С.В. Разин, А.А. Быстрицкий

ХРОМАТИН: УПАКОВАННЫЙ ГЕНОМ

4-е издание (электронное)



Москва БИНОМ. Лаборатория знаний 2015

Разин С. В.

Р17 Хроматин: упакованный геном [Электронный ресурс] / С. В. Разин, А. А. Быстрицкий. — 4-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf: 191 с.). — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — Систем. требования: Adobe Reader XI; экран 10".

ISBN 978-5-9963-2950-2

В учебном издании впервые всесторонне рассмотрены структурные и функциональные особенности эукариотического генома, главное — упаковка ДНК в хроматин. Подробно описан гистоновый код и его влияние на экспрессию генов. Изложение основано на новейших данных и современной концепции об организации генома в хромосомные территории.

Для студентов и аспирантов биологических специальностей, а также специалистов в области молекулярной биологии эукариот.

УДК 577(075.8) ББК 28.04я73

Деривативное электронное издание на основе печатного аналога: Хроматин: упакованный геном / С. В. Разин, А. А. Быстрицкий. — 3-е изд. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013.-172 с. : ил., [16] с. цв. вкл. — ISBN 978-5-9963-1611-3.

В соответствии со ст. 1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации

СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

Отличительной особенностью организации генома эукариот является упаковка ДНК в хроматин и размещение его в особом компартменте — клеточном ядре. Упаковка в хроматин обеспечивает многократное сокращение линейных размеров ДНК, необходимое для размещения ее в ядре. Для того чтобы оценить масштабность проблемы, заметим, что геном человека имеет размер около 3×10⁹ пар оснований. Если бы весь геном состоял из одной молекулы ДНК (т. е. не был бы разделен на ряд хромосом), то протяженность такой молекулы составила бы ≈2 м. Диаметр же клеточного ядра составляет, как правило, около 10 мкм. Очевидно, что для размещения в ядре геномной ДНК ее линейные размеры должны быть сокращены в 200 000 раз. При этом необходимо обеспечить доступность определенных последовательностей ДНК для регуляторных факторов и ферментов транскрипции.

Все эти непростые задачи решаются на уровне упаковки ДНК в хроматин, которая происходит в несколько этапов; наиболее изученными являются накручивание ДНК на нуклеосомы, компактизация нуклеосомной нити с образованием так называемой 30-нм фибриллы и сворачивание последней в гигантские (50–200 т. п. н.) петли, закрепленные на белковой скелетной структуре ядра — ядерном матриксе (рис. 1). Ниже мы рассмотрим более подробно эти три уровня упаковки ДНК в хроматине. Сначала, однако, следует кратко охарактеризовать белки, участвующие в формировании хроматина.

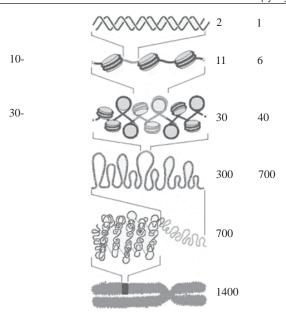


Рис. 1. Уровни компактизации генома

На рисунке схематично изображены различные уровни организации хроматина и характерные для каждого уровня размеры структурных единиц и степень компактизации (количество ДНК в равных по длине участках соотвепствующих фибрилл).

Из Alberts B. et al. "Essential Cell Biology" (2nd ed.) 2004, с любезного разрешения Taylor & Francis Group.

1.1. ГИСТОНЫ

Наибольшую часть ядерных белков составляют гистоны. Выделяют пять основных типов гистонов: H1, H2A, H2B, H3 и H4. В эритроцитах птиц вместо H1 присутствует близкородственный гистон H5. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 входят в состав белковой глобулы минимальной нуклеосомы. Это небольшие белки с молекулярными массами 10–15 кДа. Они чрезвычайно богаты положительно заряженными аминокислотами (лизином и аргинином). Положительно заряженные аминокислоты сосредоточены преимущественно в С-концевых и N-концевых частях молекул нуклеосомных гистонов, тогда как центральный домен относительно богат гидрофобными остатками. Вторичная структура всех нуклеосомных гистонов характеризуется присутствием протяженного α-спирального домена, который фланкируют (с обоих концов) домены, содержащие короткие α-спирали и пет-

1.1. Гистоны

ли. Аминокислотные остатки (15–30), расположенные на N-концах нуклеосомных гистонов, не организованы в какие-либо выраженные вторичные структуры. Эти части молекул нередко называют «хвостами» («tails»). В денатурированном виде гистоны образуют самые различные агрегаты. Нативные молекулы нуклеосомных гистонов образуют в растворе два типа комплексов: тетрамер (H3-H4)₂ и димер Н2А-Н2В.

стонов образуют в растворе два типа комплексов: тетрамер (Н3-Н4)₂ и димер Н2А-Н2В.

Нуклеосомные гистоны относятся к числу наиболее консервативных белков. Их аминокислотные последовательности имеют почти 100%-ю гомологию у всех эукариот. В геноме позвоночных животных гены, кодирующие каждый из нуклеосомных гистонов, представлены несколькими копиями. Так, в геноме человека присутствует 15 генов, кодирующих Н2А, 17 генов, кодирующих Н2В, 10 генов, кодирующих Н3, и 14 генов, кодирующих Н4.

Гистон Н1 существенно отличается от четырех гистонов, вхолящих в состав минимальной нуклеосомы. Этот гистон имеет молекулярную массу, превышающую 20 кДа. В составе Н1 присутствует значительно больше остатков лизина, чем аргинина, причем все положительно заряженные аминокислотные остатки сконцентрированы преимущественно в С-концевом домене молекулы Н1, который является достаточно длинным (100 аминокислотных остатков) и характеризуется неупорядоченной структурой. Центральная область N-концевой части молекулы Н1 богата гидрофобными аминокислотными остатками и в растворе образует глобулу, которая может быть отделена от остальной части молекулы посредством мягкой обработки трипсином. Неструктурированный N-концевой домен является достаточно коротким.

В последние годы обнаружено много так называемых вариантных форм гистонов. Как правило, эти формы отличаются от основных несколькими аминокислотными заменами. Существуют, однако, вариантные формы гистонов, имеющие серьезные отличия от основных форм. В настоящее время охарактеризованы группы вариантных форм гистонов Н1, Н2А, Н2В и Н3. Каждая из вариантных форм гистонов но копией. Исключение составляет Н3.3. В геноме человека присутствует две копии гена, кодирующего этот вариант гистона Н3. Вариантных форм гистона Н4 пока не обнаружено.

