смещения не предполагается, ацетилирование гистонов может подготавливать сайты ДНК к связыванию белков, необходимые для транскрипции. В каждом случае эффект ацетилирования обращается вспять деацетилированием.

Эффект ацетилирования — количественный или качественный? В одних ситуациях, для срабатывания некоторого эффекта некоторой совокупности гистонов необходимо набрать некоторое заданное число ацетильных групп, и какие именно позиции займут эти ацетильные группы, по большому счету, не существенно. В ситуациях противоположного типа, каждое конкретное событие ацетилирования имеет эксклюзивную значимость. Существование комплексов с множественной гистонацетилтрансферазной активностью можно интерпретировать с учетом ситуаций обоих типов: если ферменты имеют разную специфичность, то для того, чтобы ацетилировать гистоны по достаточному числу положений и достаточно быстро, нужно использовать все доступные активности; или же активность каждого отдельно взятого фермента имеет для транскрипции свой особый смысл. Похоже, что при репликации уместна, скорее, количественная модель (по крайней мере, для гистона H4) ацетилирование по любым двум позициям (из трех доступных) функционально адекватно (то есть придает молекуле H4 годность к инкорпорации в нуклеосому). В другом клеточном контексте, когда изменения структуры хроматина сопутствуют изменению статуса экспрессии области генома, и ацетилирование гистонов призвано оказать влияние на транскрипцию, очень важно, по каким именно положениям в молекулах гистонов идет это ацетилирование.

У дрожжей мутации по *SIN3* и *RPD3* ведут себя так, как будто продукты этих локусов репрессируют множество генов. В действительности, их белки вступают в комплекс с ДНК-связывающим белком Ume6, который, в свою очередь, связывается с элементом *URS1*. Комплекс репрессирует транскрипцию на промоторах, содержащих *URS1*, как это показано «умеет» деацетилировать гистоны; насчет Sin3 пока не понятно: то ли он должен лишь доставлять Rpd3 на промотор, то ли он играет в репрессии какую-то дополнительную роль.

Похожая система для репрессии транскрипции была обнаружена в клетках млекопитающих. К семейству регуляторов транскрипции ЫНШ относятся белки-активаторы, функционирующие в форме гетеродимеров.

Типичный представитель семейства — MyoD. К тому же семейству bHLH относятся и некоторые репрессоры, в частности, гетеродимер Mac/Max, (где Mad — это любой представитель группы близкородственных белков Mad). Гетеродимер Mad/Max связывается с конкретными сайтами ДНК и взаимодействует с гомологом Sin3 (который у мыши называется mSin3, а у человека hSin3). Белок mSin3 входит в состав комплекса-репрессора, компонентами которого также являются гистонсвязывающие белки и гистондеацетилазы, HDAC1 и HDAC2. Активность деацетилаз необходима для репрессии. Функциональная самостоятельность (модульность) этой системы подчеркивается другими вариантами ее использования: корепрессор SMRT, помогающий рецепторам ретиноидных гормонов репрессировать некоторые гены-мишени, выполняет свою функцию, связываясь с mSin3, который, в свою очередь, рекрутирует HDAC с их гистондеацетилаз-ными активностями. Другим способом привлечь HDAC к работе на конкретном сайте может быть контакт с MeCP2, белком, который связывается с метилированными цитозинами.

Отсутствие ацетилирования по гистонам является также отличительной чертой гетерохроматина. Это верно и для конститутивного гетерохроматина (к которому, как правило, относятся области центромер и теломер), и для факультативного гетерохроматина (то есть областей, специфически инактивированных в одной клетке, но способных при этом быть активными в какой-нибудь другой клетке). Как правило, в областях гетерохроматина N-концевые «хвосты» гистонов H3 и H4 не ацетилированы.

Связь метилирования ДНК и гистонов

В хроматине, где метилированы и гистоны, и ДНК, гены, как правило, не экспрессируются. Метилирование гистонов происходит по конкретным аминокислотным положениям: в частности, по двум лизинам в «хвосте» H3 и аргинину в «хвосте» H4.

Метилирование ^9Lys в гистоне H3 является отличительной чертой конденсированных областей хроматина (в частности, гетерохроматина, в общей массе) и менее крупных областях, про которые тоже известно, что они не экспрессируются. Фермент гистонметил-трансферазу, мишенью которому служит ^9Lys , называют SUV39H1. Активный центр этого фермента содержит область, известную как SET-домен. Другим гистонметилтрансферазам мишенью служит аргинин. Вдобавок, метилирование может идти по ^{79}Lys в глобулярной сердцевине молекулы H3; эта реакция может быть необходима для формирования гетерохроматина теломер.

До недавних пор считалось, что метилирование гистонов необратимо. На сегодня, однако, было идентифицировано уже несколько гистондеметилаз; в их числе — лизин-специфичная деметилаза LSD1, действующая на ^4Lys гистона H3, а также фермент, который деметилирует аргинин в гистонах H3 и H4. Как регулируется деметилирование, пока неясно.

Что касается ДНК, большинство сайтов метилирования в ней — это CpG-островки. В гетерохроматине последовательности CpG, как правило, метилированы. Наоборот, CpG-островкам, находящимся в активных промоторах, свойственно не быть метилированными.

Процессы метилирования ДНК и метилирования гистонов взаимодействуют по типу положительной обратной связи. Метилирование гистона H3 служит сигналом, привлекающим ДНК-метиلاзу в хроматин. Порядок событий таков, что сначала ^9Lys подвергается деацетиливанию и тем самым превращается в субстрат для метилирования. Затем H3 переводится в состояние Me^9Lys или Me_2^9Lys , обеспечивая ДНК-метилазе сайт для связывания. Некоторые гистонметилтрансферазы имеют потенциальные сайты для связывания метилированного дублета CpG: возможно, метилированная ДНК производит свой усиливающий эффект (в рамках контура положительной обратной связи с метилированием гистонов) за счет того, что обеспечивает субстрат гистонметилтрансферазам. Таким образом, метилирование одного

субстрата (ДНК или гистонов) срабатывает на запуск метилирования другого. Это взаимодействие на уровне процессов — очень распространенное, поскольку имеются доказательства его существования в клетках грибов, растений и животных — для регуляции транскрипции на промоторах, используемых РНК-полимеразами I и II, а также для поддержания гетерохроматина в его инертном состоянии.

Переходы между состояниями хроматина происходят через модификацию его компонентов

Просуммированы три типа различий, обнаруживаемых между активным и неактивным хроматином:

- Активный хроматин ацетилирован по «хвостам» гистонов H3 и H4.
- Неактивный хроматин метилирован по ^9Lys гистона H3.
- Неактивный хроматин метилирован по цитозинам дублетов CpG.

Обратный ход событий можно пронаблюдать, сравнив процессы активации промотора и возникновения гетерохроматина. Действия ферментов, модифицирующих хроматин в каждом из этих случаев, вселяют уверенность в том, что события активации и события инактивации строго альтернативны. Так, метилирование гистона H3 по ^9Lys и его же ацетилирование по ^{14}Lys не могут идти одновременно.

Ацетилазы и деацетилазы могут запускать иницирующие события. Деацетилирование позволяет произойти метилированию, что вызывает образование гетерохроматического комплекса. Ацетилирование гистонов помечает область хроматина как активную.

Кроме того, комплексы ремоделирования хроматина и комплексы модификации гистонов могут взаимодействовать между собой напрямую. Привлечение к промотору ремоделирующего комплекса SWI/SNF может привести к приходу на этот промотор ацетилазного комплекса SAGA. Последующее ацетилирование гистонов может стабилизировать ассоциацию промотора с комплексом SWI/SNF, создавая взаимно-подкрепляющие

отношения между действиями компонентов белкового аппарата инициации транскрипции.