Наибольшее количество вариантных форм обнаружено для гистона Н1. Самой хорошо изученной вариантной формой гистона Н1

Наибольшее количество вариантных форм обнаружено для гистона H1. Самой хорошо изученной вариантной формой гистона H1 является упоминавшийся выше гистон H5, который замещает H1 в неактивных ядрах эритроцитов птиц. В клетках мыши иден-

тифицировано восемь вариантов H1, причем шесть из них присутствует в соматических клетках и два — в клетках зародышевой линии. Биологическая значимость различных вариантов H1 пока остается неясной. Во всяком случае, удаление (knock-out) поочередно каждого из генов, кодирующих эти варианты H1, не приводило к каким-либо видимым последствиям. Лишь в одном случае (регуляция экспрессии генов 5S рРНК у шпорцевой лягушки в ходе развития) было четко показано, что прекращение экспрессии кластера генов 5S рРНК в ооцитах коррелирует с замещением ооцитарного варианта гистона H1 (H1M) на мажорный вариант H1, экспрессирующийся после стадии средней бластулы.

с замещением ооцитарного варианта гистона пт (птм) на мажорный вариант Н1, экспрессирующийся после стадии средней бластулы.

Наиболее хорошо изучены вариантные формы нуклеосомных гистонов Н3 и Н2А. Вариантом гистона Н3 является белок СЕNР-А, который замещает Н3 в нуклеосомах, расположенных в центромерной области. По аминокислотной последовательности эта вариантная форма сильно отличается от основной формы гистона Н3 в N-концевой области. СЕNР-А экспрессируется в конце S-фазы и в G2-фазе. Особые свойства центромерных участков хромосом определяются именно присутствием белка СЕNР-А. Привлечение СЕNР-А в какой-либо участок хромосомы приводит к формированию в этом участке нормально функционирующей центромеры. В противоположность другим гистонам, которые в сперматозоидах замещаются на протамины, СЕNР-А остается связанным с центромерными участками хромосом. Это позволяет говорить о существовании особого типа эпигенетической памяти, существенного для передачи информации о позициях центромерных участков. Аналоги СЕNР-А млекопитающих выявлены и у других эукариотических организмов. У дрозофилы аналогом белка СЕNР-А является белок Сіd. У дрожжей центромерным вариантом Н3 является Сse4. В современной литературе все центромерные варианты Н3, включая и СЕNР-А, часто называют СеnН3 (септотепсі Н3).

Другими вариантами гистона Н3 (Н3.1) являются Н3.2 и Н3.3.

Другими вариантами гистона Н3 (Н3.1) являются Н3.2 и Н3.3. Гистон Н3.2 отличается от Н3.1 только одной аминокислотной заменой, поэтому данные варианты Н3 часто рассматривают как одну форму. Вариантный гистон Н3.3 отличается от основной формы (Н3.1) заменами в четырех аминокислотных позициях. Этот вариант гистона Н3 присутствует в транскрипционно-активном хроматине. По приблизительным оценкам, примерно 25% всех нуклеосом содержат гистон Н3.3. Следует отметить, что Н3.3 характеризуется высокой эволюционной консервативностью. Эта

1.1. Гистоны 7

вариантная форма НЗ была обнаружена у всех изученных эукариот; от дрожжей до человека. Экспрессия НЗ.З не координирована с клеточным циклом. В отличие от основной формы гистона НЗ вариантная форма НЗ.З включается в состав нуклеосом по не зависящему от репликации хроматина пути (см. разд. 3.8). Недавно обнаружена еще одна вариантная форма гистона НЗ — НЗ.1t. Этот вариант гистона НЗ присутствует только в клетках семенников. Специфичными для клеток семенников и для сперматозоидов являются и все известные в настоящее время варианты гистона Н2В (hTSH2B и H2BFWT).

Н2В (n1SH2в и н2вгw1).
Описано несколько вариантов гистона H2A, выполняющих специальные функции. Гистон macroH2A сосредоточен в неактивной копии X-хромосомы млекопитающих (у особей женского пола, имеющих две X-хромосомы) и присутствует в некоторых специфических позициях в других хромосомах. Этот гистон сильно отличается от канонического H2A. В N-конв некоторых специфических позициях в других хромосомах. Этот гистон сильно отличается от канонического H2A. В N-концевом домене тастоH2A гомологичен гистону H2A на 64%. Протяженный участок аминокислотной последовательности тастоH2A (57% от общей длины) вообще не имеет гомологии с каким-либо из известных гистонов. Описано три субварианта тастоH2A (macroH2A1.1, macroH2A1.2 и macroH2A2). Высокая консервативность тастоH2A, в том числе присутствие этого варианта гистона H2A в хроматине птиц, не имеющих неактивной X-хромосомы, указывает на возможность его участия в процессе инактивации генов (так называемого «сайленсинга», silencing) в различных областях генома у всех высших эукариот. Существует и вариант гистона H2A, функционально противоположный тастоH2A — H2A. Вbd. Этот вариант, который имеет лишь 42% гомологии с H2A, практически отсутствует в неактивной копии X-хромосомы (отчего он получил свое название — Вагт body deficient, «отсутствующий в тельце Барра») и, вероятно, является одним из компонентом активного хроматина. Согласно ряду данных, компонентом активного хроматина. Согластистон H2A.Z. Другие исследователи, напротив, обнаружили H2A.Z в составе центромерного гетерохроматина и в ряде других неактивных геномных областей. Таким образом, функции этого варианта H2A могут зависеть от хромосомного контекста. Гистон H2A.Z присутствует у широкого спектра организмов: от дрожжей до человека. Ген, кодирующий гистон H2A.Z, является необходимым для выживания у таких далеко отстоящих друг от друга на эволюционной лестнице организмов, как тетрахимена и дрозофила. У всех высших эукариот обнаружен гистон H2A.X; фосфорилированная форма этого гистона, получившая обозначение γH2A.X, маркирует места разрывов в ДНК и, повидимому, стимулирует каким-то образом их репарацию.

Список вариантных форм гистонов, скорее всего, не является окончательным. Тем не менее уже сейчас является очевидным, что нуклеосомы, построенные с участием вариантных форм гистонов, могут отличаться от канонических и выполнять некие особые функции. Эта идея отражена в сформулированной в последние годы гипотезе «гистонового кода», которая будет обсуждаться более подробно в разд. 1.3.