Иницирующим событием выступает связывание компонента, специфичного по отношению к нуклеотидной последовательности сайта ДНК (и способного разыскать свою мишень в контексте хроматина). Он рекрутирует комплекс ремоделирования; в нуклеосомной организации промотора происходят изменения. Эти изменения позволяют связаться ацетилирующему комплексу, и уже ацетилированность гистонов-мишеней в дальнейшем служит ковалентной маркировкой активированного локуса.

Также в промоторе происходит модификация ДНК. Метилированность цитозинов в дублетах CpG означает отсутствие экспрессии. Основания для опознания участка ДНК в качестве мишени для метилирования известны лишь приблизительно.

Понятно, что ремоделирование хроматина в области промотора требует разнообразных модификаций нуклеосом, в том числе ацетилирования гистонов; а какие изменения должны произойти в самом гене, чтобы РНК-полимераза смогла его прочесть? Известно, что РНК-полимераза может транскрибировать ДНК *in vitro* со скоростью, сопоставимой с реальными измерениями скорости транскрипции *in vivo* (25 нуклеотидов в секунду), только на матрице свободной (не организованной в виде нуклеосом) ДНК. Несколько белков отличаются своей способностью увеличивать скорость прочтения ДНК РНК-полимеразой. Их общей особенностью является то, что естественным местом их работы является хроматин. Модель работы этих белков, принятая на сегодня, заключается в том, что они вступают в контакт с РНК-полимеразой и переносятся вместе с ней вдоль матрицы, попутно внося изменения в нуклеосомную организацию гена через воздействие на гистоны. Среди катализирующих белков есть и гистонаце-тилазы. По одной из версий, первая РНК-полимераза, прочитывающая ген, выступает в роли первопроходца, неся с собой факторы, меняющие структуру единицы транскрипции, чтобы следующим полимеразам пройти было уже легче.

Фосфорилирование гистонов

Фосфорилирование гистонов имеет место при одном из двух обстоятельств: в ходе клеточного цикла, или в связи с ремоделированием хроматина.

Давно известно, что гистон H1 фосфорилируется при митозе; однако сравнительно недавно было открыто, что H1 чрезвычайно хорош как субстрат для киназы Cdc2, осуществляющей контроль над клеточным делением. Это открытие спровоцировало тезис о том, что фосфорилирование H1 может быть взаимосвязано с конденсацией хроматина. Однако прямых доказательств того, что Cdc2 фосфорилирует H1 *in vivo*, получено не было, так что неясно, играет оно какую-нибудь роль в делении клетки, или нет.

Утрата киназы, фосфорилирующей гистон H3 по ^{10}Ser , губительна для структуры хроматина.

Нарушение структуры хроматина в этом случае вызвано, скорее всего, невозможностью фосфорилировать гистон H3 (хотя, конечно же, у JLL-1 могут быть и другие мишени). Это указывает на необходимость фосфорилирования H3 для придания хроматину более расправленной структуры, свойственной областям эухроматина. Экспериментальное подтверждение тому, что JLL-1 действует непосредственно на хроматин, состоит в том, что эта киназа ассоциирована с белковым комплексом, который связывается с X-хромосомой, чтобы интенсифицировать экспрессию ее генов у самцов *Drosophila*.

Впечатление о роли фосфорилирования гистонов, таким образом, довольно противоречивое. Если фосфорилирование гистонов — важная составляющая клеточного цикла, то, скорее всего, оно функционирует как сигнал к конденсации. Но в том, что касается ремоделирования хроматина, эффект фосфорилирования как раз противоположный. Возможно, конечно, что эффекты фосфорилирования разных гистонов или даже разных аминокислотных остатков одного гистона могут быть различными вплоть до полной противоположности.

Эпигенетика

Под **эпигенетическим** наследованием подразумевается способность различных состояний генетического материала (имеющих разные фенотипические отображения) быть переданными по наследству без каких-либо изменений в последовательности ДНК. Это означает, что две особи с одной и той же последовательностью ДНК в локусе, от которого исходит этот эффект, могут иметь разные фенотипы. Основная причина феномена заключается в наличии в данном локусе самоподдерживающейся структуры, функционально не зависящей от последовательности ДНК. Способностью закреплять эпигенетические эффекты самим своим существованием обладают следующие типы структур:

- Ковалентная модификация ДНК (метилированное основание).
- Белковая структура, собранная на ДНК.
- Белковый агрегат, контролирующий конформацию новых субъединиц по мере их синтеза.

В каждом из перечисленных случаев эпигенетическое состояние является следствием особенностей функционирования гена (чаще всего, его инактивации), обусловленных данной структурой.

В случае с метилированием ДНК, последовательность, модифицированная таким образом, может не поддаваться транскрипции, в то время как неметилированная последовательность будет экспрессирована. Один из аллелей имеет последовательность, метилированную по обеим цепям ДНК, в то время как идентичная последовательность другого аллеля не метилирована. Репликация метилированного аллеля порождает наполовину метилированные дочерние дуплексы, которые доводятся до полностью метилированного состояния конститутивно-активным ферментом метилазой. Репликация другого аллеля тоже сохраняет статус его метилирования (то есть отсутствие метальных групп). Если статус метилирования влияет на возможность транскрипции, то два аллеля отличаются по статусу экспрессии, несмотря на их идентичные нуклеотидные последовательности.

Самоподдерживающиеся белковые структуры, проходящие сборку на ДНК, обычно производят репрессирующий эффект тем, что запускают формирование гетерохроматина, внутри которого гены не экспрессируются. Сохранение областей гетерохроматина зависит от способности определенных белков такой области сохранять свое в ней присутствие и после репликации, а затем вовлекать в свой комплекс в качестве подкрепления еще больше белковых субъединиц. Если при репликации отдельные субъединицы распределяются по дочерним дуплексам случайным образом, то каждый дочерний дуплекс будет по-прежнему помечен белком, хотя плотность его расположения на ДНК будет в два раза ниже, чем до репликации. Показано, что существование эпигенетических эффектов заставляет предполагать у белков, обуславливающих такую ситуацию, способность к самосборке, благодаря которой из материала субъединиц может восстановиться интактный комплекс.

За эпигенетический эффект может отвечать не присутствие белка как такового, но его модификация. Так, в конститутивном гетерохроматине «хвосты» гистонов H3 и H4 обычно не ацетилированы. Если взять центромерный гетерохроматин и подвергнуть ацетилированию, то молчание в нем гены могут стать активными. Эффект может быть «пронесен» сквозь митоз или мейоз, что характеризует его как эпигенетический, возникший в результате изменения статуса ацетилирования гистонов.

Независимые белковые агрегаты — **прионы** — обуславливают эпигенетические эффекты тем, что, связывая белок, препятствуют выполнению его нормальной функции. Такой белковый агрегат, с момента, как он сформировался, заставляет новосинтезированные белковые субъединицы примыкать к себе, приняв неактивную конформацию.

Распределение гетерохроматина

В интерфазных ядрах кроме эухроматина есть и гетерохроматин, который по степени своей конденсированности близок к митотическим хромосомам. Гетерохроматин инертен. В продолжение интерфазы он остается конденсированным, и транскрипция в нем полностью подавлена.

Гетерохроматн реплицируется в поздней S-фазе и может локализоваться на периферии ядра. Центромерный гетерохроматин организуется, в типичном случае, на последовательностях сателлитной ДНК; в то же время сказать, что формирование гетерохроматина строго продиктовано последовательностью ДНК, нельзя. Если какой-нибудь активный ген расположить по-соседству с гетерохроматином (либо за счет хромосомной транслокации, либо путем трансфекции и интеграции), этот ген в своем новом положении может стать неактивным, что свидетельствует о его переходе в состояние гетерохроматина.

Подобная инактивация носит эпигенетический характер. Она может составлять предмет различий между индивидуальными клетками в организме животного, что приводит к феномену мозаичности, обусловленной **эффектом положения** (position effect variegation, PEV); суть эффекта состоит в том, что клетки, идентичные генетически, обладают, тем не менее, разными фенотипами. У *Drosophila* этот феномен описан довольно подробно. Показана муха, в глазу которой наблюдается как раз такая мозаичность. Некоторые участки глаза бесцветные, другие — красные. Различие обусловлено тем, что в одних клетках ген *white* из-за близости к гетерохроматину оказался инактивированным, в других же — остался активным. Эффект инактивации, исходя от гетерохроматина, распространяется по смежным областям. Область такого распространения мозаична: в некоторых клетках оно заходит достаточно далеко для того, чтобы инактивировать близлежащий ген (например, *white*), в других клетках до этого не доходит. Причем случается это на определенном этапе эмбрионального развития, и с этого момента состояние близлежащего гена (активное или неактивное) является уже свойством клеточной линии, поскольку наследуется дочерними клетками при каждом последующем делении. Клетки, ведущие свое происхождение от клетки-предка с инактивированным геном, образуют вкрапления с фенотипом потери функции в массиве ткани с нормальным фенотипом. Так, инактивация гена *white* выражается в отсутствии пигмента, в результате чего в глазу мухи появляются бесцветные вкрапления.

Чем ближе к гетерохроматину расположен ген, тем больше вероятность его инактивации. Формирование гетерохроматина может идти в два приема: сначала, на специально предназначенной для этого последовательности ДНК, происходит нуклеация гетерохроматина, а затем неактивная структура хроматина распространяется вдоль хроматинового волокна. Область распространения точно не задана; размах экспансии может определяться стахийно, под влиянием таких параметров, как лимитирующие количества белковых компонентов. Одним из факторов, которые могут влиять на процесс растекания, является статус активности промоторов данной области; активный промотор может приостановить растекание.

Эффект **теломерного замолкания (сайленсинга)** у дрожжей имеет аналогичную природу. Гены, транс-лоцированные в окрестности теломеры, проявляют случайную потерю активности; эффект обусловлен растеканием неактивного состояния хроматина, распространяющимся от теломер.

У дрожжей существует и другая форма сайленсинга. Тип спаривания дрожжевой клетки, как известно, определяется активностью локуса *MAT*, однако в клеточном геноме содержится еще два экземпляра последовательностей (кассет), способных диктовать тип спаривания. Они находятся в локусах *HML* и *HMR* и удерживаются клеткой в неактивной форме. Молчащие локусы *HML* и *HMR* имеют ряд свойств, общих с гетерохроматином, так что их можно расценивать как миниатюрные области гетерохроматина

Образование гетерохроматина

Инактивация хроматина происходит за счет добавления белков к волокну, состоящему из нуклеосом. Инактивация может быть следствием множества разных событий, в том числе, конденсации хроматина (которая делает его недоступным для аппарата экспрессии генов), а также появления белков, напрямую блокирующих доступ к регуляторным сайтам или ингибирующих транскрипцию

Две системы инактивации хроматина довольно хорошо изучены на молекулярном уровне: одна, с участием белка HP1, у млекопитающих; другая, с

участием комплекса SIR, у дрожжей. Хотя между компонентами этих двух систем нет детального сходства, общий принцип реакций у них один и тот же: в качестве точек контакта с хроматином выступают N-концевые «хвосты» нуклеосомных гистонов.

Белок HP1 (heterochromatin protein 1) — это один из самых важных белков Su(var). У *Drosophila* его сначала идентифицировали как белок, локализованный в гетерохроматине: это выяснилось при окрашивании политенных хромосом антителами к нему. Впоследствии оказалось, что этот белок — продукт гена *Su(var)2-5*. Его гомолог у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* кодируется геном *swi6*. Белок, исходно обозначенный как HP1, теперь называют HP1a, потому что с тех пор было идентифицировано еще два родственных белка, HP1.

У HP1 есть хромодомен, расположенный недалеко от N-конца; другой похожий домен (chromo-shadow domain, что можно перевести с английского как «теневой хромодомен») соответствует C-концевой области полипептида. Важность хромодомена HP1 доказывается тем, что множество функционально значимых мутаций сконцентрировано именно в нем.

Мутация в деацетилазе, действующей на ацетил-¹⁴Lys гистона H3, препятствует метилированию H3 по ⁹Lys. Гистон H3, метилированный по ⁹Lys, связывает HP1 по хромодомену. Основываясь на этих фактах, можно построить модель инициации формирования гетерохроматина. Сначала приходит деацетилаза и убирает ацетильную группу с ¹⁴Lys; затем наступает очередь метилазы SUV39H1: действуя на «хвост» H3, она создает метилированный сигнал, с которым свяжется HP1. Взаимодействие HP1 с «хвостом» H3 происходит, соответственно, между хромодоменом и метилированным лизином. Это взаимодействие работает как переключатель на формирование гетерохроматина. Неактивная область хроматина может быть расширена благодаря притоку новых молекул HP1, способных взаимодействовать друг с другом.

У дрожжей любой сайленсинг опирается на один и тот же набор генетических локусов, что говорит о наличии общего механизма. Мутации по любому локусу из этого набора не только приводят к активированному состоянию *HML* и *HMR*, но и облегчают инактивацию генов, интегрированных поблизости от теломерного гетерохроматина. Следовательно, продукты этих локусов работают на поддержание неактивного состояния разных типов гетерохроматина.

Лишь один из них, Rap1, проявляет специфичность к определенной последовательности ДНК. Rap1 связывает ДНК по повторам в теломерах, а также по элементам-сайленсерам, действующим в *cis*-манере и необходимым для репрессии *HML* и *HMR*. С Rap1 взаимодействуют белки Sir3 и Sir4, взаимодействующие также между собой (и, возможно, функционирующие как гетеромультимер). Комплекс Sir3/Sir4 взаимодействует с N-концевыми «хвостами» гистонов H3 и H4. На самом деле, первым индикатором того, что гистоны могут принимать непосредственное участие в формировании гетерохроматина, послужило открытие, что мутации, приводящие к отмене сайленсинга по *HML* и *HMR*, приходятся на гены, кодирующие гистоны H3 и H4.

Роль Rap1 в формировании гетерохроматина, в буквальном смысле, ключевая: он узнает последовательности ДНК, с которых стартует весь процесс. Rap1 рекрутирует Sir3/Sir4, и они напрямую взаимодействуют с гистонами H3 и H4. Как только Sir3/Sir4 связались с гистонами H3 и H4, может быть запущена полимеризация этого комплекса (так называемого «комплекса сайленсинга») с эффектом распространения по хроматиновому волокну. Область, охваченная комплексом сайленсинга инактивируется: либо из-за ингибирующего действия обкладки из Sir3/Sir4, либо из-за того, что их связывание с гистонами H3/H4 индуцирует какие-то дополнительные структурные изменения. Чем лимитировано растекание комплекса, не известно. Своей C-концевой областью Sir3 напоминает ламины (белки ядерного

матрикса) и может отвечать за привязывание гетерохроматина к периферии ядра.

Похожая серия событий оформляет молчащие участки в *HML* и *HMR*. В запуске формирования комплекса участвуют три белка, специфично связывающих определенные последовательности ДНК. Это Rap1, фактор транскрипции Abf1 и ORC (origin replication complex; «комплекс репликации ориджина»). С одним из этих белков, совершивших свою посадку на ДНК, связывается Sir1, который рекрутирует Sir2, Sir3 и Sir4 для формирования репрессивной структуры (комплекса сайленсинга). Sir2 работает как гистондеацетилаза; реакция деацетилирования необходима для поддержания связи между комплексом SIR и хроматином.