Различия между отдельными нуклеосомами возникают и в связи с посттрансляционными модификациями гистонов. Основными модификациями являются ацетилирование лизиновых остатков, метилирование лизиновых, аргининовых и гистидиновых остатков, фосфорилирование остатков треонина и серина, сумоилирование и убиквитинилирование лизиновых остатков и поли-АДФ-рибозилирование остатков глутаминовой кислоты. Мишени для модификаций сосредоточены преимущественно в неструктурированных N-концевых («хвостовых») доменах. Модификации нуклеосомных гистонов играют важную роль в установлении и поддержании различных хроматиновых структур, в том числе активного и неактивного хроматина (разд. 2.1). Посттрансляционным модификациям подвергаются не только основные, но и вариантные формы гистонов. При этом некоторые важные мишени для модификаций, присутствующие в основных формах гистонов, утрачиваются в некоторых вариантных формах.

- Гистоны небольшие положительно заряженные белки являются наиболее важными белками хроматина.
- Существует пять основных типов гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4.
- Гистоны Н2А, Н2В, Н3 и Н4 формируют нуклеосомную глобулу.
- Наряду с каноническими гистонами существует широкий спектр вариантных форм гистонов, которые кодируются отдельными генами и выполняют специальные функции.
- Гистоны часто подвергаются различным посттрансляционным модификациям. Основные мишени для модификаций сосредоточены в N-концевых доменах гистонов.

1.2. НЕГИСТОНОВЫЕ БЕЛКИ

Термин «негистоновые белки», вообще говоря, следует признать устаревшим. Если понимать его в широком смысле, то наряду с негистоновыми белками собственно хроматина в эту группу следует включить все белки ядра, кроме гистонов, в том числе структурные белки (ламины, белки поровых комплексов и белки ядерного матрикса), белки РНП частиц, в том числе рибосом, сборка которых происходит в ядрышке, все присутствующие в ядре ферменты (в частности, ДНК- и РНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы, ферменты, осуществляющие ремоделирование хроматина, ферменты репарации ДНК, ферменты сплайсинга), все белки, участвующие в регуляции транскрипции и репликации и т. д. Ясно, что объединение столь разнородных белков в общую группу на том лишь основании, что они не являются гистонами, лишено всякого смысла.

В узком смысле можно говорить о негистоновых белках, непосредственно участвующих в формировании хроматиновых фибрилл. В этом случае в данную группу попадут НМG-белки и белки, участвующие в формировании компактных (неактивных) хроматиновых структур, которые в последнее время часто называют архитектурными белками хроматина. К числу архитектурных белков хроматина обычно относят НР1 (heterochromatin protein 1), белки группы Polycomb, белок MENT, присутствующий в терминально дифференцированных клетках (эритроциты птиц, лейкоциты млекопитающих), MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) позвоночных животных и Sir-белки дрожжей.

HMG-белки

Белки НМG можно разделить на три группы — HMGA (ранее назывались HMG-I/Y), HMGB (HMG-1/2) и HMGN (HMG-14/17), в каждой из которых присутствует характеристический белковый домен. Наиболее широко представлены в ядре белки группы HMGB. В большинстве клеток общее количество этих белков примерно в 10 раз меньше, чем гистонов. Белки группы HMGB характеризуются наличием так называемого домена HMG-1 (HMG-1 box). Домен HMG-1, включающий три α-спиральных участка, связывается с малой бороздкой ДНК и вызывает частичное разворачивание двойной спирали, приводящее к резкому изгибу молекулы. Связывание домена HMG-1 с ДНК не является специфичным в отношении последовательности.

Белков группы HMGA в ядре примерно в 100 раз меньше, чем HMGB, и в 10 раз меньше, чем белков HMGN. Для HMGA характерно присутствие так называемого АТ-крючка (AT-hook). Это положительно зараженный домен из 9 аминокислотных остатков, содержащий консервативную Gly-Arg-Pro (GRP) последовательность, фланкированную остатками аргинина. АТ-крючок связывается с малой бороздкой АТ-богатых последовательностей ДНК. Связывание не является в строгом смысле специфичным в отношении последовательности ДНК. В противоположность домену HMG-1, АТ-крючок предотвращает нарушения правильной укладки двойной спирали ДНК.

в отношении последовательности ДНК. В противоположность домену НМС-1, АТ-крючок предотвращает нарушения правильной укладки двойной спирали ДНК.

Белки НМСО с ДНК непосредственно не связываются. Они содержат домен связывания с нуклеосомами, причем с нуклеосомной частицей могут связываться гомодимеры (НМС-14)₂ и (НМС-17)₂, но не гетеродимеры, содержащие одну молекулу НМС-14 и одну молекулу НМС-17. Связываясь с нуклеосомными частицами, НМСО вызывают определенные изменения в их структуре, которые приводят к декомпактизации нуклеосом. Функции НМС-белков в хроматине в течение многих лет связывали с формированием транскрипционно-активного хроматина. Сейс формированием транскрипционно-активного хроматина. Сейчас ясно, что спектр их функций существенно шире. Непосредственную роль HMG-белков в хроматине можно охарактеризовать ственную роль HMG-белков в хроматине можно охарактеризовать как архитектурную. Вызывая различные изгибы в ДНК и влияя на уровень компактизации нуклеосомной фибриллы, эти белки могут способствовать либо, наоборот, препятствовать связыванию с ДНК различных транскрипционных факторов и других регуляторных белков. HMG-белки участвуют в реализации большинства процессов, требующих декомпактизации хроматина и нарушения регулярного расположения нуклеосом на ДНК.

Хотя НМG-белки традиционно относят к белкам хроматина, их ассоциация с ДНК и нуклеосомами является довольно непроиной. Эти белки дегко экстрагируются из дпра 0.35 М рас-

Хотя НМG-белки традиционно относят к белкам хроматина, их ассоциация с ДНК и нуклеосомами является довольно непрочной. Эти белки легко экстрагируются из ядра 0,35 М раствором NaCl, т. е. в тех же условиях, что и большинство транскрипционных факторов. Для сравнения скажем, что для полной экстракции нуклеосомных гистонов необходима инкубация ядер в 2 М растворе NaCl.

HP1 (heterochromatin protein 1)

Белок HP1 был первоначально идентифицирован в клетках дрозофилы как один из важных компонентов неактивного гетерохроматина. Отсюда происходит и название этого белка.

Впоследствии гомологи НР1 дрозофилы были обнаружены у всех эукариотических организмов. Молекулярная масса НР1 и его гомологов составляет ≈20 кДа. В аминокислотной последовательности этих белков присутствуют два важных домена. На N-конце молекулы находится хромодомен (chromodomain, CD), ответственный за связывание с метилированным остатком лизина К9 гистона Н3. Аналогичные домены обнаружены также в аминокислотных последовательностях белков группы Polycomb и гистонметилазы Su (var)3-9. На С-конце молекулы НР1 расположен так называемый «теневой» хромодомен (chromoshadow domain, CHD), имеющий определенное сходство с основным хромодоменом. Этот домен существенен для димеризации НР1 и его взаимодействия с рядом других белков, включая переносчик гистонов САF1. НР1 необходим для образования компактных хроматиновых структур (гетерохроматина) (см. разд. 2.4).

Белки группы Polycomb

Подобно HP1, белки группы Polycomb (PcG) были впервые обнаружены у дрозофилы и впоследствии у других эукариотических организмов. Название этих белков происходит от названия мутации одного из гомеотических генов дрозофилы, приводящей к появлению дополнительных половых щетинок. В состав группы Polycomb входит ряд различных белков, которые формируют два разных комплекса (PC1 и PC2), участвующих в регуляции динамики хроматина. Связывание этих белков с определенными регуляторными элементами на ДНК (Polycomb response elements, PRE) приводит к инактивации генов, находящихся под контролем этих элементов (см. разд. 2.4).

MENT

Белок MENT (myeloid and erythroid nuclear termination stage protein) присутствует в достаточно больших количествах в ядрах терминально дифференцированных эритроцитов птиц и лимфоцитов млекопитающих. Его молекулярная масса 42 кДа. Основной функцией белка MENT является участие в конденсации хроматина. Конкретный механизм этой конденсации пока не изучен. Согласно ряду данных, MENT стимулирует сближение линкерных фрагментов внутри хроматиновой фибриллы, обеспечивая таким образом сворачивание 30-нм фибриллы в более компактную

структуру. Одновременно с этим MENT участвует в поддержании взаимодействий между разными фибриллами, что способствует более компактной упаковке ДНК, характерной для неактивных ядер терминально дифференцированных клеток. Осуществление этих функций не требует взаимодействия MENT с каждой нуклеосомной глобулой. В эритроцитах кур одна молекула MENT приходится на 50 нуклеосомных частиц.

MeCP2

MeCP2 (**me**thyl-**C**pG binding **p**rotein 2) был первоначально описан как белок, связывающийся с метилированной ДНК. В аминокислотной последовательности этого белка с молекулярной массой 53 кДа присутствуют МВD-домен, который необходим для связывания с метилированной ДНК, репрессорный домен (TRD), подавляющий инициацию транскрипции и WW-мотив, необходимый для образования комплексов с рядом других белков. Роль МеСР2 в образовании неактивных хроматиновых доменов подробно рассматривается в разд. 2.4.

робно рассматривается в разд. 2.4.

В последнее время получен целый ряд экспериментальных результатов, свидетельствующих о том, что роль MeCP2 в регуляции динамики хроматиновой фибриллы является более многообразной, чем предполагалось ранее. Показано, в частности, что этот белок связывается с олигонуклеосомами, собранными *in vitro* как на метилированной, так и на неметилированной ДНК. При этом происходит компактизация олигонуклеосомных фрагментов с образованием эллипсоидных частиц с последующей их олигомеризацией в достаточно крупные (более 60 нм) комплексы.

SIR3

SIR3 является одним из компонентов комплекса белков SIR (silent information regulator), играющего ключевую роль в формировании неактивных хроматиновых доменов в дрожжевых клетках (см. разд. 2.4). В рамках обсуждения архитектурных белков хроматина следует отметить, что SIR3 связывается с олигонуклеосомными фибриллами, вызывая их ассоциацию в большие комплексы. При этом сам SIR3 способен к образованию олигомеров, что увеличивает возможности построения различных надмолекулярных структур.

- Термин «негистоновые» белки является устаревшим и имеет неоднозначную трактовку.
- По существующей традиции, наиболее важными негистоновыми белками считаются белки группы HMG. Можно выделить три подгруппы HMG-белков (HMGB, HMGN и HMGA). Все эти белки выполняют в ядре некие «архитектурные функции» и регулируют динамику нуклеосомных фибрилл.
- Наряду с HMG-белками к негистоновым белкам, выполняющим структурные функции в хроматине, относятся белки, участвующие в формировании гетерохроматина (HP1, Polycomb, MENT, MeCP2, Sir).

1.3. НУКЛЕОСОМЫ

Открытие нуклеосом заложило основу современных представлений о хроматине. Хроматин перестал быть аморфной массой и предстал перед глазами исследователей в виде достаточно упорядоченной структуры, построенной по иерархическому принципу.

структуры, построенной по иерархическому принципу.

Нуклеосома является базовой структурной единицей первого уровня упаковки ДНК в хроматине. Она представляет собой белковую глобулу или, точнее говоря, некое подобие диска, на который намотан фрагмент ДНК протяженностью 146 п. н. Намотанная на нуклеосомную глобулу ДНК образует 1,65 супервитка. Глобула состоит из восьми молекул гистонов: тетрамера (Н3-Н4)₂ и двух димеров Н2А-Н2В. Диаметр глобулы-диска составляет ≈11 нм, а высота — 5,7 нм (рис. I на цветной вклейке).

Нуклеосомы были обнаружены при электронной микроскопии развернутых хроматиновых фибрилл (хроматина, полученного после мягкой обработки ядер стафилококковой нуклеазой и экстракции 0,2 мМ ЭДТА). На электронно-микроскопических снимках были выявлены единообразные глобулы, регулярно расположенные на молекуле ДНК. Эти структуры (рис. 2) получили называние «бусины на нити». Другое важное свидетельство того, что ДНК в составе хроматина организована в регулярные структуры, было получено при анализе результатов частичного расщепления ядерной ДНК стафилококковой нуклеазой. Типичным продуктом такого расщепления является набор фрагментов с размерами, кратными 200 п. н. (рис. II на цветной вклейке). Это свидетельствовало о том, что в хроматине ДНК организована в некие единообразные

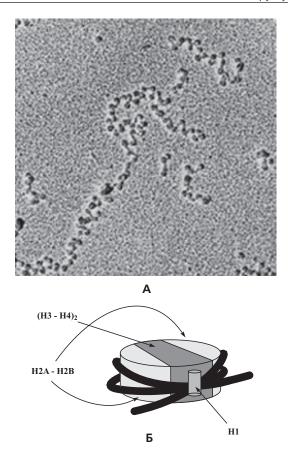


Рис. 2. Устройство 10-нм хроматиновой фибриллы («бусины на нити») Показаны электронная микрофотография нескольких нуклеосом (А) и схема пространственной организации хроматосомы — коровой нуклеосомы с молекулой гистона Н1 (Б). Гистон Н1 связывается с обоими концами нуклеосомной ДНК. Взаимное пространственное расположение Н1 и дуплексов ДНК определяет структуру и 10-нм и 30-нм фибриллы. А: © Brian Staveley, Memorial University of Newfoundland.