Как (по какому механизму) комплексы сайленсинга подавляют активность хроматина? Например, такой комплекс мог бы конденсировать хроматин, чтобы регуляторные белки не находили в нем своих мишеней. Для простоты предположим, что присутствие комплекса сайленсинга несовместимо с присутствием факторов транскрипции и РНК-полимеразы. Природа несовместимости может быть в том, что комплекс сайленсинга препятствует связыванию факторов транскрипции, прямо (закрывая собой ДНК) или косвенно (например, блокируя ремоделирование хроматина). Однако ситуация может быть и не такой простой, поскольку и факторы транскрипции, и РНК-полимераза на промоторах в молчащем хроматине все же присутствуют. Их присутствие может означать, что комплекс сайленсинга препятствует, скорее, работе факторов, чем их связыванию как таковому. На самом деле, между активаторами генов и репрессирующими эффектами в хроматине вполне может существовать конкуренция, в рамках которой активация промотора ингибирует растекание комплекса сайленсинга по хроматиновому волокну.

Формирование гетерохроматина у дрожжей *S. pombe* обусловлено комплексом сайленсинга, в котором, помимо белков, содержится несколько молекул РНК. Эти молекулы РНК являются продуктами транскрипции центромерных повторов, нарезанными на более мелкие фрагменты. Комплекс

также содержит белки, гомологичные тем, что участвуют в формировании гетерохроматина у других организмов: например, белок Argonaute, который участвует в доставке ремоделирующего комплекса RISC (РНК-induced silencing complex; «комплекс для РНК-индуцированного сайленсинга») к его мишеням в хроматине. Компоненты РНКi в составе комплекса отвечают за его локализацию в центромерах. Связавшись там с хроматином, комплекс способствует двойному метилированию (диметилированию) гистона H3 ферментом гистонметилтрансферазой.

В центромерном хроматине формируется еще одна специализированная структура. Ключом к ее природе у *Saccharomyces cerevisiae* служит фенотип мутантов по *cse4* с дефектами в структуре центромер. Белок Cse4 похож на гистон H3. Еще один родственный им белок (с гомологичной аминокислотной последовательностью), белок CENP-A (centromeric protein A; «центромерный белок А»), есть у млекопитающих. Генетические взаимодействия между мутациями в *cse4* и *CDE-II*, а также между мутациями в *cse4* и гене гистона H4, заставляют предполагать, что на основе комплекса Cse4-H4 может сформироваться гистоновый октамер, к которому затем прикрепляются центромерные комплексы CBF1 и CBF3, чтобы образовать центромеру.

Образовавшись, центромера может принять участие в формировании гетерохроматина своей области. В клетках человека, белок CENP-B, специфично локализованный в центромере, выступает инициатором модификаций гистона H3: деацетилирования по ^9Lys и ^{14}Lys , с последующим метилированием по ^9Lys . Эти модификации запускают ассоциацию H3 со Swi6, что ведет к формированию гетерохроматина.

Репрессоры и активаторы: белки-антагонисты Polycomb и Trithorax

Итак, хроматин может находиться в состоянии специфической репрессии; хорошим тому примером служит гетерохроматин. Другой пример был открыт в связи с поведением гомеозисных генов у *Drosophila*; их изучение привело к идентификации белкового комплекса, способного поддерживать определенные

гены в репрессированном состоянии. Оказалось, что мутантам *Pc* свойственны трансформации клеточных типов, также присущие фенотипам мутаций с обретением функции в генах *Antennapedia (Antp)* или *Ultrabithorax*, вследствие того, что у мутантов по *Pc* эти гены экспрессируются в тканях, где обычно они репрессированы. Поэтому *Pc* была приписана роль в регуляции транскрипции. Ген *Pc* и в самом деле оказался прототипом целого класса генов, расположенных в -15 локусах. Класс был назван *Pc-group (Pc-G)*; мутации в этих генах имеют, в общем, один и тот же результат: дерепрессию гомеозисных генов, что говорит о наличии у всех генов класса *Pc-G* общей регуляторной функции.

Белки *Pc-G* функционируют в составе обширных комплексов. Один из таких комплексов, *PRC1 (Polycomb-repressive complex)* содержит сам *Pc*, несколько других белков *Pc-G*, а также пять факторов транскрипции общего назначения. Другой комплекс, *Esc-E(z)*, содержит *Esc*, *E(z)*, другие белки *Pc(G)*, гистонсвязывающий белок, а также гистонде-ацетилазу. Белок *Pc* имеет хромодомен, который связывается с метилированным гистоном H3, а белок *E(z)* является метилтрансферазой, действующей на H3. Такое сочетание отдельных функций поддерживает прямую взаимосвязь между ремоделированием хроматина и его репрессией. Первоначально представление о такой взаимосвязи возникло на основании исследования мутаций в другом гене *Drosophila: brahma* (гомолог дрожжевого *Sivi2* кодирующем компонент ремоделирующего комплекса *SWI/SNF*). Потеря его функции супрессирует мутации в *Polycomb*.

Плейотропность мутаций по *Pc* (многообразие фенотипических эффектов) свидетельствует о том, что *Pc* является ядерным белком. Его можно встретить в 80 сайтах политенных хромосом (в числе этих сайтов находится и ген *Antp*). На тех же полосах политенных хромосом, что и *Pc*, можно встретить еще один белок, продукт другого гена из класса *Pc-G, polyhomeotic*. Оба белка можно осадить при помощи антител, специфичных к одному из них, по методике иммунопреципитации. Они пребывают в составе единого белкового

комплекса, очень массивного ($-2,5 \times 10^6$ Да), включающего другие белки (всего от 10 до 15 полипептидов). Соответствие между этими белками и продуктами ~30 генов *Pc-G* еще предстоит установить (или убедиться в его отсутствии). Возможно, что продукты некоторых генов *Pc-G* формируют основу репрессивного комплекса, после чего к ним присоединяются некоторые другие белки, придающие всему комплексу специфичность.

В обычном понимании, белки *Pc-G* не являются репрессорами: первоначальный паттерн экспрессии генов-мишеней задается не ими. В отсутствие белков *Pc-G*, если некоторые гены сначала репрессированы (в соответствии с позицией, которую клетка занимает в теле зародыша), то позднее по ходу развития организма репрессия сходит на нет. Это говорит о том, что белки *Pc-G* каким-то образом опознают хроматин в установившемся состоянии репрессии, и затем оказывают действие, направленное на поддержание этого состояния (вопреки грядущей череде клеточных циклов, с их репликациями и делениями) во всех клетках-потомках. Белки *Pc-G* связывают хроматин совместно с репрессором, но продолжают там оставаться, когда репрессора уже нет. Эта мера необходима, чтобы поддерживать реессию, и если белков *Pc-G* на месте не оказалось, то ген, в конце концов, будет активирован.

Участок ДНК, достаточный для того, чтобы ответ на наличие продуктов генов *Pc-G* состоялся, называют PRE (*Polycomb response element*). Этот участок определяется экспериментально, методом подбора, по способности поддерживать реессию поблизости от себя, во все продолжение периода развития организма. Стандартный подход заключается во внедрении PRE поблизости от ре-портерного гена, находящегося под контролем энхансера, который в раннем развитии репрессируется: после этого наблюдают за экспрессией гена-репортера у клеточного потомства; если PRE эффективен, экспрессии не будет.

Элемент PRE, длиной -10 тпн, укомплектован сложной белковой структурой. Белков, обладающих сродством к сайтам ДНК в пределах PRE,

было обнаружено два, но могут быть и другие. Если какой-нибудь локус стал объектом репрессии со стороны Pc-G, репрессирующий комплекс оккупирует область ДНК значительно превосходящую PRE. Так, белок Pc можно встретить на протяжении нескольких тпн с каждой стороны от PRE. Это говорит о том, что PRE может служить организатором нуклеации в хроматине структурного состояния, определяемого белками Pc-G, и, соответственно, центром, из которого идет распространение этого состояния. Такую модель подкрепляют наблюдения за эффектами, подобным мо-заичности, обусловленной эффектом положения: ген, расположенный близко к локусу, репрессия которого поддерживается Pc-G, может стать наследуемо инактивированным в некоторых, но не во всех, клетках. Эксперименты с внесением искусственных сшивок *in vivo* показали, что белок Pc распределен по обширным неактивным областям генного комплекса *Bithorax*, но при этом исключен из участков, содержащих активные гены. Гипотеза о кооперативных взаимодействиях белковых молекул внутри мультимерного комплекса подтверждается существованием в Pc мутаций, которые не только меняют распределение белка Pc в ядре, но также лишают продукты других генов класса *Pc-G* способности локализоваться в ядре. То, что роль белков Pc-G состоит именно в поддержании, но не инициации, репрессии, должно означать, что формирование комплекса в PRE зависит также от локального статуса экспрессии генов.