и регулярно расположенные на молекуле ДНК структурные единицы, обеспечивающие относительную защиту фрагментов ДНК протяженностью 200 п. н. Предпочтительной мишенью для нуклеазной атаки представлялась так называемая спейсерная ДНК, т. е. ДНК, расположенная между структурными единицами. Структурные единицы хроматина, защищающие от нуклеазной атаки 200 п. н. фрагменты ДНК, легко отождествлялись с глобу-

лами, выявленными при электронной микроскопии хроматиновых фибрилл.

лами, выявленными при электронной микроскопии хроматиновых фибрилл.

Упорядоченная организация нуклеосомных частиц дала возможность их кристаллизации и последующего рентгеноструктурного анализа. В настоящее время структура нуклеосомной частицы разрешена с точностью до 1,9 Å. Примерно с такой же точностью разрешена структура октамера гистонов без ДНК (рис. III на цветной вклейке). Гистоны октамера уложены в левозакрученную суперспираль, стерически соответствующую суперспирали фрагмента ДНК в составе минимальной нуклеосомы. Важным принципом организации гистонового октамера является построение его из модулей: двух гетеродимеров гистонов Н2А-Н2В и тетрамера гистонов (Н3-Н4). Расположение гистонов по ходу молекулы ДНК является следующим: димеры Н2А-Н2В контактируют с ДНК на входе и выходе из нуклеосомной частыю накрученного на нуклеосомную глобулу фрагмента ДНК. Гистоны контактируют с фосфодиэфирным остовом молекулы ДНК. Контакты реализуются через каждые 10 пар оснований, когда малая бороздка ДНК оказывается развернутой внутрь. В целом, накрученная на нуклеомную глобулу ДНК образует 14 прочных электростатических контактов, существуют и гидрофобные взаимодействия с остатками рибозы. Важно, что азотистые основания не участвуют во взаимодействиях с гистонами, поэтому связывание ДНК с нуклеосомной глобулой не является специфичным в отношении последовательности ДНК. Два витка ДНК расположены на нуклеосомной глобуле параллельно, так что бороздки ориентированы одинаково. Благодаря этому между витками ДНК остается достаточно места для прохождения наружу N-хвостовых доменов гистонов Н2В и Н3; N-хвостовые домены гистонов Н2А и Н4 выходят за пределы глобулы.

Гистон Н1 связывается с концами молекулы ДНК, входящей глобулы.

Гистон H1 связывается с концами молекулы ДНК, входящей и выходящей из минимальной нуклеосомы, замыкая два полных витка двойной спирали.

В течение многих лет подчеркивалась консервативность организации нуклеосом, равно как и консервативность гистонов, составляющих нуклеосомную глобулу. В настоящее время уже очевидно, что данная точка зрения является упрощенной. Действительно, общие принципы организации нуклеосомной частицы универ-

сальны. Однако включение в нуклеосомную частицу вариантных форм гистонов в ряде случаев существенно изменяет архитектуру гистонового октамера. Еще более важным представляется то, что в большинстве случаев прослеживается четкая корреляция между присутствием в нуклеосомах вариантных форм гистонов и осуществлением тех или иных функциональных процессов.

Ковалентные модификации гистонов существенно увеличивают потенциальное разнообразие нуклеосомных частиц. Основные мишени для модификаций находятся в N-концевых участках аминокислотной последовательности гистонов. Эти участки не входят в состав нуклеосомной глобулы и остаются экспонированными на поверхности нуклеосомы. Наиболее изученной модификацией является ацетилирование лизиновых остатков. В составляющих нуклеосомную глобулу молекулах гистонов Н2В, Н3 и Н4 имеется по 4 экспонированных лизиновых остатка. Еще две таких мишени для ацетилирования присутствуют в молекуле гистона Н2А. Если учесть, что в нуклеосомной частице каждый из перечисленных гистонов представлен двумя копиями и что каждая молекула гистона может ацетилироваться по одной или нескольким позициям, то легко подсчитать, что в принципе можно создать 6,7×10⁷ нуклеосомных частиц, различающихся по спектру ацетилирования составляющих их гистонов. Это превосходит число нуклеосом, присутствующих в ядре средней эукариотической клетки. Помимо ацетилирования, хорошо известны и другие ковалентные модификации гистонов: метилирование лизиновых о аргининовых остатков, фосфорилирование сериновых остатков, поли-АДФ-рибозилирование остатков глутаминовой кислоты, убиквитинилирование и сумоилирование. Таким образом, потенциальное многообразие нуклеосомы, построенные с участием вариантных и модифицированных форм гистонов, могут отличаться от канонических и выполнять некие особые функции. В некоторых случаях включение в нуклеосомную глобулу той или иной вариантной формы гистонов либо осущест-

ванных форм гистонов, могут отличаться от канонических и выполнять некие особые функции. В некоторых случаях включение в нуклеосомную глобулу той или иной вариантной формы гистонов либо осуществление ковалентных модификаций гистонов само по себе приводит к изменению архитектуры нуклеосомной глобулы или ее дестабилизации, что обеспечивает адаптацию данных нуклеосомных частиц для участия в тех или иных функциональных процессах (см. разд. 1.4). Существенно чаще модификации гистонов выполняют сигнальную функцию. Совокупность сигналов, экспонированных на поверхности нуклеосом (включая как присутствие вариантов гистонов, так и наличие того или иного спектра модификаций основных и вари-

антных форм гистонов), представляет особый эпигенетический код, называемый также гистоновым кодом. Этот код может считываться различными белками, регулирующими конденсацию хроматиновой фибриллы и участвующими тем или иным образом в репликации, транскрипции, репарации ДНК и других генетических процессах. Значение различных комбинаций сигналов гистонового кода еще только начинает изучаться.

Только начинает изучаться.

Как уже говорилось, намотанная на нуклеосомную глобулу ДНК образует 1,65 супервитка. Эти супервитки называют компенсированными, потому что они не могут быть релаксированы при обработке хроматина топоизомеразами. Компенсированные супервитки освобождаются после обрабоки нуклеосомной фибриллы агентами, вызывающими диссоциацию/удаление гистоновых октамеров (например, концентрированными солевыми растворами или додецилсульфатом натрия). Если вращение концов ДНК ограничено (как в ковалентно натрия). Если вращение концов ДНК ограничено (как в ковалентно замкнутых кольцевых минихромосомах), удаление гистонов приводит к образованию отрицательно закрученной суперспирали. В замкнутых кольцевых молекулах ДНК число перекрещиваний нитей ДНК (linking number, Lk) является величиной инвариантной. При наличии суперспирализации число перекрещиваний нитей ДНК является суммой витков двойной спирали (twist, Tw) и витков суперспирали (writhe, Wr). Если бы параметры двойной спирали ДНК в растворе и после намотки на нуклеосомную глобулу были одинаковы, то удаление каждой нуклеосомной глобулы приводило бы к появлению 1,65 отрицательных супервитков. В действительности при удалении одной нуклеосомной глобулы появляется один супервиток ДНК. Этот феномен получил название linking number paradox. Кажущееся противоречие связано с тем, что параметры двойной спирали ДНК, намотанной на нуклеосомную глобулу, не идентичны параметрам двойной спирали ДНК в растворе.