На сегодняшний день, связывание белков Pc-G в PRE описывается рабочей моделью, основанной на свойствах индивидуальных белков. Согласно этой модели, белки Pho и Phol связываются в PRE со своими последовательностями-мишенями, после чего комплекс Pho/Phol рекрутирует Esc-E(z), который, при помощи своей метилтрансферазной активности, метилирует ²⁷Lys гисто-на H3. Это создает сайт связывания для PRC1, поскольку хромодомен Pc связывается с метилированным лизином.

Комплекс PRC1 переводит хроматин в более компактную структуру; каждая единица такого комплекса затрудняет доступ факторов к примерно трем нуклеосомам.

Хромодомен, на самом деле, был первоначально идентифицирован как участок гомологии между Pc и другим белком, компонентом гетерохроматина HP1. Связывание хромодомена Pc с ^{27}Lys гистона H3 аналогично тому, как HP1 использует свой хромодомен, чтобы связаться с ^9Lys . Мозаичность возникает из-за варибельного распространения инактивации от конститутивного гетерохроматина, поэтому весьма вероятно, что хромодомены HP1 и Pc используются сходным образом, чтобы индуцировать формирование гетерохроматина или другой неактивной структуры. Таким образом, модель подразумевает существование схожих механизмов для репрессии индивидуальных локусов и для образования гетерохроматина.

Белки группы Trithorax (продукты генов *trxG*) создают эффект, противоположный эффекту белков Pc-G: они поддерживают гены в активном состоянии. В механизме действия белков обеих групп может существовать некоторое сходство, поскольку мутации по ряду локусов мешают функционировать как белкам Pc-G, так и белкам *trxG*; это означает, что белки обеих групп, в своей функции, могут опираться на партнерство одних и тех же компонентов хроматина. Фактор GAGA, кодируемый геном *trithorax-like*, имеет сайт связывания в PRE. Оказалось, что сайты, по которым Pc и GAGA связывают ДНК, совпадают.

Вероятно, фактор GAGA нужен для того, чтобы активирующие факторы, в том числе белки *trxG*, могли связаться с ДНК. Нужен ли он также белкам Pc-G, чтобы связаться с ДНК и оказать репрессирующее действие, пока не ясно, но такая модель потребовала бы участия, кроме GAGA, дополнительного фактора, определяющего, какой тип комплекса (нацеленного на поддержание активного либо репрессированного состояния хроматина) будет собран на этом месте.

Преобразования X-хромосомы

Существование полов (собственно, то обстоятельство, что пол животного задается различиями по половым хромосомам) ставит перед системами регуляции экспрессии генов довольно интересную и весьма насущную

проблему. Она заключается в отличии по числу X-хромосом. Если гены, сцепленные с X-хромосомой (то есть расположенные на X-хромосоме), будут экспрессироваться с равными интенсивностями у особей обоих полов, то в клетках тела самки количество продуктов таких генов окажется вдвое больше, чем у самцов. О том, как важно избежать такой ситуации, говорит само наличие явления **компенсации доз** генов и многообразие его механизмов среди разных групп животных. Суть явления состоит в выравнивании интенсивности экспрессии генов, расположенных на X-хромосоме, между полами.

- У млекопитающих одна из двух X-хромосом в клетках самки инактивируется полностью. В результате у самок активна только одна X-хромосома, что эквивалентно ситуации у самцов. Гены активной X-хромосомы самок и единственной X-хромосомы самцов экспрессируются с равной интенсивностью.

- Экспрессия генов единственной X-хромосомы самцов *Drosophila* вдвое превосходит по интенсивности экспрессию генов на каждой из X-хромосом самок.

- Экспрессия генов на каждой из X-хромосом самки *Caenorhabditis elegans* вдвое слабее, чем экспрессия тех же генов на одиночной X-хромосоме самца. Все перечисленные механизмы компенсации доз генов объединяет то, что *мишенью для регуляции служит хромосома в целом*. То есть имеет место глобальное изменение, затрагивающее все промоторы на хромосоме, причем в количественной манере. Как это происходит, более или менее внятно описано для случая инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих, когда материал целой хромосомы переходит в состояние гетерохроматина.

Двумя неотъемлемыми свойствами гетерохроматина являются его конденсированность и неактивность. Гетерохроматин, как известно, можно подразделить на два типа:

Конститутивный гетерохроматин содержит последовательности ДНК, не несущих кодирующей функции. Их типичный компонент — сателлитные

ДНК, которые часто обнаруживаются в центромерах. Такие участки непременно и всегда гетерохроматические в силу своей особой природы.

Факультативный гетерохроматин может быть формой существования целых хромосом, которые в какой-нибудь из клеточных линий не активны, зато в клетках другой линии их гены прекрасно экспрессируются. Типичный пример — X-хромосома млекопитающих. Неактивная X-хромосома гетерохроматична, в то время как активная X-хромосома является частью эухроматина. Таким образом, *идентичные последовательности ДНК оказываются в двух противоположных состояниях хроматина*. Как только неактивное состояние установилось, оно начинает наследоваться клеточным потомством. Это пример эпигенетической наследственности, поскольку наследование идет вне зависимости от последовательности ДНК.

Основа современных представлений о ситуации с X-хромосомой у самок млекопитающих была заложена еще в 1961 г., в форме **гипотезы об одиночной X**. Самки мышей, гетерозиготные по мутациям, обуславливающим окраску шерсти в манере, сцепленной с X-хромосомой, имеют мозаичный фенотип: шерсть на их теле окрашена пестро, участки цвета дикого типа перемежаются участками «мутантного» цвета. Такой фенотипический эффект можно отнести на счет *случайно инактивации одной из двух X-хромосом в каждой клетке небольшой популяции клеток-предшественников*. Клетки, в которых оказалась инактивирована X-хромосома, несущая ген дикого типа, посредством делений дают начало потомству (в смысле, популяции клеток), в котором экспрессируется только мутантный аллель (расположенный на активной хромосоме). Клетки, происходящие от клетки-предшественника, в которой была инактивирована другая хромосома, несут в себе активный ген дикого типа. В случае с окраской шерсти, клетки, ведущие свое происхождение от конкретной клетки-предшественника, остаются вместе, формируя таким образом одноцветный лоскут в паттерне окраски животного; это обстоятельство делает мозаичность наглядной. В других случаях клетки экспрессируют один из двух аллелей, расположенных в их X-хромосомах, в

индивидуальном порядке. Так, у гетерозигот по одному из локусов X-хромосомы, *G6PD*, каждая отдельно взятая красная кровяная клетка, эритроцит, будет экспрессировать какой-нибудь один из двух аллелей.

Инактивация одной X-хромосомы по выбору случайным образом имеет место у плацентарных млекопитающих. У сумчатых этот выбор направленный: инактивируется всегда X-хромосома, полученная от отца.

Инактивация X-хромосомы подчиняется **правилу п-1**: сколько бы ни было в клетке X-хромосом, инактивированы будут все, кроме одной. У нормальных самок X-хромосом, конечно же, две, но в тех редких случаях, когда неправильное расхождение хромосом приводит к генотипу с тремя или более X-хромосомами, активной останется лишь одна из них. Это обстоятельство наводит на общую модель, в соответствии с которой с одной и только одной из X-хромосом происходит некое особенное событие, охраняющее ее от воздействия инактивирующего механизма, который тем временем применяется по отношению ко всем остальным X-хромосомам клетки.

Для инактивации X-хромосомы достаточно наличия в ней определенного локуса. Если вдруг между X-хромосомой и аутосомой происходит транслокация и локус попадает в одну из хромосом-химер, этот продукт транслокации будет инактивирован. Локус можно картировать путем сравнения различных транслокаций; называемый центром инактивации X-хромосомы *Xic* (X-inactivation center). Клонированный участок генома протяженностью 450 тпн обладает всеми свойствами *Xic*. Если, в качестве трансгена, такую последовательность внедрить в аутосому, эта аутосома подвергнется инактивации (в системе с культивируемыми клетками).

Содержимое локуса *Xic* оказывает свое действие в ф/с-манере и несет в себе информацию, достаточную для того, чтобы «подсчитать» X-хромосомы и инактивировать их все, кроме одной. Инактивация распространяется от *Xic* по всей X-хромосоме. Если *Xic* присутствует в хромосоме-химере, возникшей в результате транслокации между X-хромосомой и аутосомой, инактивация

распространяется и на аутомсомные участки (хотя этот эффект не всегда отличается полнотой).

В *Xic* содержится ген, названный *Xist*, который экс-прессуруется только на *неактивной* X- хромосоме. В плане экспрессии, ген *Xist* ведет себя противоположно остальным генам X-хромосомы, на которой он находится (если *Xist* активен, остальные гены выключены). Делеция *Xist* предотвращает инактивацию X-хромосомы, в которой он отсутствует, но не «сбивает подсчета» X-хромосом (поскольку при этом остальные X-хромосомы могут инактивироваться). Таким образом, у *Xic* можно различить две характерных структурно-функциональных особенности: неустановленный элемент (или элементы), необходимые для подсчета, и *rtu Xist*, необходимый для инактивации.

Ген *Xist* служит матрицей для синтеза РНК, в которой нет открытых рамок считывания. Вместо того, чтобы кодировать белок, РНК *Xist* «обволакивает» X-хромосому, на которой она была синтезирована. Перед тем, как произойти инактивации, эта РНК синтезируется на обеих X-хромосомах. После инактивации такую РНК дает только неактивная X-хромосома (где ее и можно встретить). Интенсивность же транскрипции *Xist* остается прежней, так что перемена состояния хромосомы зависит не от нее, а от каких-то пост-транскрипционных событий.

Перед инактивацией X-хромосомы, РНК *Xist* деградирует; период ее полураспада составляет ~2 часа. Инактивация X-хромосомы опосредована стабилизацией РНК *Xist* на неактивной X-хромосоме. РНК *Xist* распределена по длине X-хромосомы в виде точек, указывая на то, что в основу стабилизации может быть заложена ее ассоциация с белками для формирования структуры в виде частиц. Мы пока не знаем, ни какие еще факторы могут быть задействованы в этой реакции, ни почему *VWkXist* в своем распространении ограничивается своей хромосомой. Такие характерные черты неактивной X-хромосомы, как отсутствие ацетилирования по гис-тону H4 и

метилированность последовательностей CpG, вероятно, обретаются хромосомой позднее, как результат действия механизма инактивации.

Правило n-1 предполагает, что стабилизация РНК *Xist* происходит по умолчанию, и что некий блокирующий механизм предотвращает такую стабилизацию лишь на одной из X-хромосом, которой предстоит остаться активной. Это означает, что хотя наличие *Xic* необходимо (и достаточно), чтобы хромосома оказалась *инактивирована*, для установления *активного* состояния X-хромосомы могут быть необходимы продукты других локусов.

Для активности X-хромосомы необходимо «погасить» на ней экспрессию *Xist*. Сайленсинг *Xist* можно предотвратить делецией гена ДНК-метилтрансферазы; скорее всего, эффект обусловлен тем, что метилирование промотора *Xist* необходимо для прекращения его транскрипции.

Поддерживающая метилаза обеспечивает воспроизводство статуса метилирования ДНК

Метилирование ДНК происходит по специальным сайтам. У бактерий оно ассоциировано с системой рестрикции-метилирования, которой клетка пользуется для защиты от бактериофагов, а также с системой распознавания реплицированной ДНК в сравнении с нереплицированной. Из известных функций метилирования ДНК у эукариот, основополагающей является участие в контроле транскрипции: метилирование ассоциировано с инактивацией генов.

У животных метилировано от 2% до 7% клеточной ДНК (точный процент зависит от вида животного). Большинство метильных групп обнаружено на «дублетах» CpG, и, на самом деле, метилированными является большинство последовательностей CG. Обычно метилированы цитидиновые группы в обеих цепях короткого палиндрома CG, что придает ему особую структуру.

Сайт ДНК с нестабильными признаками по обеим цепям называют **полностью метилированным**. Рассмотрим последствия репликации такого сайта. Каждый дочерний дуплекс будет содержать одну метилированную цепь и одну неметилированную цепь. Такой сайт ДНК называют **полуметилированным**.

Теперь воспроизводство метилированного сайта (с сохранением статуса метилирования) зависит от того, что произойдет с полуметилированной ДНК. Случись метилирование неметилированной цепи, и сайт будет восстановлен как полностью метилированный. Если до метилирования произойдет репликация, то полуметилированное состояние воспроизведется лишь в одном из дочерних дуплексов, а другому дочернему дуплексу достанется неметилированный сайт. Статус метилирования ДНК контролируется ферментами, среди которых есть **метилазы** (они добавляют метальные группы по пятому положению цитидина) и **деметилазы** (удаляющие метальные группы). Более формально эти ферменты называют **метилтрансферазамн**

Существует два типа ДНК-метилаз, различающихся по статусу метилирования субстратной ДНК. Чтобы метилировать ДНК «с нуля», необходимо действие ***de novo* метилазы**, узнающей специфическую последовательность ДНК, пригодную для метилирования. Фермент действует *только* на неметилированную ДНК и добавляет метильную группу к одной из ее цепей. У мышей есть две *de novo* метилазы, Dnmt3A и Dnmt3B с разными сайтами-мишенями; обе крайне важны в эмбриональном развитии.

Поддерживающая метилаза конститутивно действует *только на полуметилированные сайты*, превращая их в полностью метилированные сайты. Существование этого фермента означает для клетки воспроизводство каждого метилированного сайта после репликации. У мышей обнаружена одна поддерживающая метилаза, Dnmt1, и она очень важна: мыши с делецией гена метилазы гибнут в раннем эмбриогенезе.

Поддерживающее метилирование эффективно практически на 100%; это гарантирует ситуацию превалирующую *in vivo*. В результате, если один из двух, исходно идентичных, аллелей подвергнется метилированию *de novo*, оно будет воспроизводиться в череде клеточных поколений, то есть, возникшее различие между аллелями, никак не обусловленное их последовательностями, будет поддерживаться.

Для метилирования на ДНК существуют разнообразные типы мишеней. Самая распространенная мишень — промоторы генов. Когда ген неактивен, его промотор метилирован, когда же ген работает, его промотор неметилирован. Промоторы мышей, у которых нет *Dnmt1*, деметилированы. Предполагают, что именно это деметилирование летально, так как оно обуславливает бесконтрольную экспрессию генов. Другой мишенью служит сателлитная ДНК. Мутации по *Dn-mt3B* препятствуют метилированию сателлитной ДНК, что, на клеточном уровне, приводит к нестабильности центромер. Мутации в соответствующем гене человека являются причиной заболевания ICF иммунодефицит/ нестабильность центромер, лицевые аномалии. Важность метилирования подчеркивается существованием другого заболевания человека, синдрома Ретта; заболевание вызвано мутацией в гене, кодирующем белок MeCP2, который связывает метилированные последовательности CpG.

В обычном представлении, метилазы — это простые ферменты, самостоятельно действующие на ДНК-мишень. Возможно, наряду с ними существует и другая система метилирования, где для нацеливания фермента на ДНК используется короткая РНК с соответствующей последовательностью. Механизм, в соответствии с которым оперирует эта система, пока неясен.