- Нуклеосома является базовой структурной единицей хроматина.
- Основу нуклеосомной глобулы (диска) составляет октамер гистонов, состоящий из двух димеров H2A-H2B и тетрамера (H3-H4)₂. На октамер гистонов намотан фрагмент ДНК протяженностью 146 п. н., который образует 1,65 отрицательных супервитка.
- Нуклеосомы не являются идентичными благодаря включению в некоторые из них вариантных форм гистонов и внесения различных модификаций в N-концевые домены гистонов, которые выходят за пределы нуклеосомной глобулы.

• Намотанные на нуклеосомную глобулу супервитки ДНК называют компенсированными, потому что они не могут быть релаксированы при обработке ДНК, организованной в нуклеосомы, топоизомеразами.

1.4. НУКЛЕОСОМНАЯ ФИБРИЛЛА 30-НМ

При участии гистона Н1 организованная в нуклеосомы ДНК образует фибриллу диаметром 30-нм. Такие фибриллы образуются спонтанно из структур типа «бусинок на нити» при повышении ионной силы (до 60 мМ) либо при добавлении ионов Mg²⁺ до 0,3 мМ. Существуют две принципиально различающиеся модели 30-нм фибриллы (рис. 3). Согласно одной из этих моделей, нуклеосомная нить, содержащая гистон Н1, сворачивается в соленоид диаметром 30-нм, в одном витке которого (с шагом в 11 нм) содержится 6 нуклеосом. Данная модель, предложенная Финчем и Клюгом, базируется на результатах электронной микроскопии и анализа дифракции рентгеновских лучей при изучении частично ориентированных хроматиновых фибрилл. Согласно данной модели, спейсерная ДНК продолжает суперспираль, возникающую при закручивании ДНК на нуклеосомной глобуле. Другая модель предполагает, что в составе 30-нм фибриллы нуклеосомы организованы в зигзагообразную структуру, параметры которой могут варьировать в известных пределах. Зигзагообразная модель

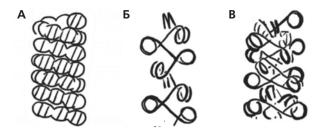


Рис. 3. Схемы моделей 30-нм фибриллы

Показаны наиболее распростаненные модели — соленоида (A) и «зиг-зага» (Б и В). Видно, что в модели зиг-зага линкерная ДНК пересекает центральную часть фибриллы, тогда как в соленоиде и нуклеосомы, и линкерная ДНК продолжают спираль соленоида. Модель «зиг-заг» допускает локальные изменения уровня компактизации при сохранении толщины фибриллы (ср. Б и В).

предполагает, что спейсерная ДНК пересекает ось фибриллы. Результаты последних исследований, в том числе электронная микроскопия быстро замороженных образцов хроматина и анализ продуктов расшепления ядерной ДНК в живых клетках, подвергнутых мягкой обработке ионизирующим излучением, подтверждают зигзагообразную модель организации 30-нм фибриллы. Зигзагообразная фибрилла является существенно более динамичной, чем соленоил. Толщина этой фибриллы, отражающая плотность упаковки нуклеосом, может варьировать при сохранении основного принципа зигзагообразной организации. В модельном эксперименте обратимые изменения толщины зигзагообразной нуклеосомной фибриллы при изменении ионной силы или концентрации ионов магния можно наблюдать с помощью атомной силовой микроскопии. Динамичность 30-нм фибриллы хорошо укладывается в современные представления об активной роли хроматина в регуляции работы генома.

Существуют экспериментальные подходы, позволяющие получить олигонуклеосомные фрагменты, в которых позиции всех нуклеосом являются строго детерминированными. Для этого нуклеосомы обирают *in vitro* на фрагментах ДНК, которые содержат регулярно повторяющиеся последовательности, являющиеся предпочтительными для посадки гистонового октамера. Полученные таким образом олигонуклеосомы могут быть закристаллизованы. Недавно был проведен рентгеноструктурный анализ тетрануклеосомного комплекса. Хотя структура комплекса была разрешена с невысокой точностью (9 Å), полученные данные позволили с уверенностью сказать, что пространственное расположение нуклеосомных глобул в составе комплекса соответствует зигзагообразной модели организации 30-нм хроматиновой фибриллы. Следует отметить, что кристализацию тетрануклеосомного комплекса проводили без гистона Н1 при высокой концентрации ионов магния. Считается, что в физиологических условиях Н1 стабилизирует 30-нм фибриллу, не изменяя существенным образом характер упаковки нуклеосомных глобул.

Соленоидная структура, по-видимому, является более стабильной термодинамически и потому легко формируетс

клетках.

Какова бы ни была структура 30-нм хроматиновой фибриллы, существуют убедительные данные, показывающие, что для обеспечения компактной упаковки нуклеосомных глобул важны вза-

имодействия с соседними глобулами. Особенно важным для формирования 30 фибриллы является взаимодействие семи экспонированных на поверхности нуклеосомы отрицательно заряженных аминокислотных остатков (большая часть из которых принадлежит молекуле гистона H2A) с N-концевым доменом (аминокислотные остатки 16–25) гистона H4 соседней нуклеосомы. Способность к формированию 30-нм фибриллы может существенным образом к формированию 30-нм фиориллы может существенным ооразом изменяться посредством различных модификаций этих доменов. Наибольший эффект имеет ацетилирование Н4 по позиции К16; эта модификация полностью препятствует образованию 30-нм фибриллы. Олигонуклеосомные фрагменты, собранные с использованием гистона Н2А. Z вместо гистона Н2А, характеризуются повышенной склонностью к образованию 30-нм фибриллы. Повидимому, это связано с тем, что в таких нуклеосомах экспонированный на поверхности глобулы отрицательно заряженный домен имеет больший размер, чем в нуклеосомах, построенных из канонических форм гистонов. Другой вариант гистона Н2А — H2A.Bbd — характеризуется отсутствием аминокислотных остатн2А.вод — характеризуется отсутствием аминокислотных остатков, участвующих в формировании отрицательно заряженного кластера на поверхности нуклеосомной глобулы. Показано, что олигонуклеосомы, собранные с использованием гистона H2A.Bbd, не способны к формированию 30-нм фибриллы. Это свойство может иметь прямое отношение к функциям H2A.Bbd, который является компонентом активного хроматина.