Деметилированные участки ДНК: каким же образом они учреждаются и поддерживаются в таком состоянии? Если сайт ДНК изначально не был метилирован, то белок, узнавший такую (неметилированную) последовательность, может защитить ее от метилирования. Если же какой-либо сайт оказался метилирован, есть два способа его деметилировать. Первый способ — заблокировать работу поддерживающей метилазы на этом сайте во время репликации; тогда, после второго цикла репликации, один из дочерних дуплексов окажется неметилированным. Другой способ заключается в активном деметилировании сайта: либо удалив с цитидина метильную группу, либо вырезав метилированный цитозин (или цитидин) из ДНК, предоставив системе репарации заменить его. Известно, что активное деметилирование применяется к отцовской части генома зиготы вскоре после оплодотворения;

используемый для этого механизм не известен. Интересно, что в процессе может участвовать цитидин-деаминаза AID; этот фермент умеет деаминировать метилированные цитидины, тем самым создавая в ДНК некомплементарность, которую система репарации может скорректировать, заменив на стандартную (неметилированную) пару G-C.

Метилирование ДНК обуславливает импринтинг

Паттерн метилирования ДНК в половых клетках (гаметах) млекопитающих устанавливается во время гаметогенеза. Процесс протекает в две стадии: сначала исходный паттерн оказывается стертым в результате деметилирования в масштабах генома, после чего происходит наложение паттерна, характерного для данного пола.

Когда у эмбриона развиваются примордиальные половые клетки, все различия паттернов метилирования, которые существовали между аллелями до этого момента, теряются. Вне зависимости от пола эмбриона, ранее существовавшие паттерны метилирования оказываются стертыми, а большинство генов — не метилированными. У самцов установление нового паттерна метилирования происходит в два приема. Паттерн, характерный для зрелого сперматозоида, устанавливается заранее, на стадии сперматоцита, и последующие изменения вносятся уже после оплодотворения. У самок наложение на ДНК так называемого материнского паттерна метилирования происходит после рождения, когда яйцеклетки, созревая, проходят мейоз.

Как можно предположить, исходя из отсутствия активности генов в гаметах, их типичное состояние — метилированное. Однако по отдельным генам между полами есть различия (когда у одного из полов какой-нибудь локус не метилирован). Возникает вопрос: каким образом детерминируется специфичность метилирования в мужских и женских гаметах?

После оплодотворения, начиная с раннего эмбриогенеза, ДНК зародыша подвержена систематическим изменениям. Некоторые сайты продолжают оставаться метилированными, другие же оказываются специфично не метилированными в клетках, где ген начал экспрессироваться. Судя по

паттерну изменений, можно заключить, что индивидуальные события деметилирования, с прицелом на конкретные последовательности ДНК, происходят в период соматического развития, по мере активации конкретных генов.

Специфическим паттерном расположения метальных групп на ДНК (в половых клетках) обусловлен феномен **импринтинга**. Под импринтингом подразумевают разницу, с которой, в плане экспрессии, ведут себя аллели, унаследованные эмбрионом от разных родителей. Так, у эмбрионов мыши экспрессия определенных генов зависит от пола родителя, который передал их эмбриону. Например, аллель, кодирующий инсулиноподобный фактор роста II (IGF-II), унаследованный от отца, экспрессируется, а аллель того же гена, унаследованный от матери, молчит. Это связано с тем, что в ооцитах ген, кодирующий IGF-II, метилирован, а в сперматозоидах — нет; из-за этого в зиготе два аллеля ведут себя по-разному. Такой вариант импринтинга — самый частый, хотя для некоторых генов зависимость активности аллеля от пола родителя, его передавшего, как раз противоположная. Например, противоположный вариант импринтинга, экспрессия материнской копии, был продемонстрирован для гена, кодирующего IGF-III (рецептор IGF-II).

Чтобы такой способ наследования работал, необходимо, чтобы паттерн метилирования, с учетом половой специфичности, четко воспроизводился в каждой гамете. В эмбрионе, на ранней стадии развития, аллель, который был получен от отца, не метилирован и экспрессируется, в то время как материнский аллель метилирован и молчит. Что же происходит, когда у этой мыши начинают формироваться собственные гаметы? Если мышь — самец, то аллель, отходящий в сперматозоид, должен быть не метилированным, безотносительно того, был он исходно метилированным, или нет. Таким образом. Если материнский аллель окажется в сперматозоиде, он, к этому моменту, должен быть деметилирован. Если наша мышь — самка, то аллель отходящий в яйцеклетку, должен быть метилирован; если этот аллель исходно был отцовским, на него должны быть «посажены» метальные группы.

Следствием импринтинга является то, что эмбрион нуждается в отцовском (реже — в материнском) аллеле соответствующего гена. Рассмотрим гетерозиготный эмбрион: у него аллель, пришедший от одного из родителей, несет инактивирующую мутацию, в гомозиготе летальную. Если этот аллель достался эмбриону от отца (а аллель дикого типа унаследован эмбрионом от матери), эмбрион погибнет. Если же аллель дикого типа достался ему, наоборот, от отца, то эмбрион выживет. Такой тип зависимости исхода скрещивания от его направления (генетический термин, означающий важность сочетания пола родителя с вносимой им частью генотипа) не «укладывается» в генетику Менделя. Это — пример эпигенетической наследственности, при которой эффекты генов обуславливает некий фактор, не зависящий от их нуклеотидных последовательностей как таковых. Несмотря на то, что нуклеотидные последовательности отцовского и материнского аллелей идентичны, эти аллели проявляют разные свойства в зависимости от того, кто из родителей передал их своему потомству. С точки зрения *клеточных* поколений, эти свойства аллелей наследуются через мейоз и последующие серии соматических митозов.

Некоторые импринтируемые (дифференциально метилированные в зависимости от пола родителя) гены собраны в кластеры. Более чем половина из 17 известных импринтируемых генов мыши сосредоточена в двух конкретных областях генома; в каждой из этих областей есть гены, экспрессируемые у потомства от отца, и гены, экспрессируемые от матери. Это говорит о том, что действие механизмов импринтинга может покрывать в геноме большие расстояния. Об этом также можно судить по делециям в геноме человека, которыми обусловлены синдромы Прадера-Вилли и Ангелмана. В большинстве случаев эти заболевания обусловлены одной и той же делецией четырех мпн ДНК, а различия между двумя синдромами определяются полом родителя, от которого пациенту досталась делеция. Область генома, на которую приходится эта делеция, содержит, по меньшей мере, один ген, импринтируемый от отца и, по меньшей мере, один ген,

импринтируемый от матери. Существуют отдельные редкие случаи, когда те же синдромы развиваются на почве гораздо более мелких делеций. Так, синдром Прадера-Вилли может быть вызван делецией 20 тпн ДНК. Эта делеция заставляет замолчать гены, расположенные по обе стороны от нее, причем довольно далеко. Основным эффектом делеции состоит в том, что в сперматоцитах мужчин с такой делецией хромосома, унаследованная ими от матери, оказывается не в состоянии обрести паттерн метилирования, требуемый для последующего благополучного отцовства. Это приводит к тому, что гены этой хромосомы передаются потомству в материнском статусе; в результате, молчащими оказываются аллели, полученные как от отца, так и от матери. Эффект того же рода, с «замораживанием», наоборот, отцовского статуса метилирования, обнаруживается при некоторых мелких делециях, вызывающих синдром Ангелмана. Можно предполагать, что участок, на который приходится эти делеций, включает в себе некий «центр импринтинга», который, действуя на отдалении, переключает один родительский паттерн метилирования на противоположный.

Также метилированием обусловлены эпигенетические эффекты, под контролем которых находится экспрессия рРНК. Эффект **ядрышкового доминирования** заключается в том, что у потомства транскрибируется только один из двух комплектов генов рРНК. Причина эффекта в том, что промоторы генов рРНК, унаследованных от одного из родителей, метилированы по цитозинам.

Импринтинг генов с противоположной половой специфичностью может контролироваться из одного центра на хромосоме

Импринтинг обусловлен статусом метилирования недействующего сайта поблизости от одного или нескольких генов-мишеней. Участки генома, содержащие такие регуляторные сайты, называют «дифференциально метилированными доменами» (differentially methylated domains, DMD) или «участками контроля импринтинга» (imprinting control regions, ICR). Делеция

такого участка нейтрализует импринтинг, после чего гены-мишени в отцовской и материнской частях генома начинают вести себя одинаково.

Насколько разнообразным может быть влияние метилирования ДНК на активность генов, можно судить из наблюдений за областью генома, содержащей два гена, *Igf2* и *H19*. Показано, что эти гены противоположным образом реагируют на статус метилирования ICR, который находится между ними. На отцовской хромосоме ICR метилирован, на что *H19* дает типичный ответ инактивации. Заметим, что *Igf2* при этом экспрессируется. На материнской хромосоме, где ICR метилирован, имеет место обратная ситуация: *H19* экспрессируется, а *Igf2* инактивирован. Контроль над *Igf2* зависит от эффективности ICR как инсультатора. Показано, что неметилированный ICR связывает белок CTCF. Это придает ICR свойства инсультатора, запрещающего энхансеру активировать промотор *Igf2*. Эффект необычный: метилирование косвенным образом активирует ген за счет того, что блокирует инсультатор.

В регуляции *H19* использовано более стандартное направление контроля: метилирование переводит ген в неактивное импринтированное состояние, которое может быть прямым следствием ингибирования активности промотора за счет метилирования его ДНК.

Эпигенетические эффекты могут наследоваться

Под **эпигенетическим** наследованием подразумевают способность функциональных состояний генома, у которых могут быть разные фенотипические следствия, наследоваться при отсутствии каких-либо изменений в последовательности ДНК. Как такое может быть? В целом, механизмы возникновения эпигенетических эффектов можно подразделить на два типа:

ДНК может быть модифицирована химически: к ней, ковалентной связью, прикрепляется группа атомов (например, металльная), и это состояние начинает поддерживаться. В результате два аллеля с одинаковой нуклеотидной последовательностью могут иметь разный статус метилирования, придающий разницу их свойствам.

Для некоторых белков могут устанавливаться самоподдерживающиеся состояния. Средствами достижения таких состояний могут быть образование комплекса, модификация специфического белка (или белков), принятие белком альтернативной конформации.

Метилирование ДНК обеспечивает эпигенетическое наследование до тех пор, пока конститутивная активность поддерживающей метилазы восстанавливает метилированное состояние после репликации. Статус метилирования ДНК может быть пронесен без изменений через бесконечную череду соматических митозов. Скорее всего, по умолчанию, имеет место именно такая ситуация. Статус метилирования может быть пронесен и через мейоз: например, у гриба *Ascobolus* эпигенетические эффекты могут передаваться дочерним клеткам при митозе и мейозе как раз за счет поддержания статуса метилирования ДНК. У млекопитающих эпигенетические эффекты создаются за счет переустановки статуса метилирования в мужских и женских половых клетках.

Ситуации, при которых эпигенетические эффекты поддерживаются, как будто бы, через состояние белков, изучены, в молекулярном понимании, не так хорошо. Анализ мозаичности, обусловленной эффектом положения, показывает, что конститутивный гетерохроматин может распространиться по геному на некоторое (вариабельное) расстояние, и обретенное состояние будет устойчиво к соматическим делениям. У *Saccharomyces* метилирования ДНК не происходит вовсе, а у *Drosophila* происходит лишь в исчезающе малых дозах, так что наследование эпигенетических состояний, таких как теломерный сайленсинг или та же мозаичность, обусловленная эффектом положения, у этих организмов, по-видимому, полностью зависит от поддержания белковых структур.

Показано, как может сложиться судьба белкового комплекса, ассоциированного с ДНК, после репликации (рассмотрены крайние варианты).

Комплекс может поддерживать себя, если при репликации разделяется симметрично, и его половинки оказываются ассоциированы с дочерними

дуплексами ДНК. Если на основе таких половинок смогут затем сформироваться целые комплексы, исходное состояние будет восстановлено. По смыслу это аналогично поддержанию метилирования ДНК. Проблема с этой моделью заключается в том, что не очень понятно, зачем белковым комплексам так себя вести.

Комплекс может сохранить свою целостность и перейти к одному из двух дочерних дуплексов. С этой моделью проблема в том, что в ее рамках новый комплекс (на втором дочернем дуплексе) должен быть собран «с нуля», и не очень понятно, отчего это должно случиться.

Рассмотрим, к примеру, потребность в поддержании структуры гетерохроматина, основанной на присутствии белковых комплексов. Предположим, что белок распределен по отрезку гетерохроматина более или менее непрерывно. Если при репликации субъединицы белка распределяются по дочерним дуплексам в индивидуальном порядке случайным образом, два дуплекса останутся маркированы белком, несмотря на то, что его плотность понизится вдвое по сравнению с тем, что было до репликации. Если у данного белка есть способность к самосборке, и новые субъединицы стремятся с ним ассоциировать, исходная ситуация может быть восстановлена. Само существование эпигенетических эффектов заставляет думать, что белок, обусловивший такой эффект, обладает способностью контролировать самовоспроизведение и самосборку.

В некоторых случаях, эпигенетический эффект может быть обусловлен, скорее, модифицированным состоянием, нежели простым присутствием, белка. Существует общая корреляция между активностью хроматина и статусом ацетилирования гистонов, в особенности N-концевых «хвостов» гистонов H3 и H4. Активация транскрипции сопровождается ацетилированием гистонов вблизи промотора, а репрессия транскрипции ассоциирована с их деацетилированием. С наибольшим размахом эта корреляция проявляется в том, что неактивные X-хромосомы в клетках самок млекопитающих «недоацетилированы» по гистону H4.

Для соблюдения инертности конститутивного гетерохроматина может быть необходимо, чтобы его гистоны не были ацетилированы. Если в дрожжевой клетке фермент гистонацетилтрансферазу прикрепить к участку теломерного гетерохроматина, в этом гетерохроматине активируются молчащие гены. Если подвергнуть дрожжи действию трихостатина (ингибитор деацетилирования), их центромерный гетерохроматин станет ацетилированным, и в областях центромер молчащие гены могут стать активными. *Эффект может оставаться в силе даже после снятия обработки трихостатином.* И даже может быть пронесен через митоз или мейоз. Это говорит о том, что изменение статуса ацетилирования гистонов способно обусловить эпигенетический эффект.

Каким же образом статус ацетилирования гистонов может быть зафиксирован во времени? Предположим, при репликации тетрамеры H3₂-H4₂ распределяются по двум дочерним дуплексам ДНК случайным образом. Создается ситуация: каждый дочерний дуплекс несет октамеры, как полностью ацетилированные по «хвостам» гистонов H3 и H4, так и вовсе не ацетилированные. Чтобы эпигенетический эффект закрепился, можно предположить, что наличие на ДНК полностью ацетилированных октамеров служит сигналом к ацетилированию остальных октамеров.

В действительности, ситуация, скорее всего, обстоит сложнее, чем изображено на рисунке, поскольку известно, что во время репликации гистоны, на короткое время, обзаводятся ацетильными группами, поскольку это оптимизирует сборку октамеров. Дальше непонятно: если по завершении монтажа нуклеосом эти ацетильные группы с гистонов (в любом случае) удаляются, то ими можно пренебречь. Альтернативная возможность состоит в том, что полностью ацетилированные октамеры не индуцируют ацетилирование остальных октамеров *de novo*, но, препятствуя деацетилированию гистонов, придают «техническому» ацетилированию регуляторный смысл. А, может быть, они делают и то, и другое.