- 30-нм фибрилла может быть получена из структуры типа «бусинок на нити» при повышении ионной силы или концентрации ионов магния. Эта фибрилла соответствует второму уровню упаковки ДНК в ядре.
- 30-нм фибрилла является динамичной структурой, параметры и сам способ организации которой зависят от внешних условий. В клеточном ядре нуклеосомы в составе 30-нм фибрилл уложены в виде зиг-зага, причем спейсерная ДНК пересекает ось фибриллы.
- Наиболее стабильной формой 30-нм фибриллы *in vitro* является соленоид, в одном витке которого (с шагом в 11 нм) содержится 6 нуклеосом, а спейсерная ДНК продолжает суперспираль, возникающую при закручивании ДНК на нуклеосомной глобуле.

- Для упаковки ДНК в 30-нм фибриллу существенны взаимодействия между соседними нуклеосомными глобулами.
- Гистон H1 стабилизирует 30-нм фибриллу, но не определяет ее архитектуру.

1.5. РАСПОЛОЖЕНИЕ НУКЛЕОСОМ НА МОЛЕКУЛЕ ДНК

В большинстве случаев нуклеосомы располагаются на молекуле ДНК случайным образом с сохранением стандартного размера спейсерных фрагментов. В ряде районов генома наблюдается, однако, фиксированное расположение нуклеосом на определенных нуклеотидных последовательностях (так называемый фэйзинг). В качестве примера можно указать промотор вируса ММТV, участок начала репликации вируса SV-40, β^{major}-глобиновый ген мыши, α-сателлитную ДНК африканской зеленой мартышки. Регулярное расположение нуклеосом, как правило, возникает в результате наличия в определенном районе генома того или иного барьера для распространения нуклеосом либо последовательности ДНК, на которой нуклеосома располагается с гораздо большим предпочтением, чем на окружающих последовательностях. Предпочтительными для расположения нуклеосом являются перманентно изогнутые последовательности ДНК, накручивание которых на нуклеосомы является более выгодным с энергетической точки зрения. Такими свойствами обладают, в частности, последовательности Такими свойствами обладают, в частности, последовательности ДНК с фазировано расположенными (на расстоянии 10 п. н., соответствующем одному витку двойной спирали) блоками из двух или трех АТ-пар. С использованием метода селекции *in vitro* было подобрано несколько последовательностей ДНК, которые являются существенно более предпочтительными местами посадки нуклеосом, чем любая из последовательностей ДНК, присутствующих в геноме мыши. Это означает, что наиболее сильные сайты посадки нуклеосом препятствуют нормальному фукционированию генома и удаляются в процессе эволюции.

генома и удаляются в процессе эволюции. Барьером для распространения нуклеосом могут служить места связывания специфичных в отношении последовательности ДНК белковых факторов. Если по тем или иным причинам хотя бы одна нуклеосома занимает фиксированную позицию на определенной последовательности ДНК, соседние нуклеосомы будут также предпочтительно располагаться на определенных последовательностях

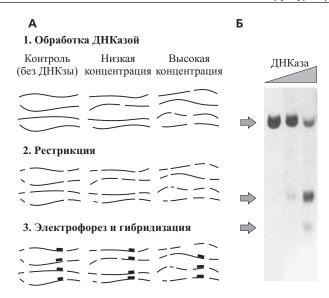


Рис. 4. Метод непрямого мечения концов

(А) Основные этапы процедуры. Пермеабилизованные клетки обрабатывают ДНКазой, выделяют ДНК и расщепляют рестриктазами. Препараты ДНК разделяют электрофорезом, переносят на мембрану и гибридизуют с пробой, прилежащей к краю рестриктного фрагмента. (Б) Результаты электрофоретическго разделения фрагментов, которые визуализируются данной пробой. Стрелками отмечены (сверху вниз): полноразмерный рестриктный фрагмент, субфрагмент, возникающий при расщеплении по сильному гиперчувствительному к ДНКазе сайту, и субфрагмент, возникающий при расщеплении по более слабому гиперчувствительному сайту.

ДНК просто в силу того, что расстояния между нуклеосомами (длина спейсерной ДНК) являются относительно постоянными. По мере удаления от нуклеосомы, занимающей фиксированную позицию, регулярность в расположении нуклеосом относительно последовательности ДНК будет постепенно утрачиваться. Посадка нуклеосом на определенные последовательности ДНК часто делает эти последовательности недоступными для взаимодействия с другими ДНК-связывающими белками и может играть важную роль в регуляции активности генов.

В геномной ДНК существуют участки, свободные от нуклеосом. В подавляющем большинстве случаев это участки связы-

вания одного или нескольких регуляторных белков, узнающих определенные последовательности ДНК. Свободные от нуклеосом участки предпочтительно атакуются ДНКазой I и некоторыми другими нуклеазами при обработке ими пермеабилизированных клеток или изолированных ядер. В связи с этим они получили название участков гиперчувствительности к ДНКазе I или гиперчувствительных сайтов (hypersensitive sites, HS-сайты). Вероятность расщепления в этих сайтах организованной в хроматин ДНК может превосходить среднестатистическую в сотни и даже тысячи раз. Для картирования позиций гиперчувствительных сайтов в геномной ДНК используют метод непрямого мечения концов рестриктных фрагментов ДНК (рис. 4). Гиперчувствительные к ДНКазе I сайты, как правило, колокализуются с регуляторными последовательностями (промоторами, энхансерами, инсуляторами, участками начала репликации ДНК и т. д.). Именно в границах регуляторных элементов генома присутствует большое количество участков связывания узнающих определенные последовательности ДНК белков, в том числе транскрипционных факторов. В зависимости от типа белковых факторов, связывание которых с ДНК препятствует посадке нуклеосом, участки гиперчувствительности к ДНКазе I могут быть тканеспецифичными и перманентными (т. е. присутствующими в клетках, дифференцированных по разным путям).
Свободными от нуклеосом и, следовательно, гиперчувстви-

Свободными от нуклеосом и, следовательно, гиперчувствительными к ДНКазе I могут быть не только участки связывания транскрипционных факторов и других регуляторных белков. Некоторые последовательности ДНК не способны наматываться на нуклеосомные глобулы. Это последовательности, обладающие пониженной гибкостью, и последовательности, склонные к образованию неканонических структур, например шпилек. Такие последовательности ДНК также являются образующими элементами участков гиперчувствительности к ДНКазе I. В качестве примера последовательностей ДНК, неудобных для формирования нуклеосом, можно указать АТ-гомополимеры, которые часто находятся в промоторных областях постоянно экспрессирующихся генов.

• В большинстве случаев нуклеосомы располагаются на ДНК случайным образом с сохранением постоянного расстояния между нуклеосомами. Обычно это расстояние («spacing») составляет 200 п. н.

- В некоторых участках генома расположение нуклеосом на ДНК является фазированным, т. е. определенные последовательности всегда (во всех клетках) намотаны на нуклеосомные глобулы, тогда как соседние последовательности всегда находятся в составе межнуклеосомных спейсеров.
- Существуют последовательности ДНК, являющиеся предпочтительными для посадки нуклеосом и последовательности ДНК, на которые посадка нуклеосом крайне затруднена.
- В геноме существуют свободные от нуклеосом участки. Эти участки предпочтительно расщепляются ДНКазой I и называются участками гиперчувствительности к ДНКазе I.

1.6. КОМПЛЕКСЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА

Статичная организация геномной ДНК в нуклеосомы и далее в 30-нм фибриллу накладывает существенные ограничения на доступность участков узнавания различных регуляторных белков. Кроме того, в результате наматывания ДНК на нуклеосому сайты связывания ряда белков могут оказаться ориентированными таким образом, что узнающие их белки не смогут взаимодействовать друг с другом. Наконец, достаточно стабильные нуклеосомные частицы должны *а priori* существенно затруднять осуществление репликации и транскрипции ДНК.

Проблемы, которые нуклеосомная организация создает для осуществления различных функциональных процессов, преодолеваются с привлечением ферментов (ферментных комплексов) ремоделирования хроматина. Комплексы ремоделирования хроматина используют для своей работы энергию АТФ. Различные комплексы ремоделирования хроматина могут выполнять следующие задачи: (1) перемещение нуклеосом вдоль молекулы ДНК и размещение нуклеосомных глобул на равных расстояниях друг от друга; (2) частичная декомпактизация нуклеосом, сопряженная с изменением спектра контактов ДНК и гистонов; (3) перемещение нуклеосомных глобул с одной молекулы ДНК на другую; (4) замена канонических гистонов на вариантные формы. Большинство известных комплексов ремоделирования хроматина состоят из нескольких субъединиц, наиболее важной из которых является субъединица, обладающая АТФазной активностью. Другие субъединицы, входящие в состав комплексов ремоделирования

хроматина, служат для привлечения этих комплексов к тем или иным областям хромосом (иными словами, для выбора мишеней ремоделирования). По типу АТФазной субъединицы все известные ремоделирования). По типу АТФазнои суоъединицы все известные комплексы ремоделирования хроматина можно разделить на четыре большие группы: SWI/SNF, ISWI, CHD и INO80. Прототипом первой из этих групп является SWI2/SNF2-комплекс дрожжей Sacharomyces cerevisiae. Этот комплекс был впервые описан как регулятор типа спаривания. Отсюда происходит его название: SWI — switching. Одновременно было показано, что тот же комплекс необходим для роста дрожжей на средах, не содержащих сахарозы (SNF — sucrose non-fermenting). Комплекс SWI2/SNF2 состоит из десяти или более субъединиц, одна из которых (Swi2/Snf2) обладает АТФазной активностью. Аналогичные комплексы обобладает АТФазной активностью. Аналогичные комплексы обнаружены и у высших эукариот. У дрозофилы это комплексы ВАР (Brahma associated protein) и PBAP (polybromo-associated BAP), в обоих комплексах присутствует АТФазная субъединица Вrahma. У человека SWI2/SNF2-подобными комплексами являются ВАF (Brg/hBrm-associated factors, АТФазная субъединица Brg1 или hBrm) и PBAF (polybromo-associated BAF, АТФазная субъединица BRG1). Наряду с SWI2/SNF2 у дрожжей имеется близкородственный комплекс ремоделирования хроматина RSC, активной субъединицей которого является Sth1. Характерной особенностью Swi2/Snf2 АТФазы и ее гомологов является наличие в их составе бромодомена, который обеспечивает привлечение соответствующих комплексов ремоделирования хроматина к нуклеосомам, содержащим ацетилированные гисхроматина к нуклеосомам, содержащим ацетилированные гистоны, прежде всего Н3, ацетилированный по К9. В то же время тоны, прежде всего H3, ацетилированный по K9. В то же время следует отметить, что специфичность связывания с хроматином различных SWI/SNF комплексов может определяться набором дополнительных субъединиц. В состав ВАF и PBAF комплексов человека часто входят различные тканеспецифичные субъединицы, которые могут узнавать самые различные модификации гистонов, включая сайт-специфическое метилирование. SWI2/SNF2 и аналогичные комплексы высших эукариот дестабилизируют нуклеосомы, нарушая контакты гистонов с ДНК, и стимулируют локальное перемещение нуклеосом («слайдинг»). Для осуществления этих реакций используется энергия АТФ. В модельных экспериментах при высоких соотношениях фермент–ДНК Swi2/Snf2 может также осуществлять перенос нуклеосом на другую (свободную от нуклеосом) молекулу ДНК. В отсутствие ATФ Swi2/Snf2 может связываться с ДНК и нуклеосомами и вызывать образование петель как на свободной ДНК, так и на

нуклеосомной фибрилле. SWI2/SNF2 нужен для активации определенной (достаточно небольшой) группы промоторов у дрожжей. В качестве примера можно указать промотор PHO8. По-видимому, локальное перемещение нуклеосом необходимо для того, чтобы сделать доступными некие участки связывания транскрипционных факторов, существенные для активации этого промотора. Мутация, нарушающая функции Swi2/Snf2 ATФазы, не является летальной. Как уже говорилось, наряду с SWI2/SNF2 в дрожжевых клетках присутствует ферментный комплекс RSC, который обладает весьма сходным спектром активностей, но имеет более широкий ряд функций. Мутация по гену, кодирующему входящую в состав RSC ATФазу Sth1, является летальной.

АТФазу Sth1, является летальной.

Прототипом второй группы ферментных комплексов, ремоделирующих хроматин, является комплекс NURF (nucleosome remodeling factor) дрозофилы. Комплекс NURF вызывает зависящее от гидролиза АТФ перемещение нуклеосом, не вызывая при этом их видимой дестабилизации. В отличие от SWI2/SNF2, NURF не может перемещать нуклеосомы с одной цепи ДНК на другую. NURF состоит из 4 полипептидных цепей с молекулярными массами 215, 140, 55 и 38 кДа. АТФазной активностью обладает субъединица с молекулярной массой 140 кДа. Эта АТФазная субъединица, имеющая собственное название «ISWI» (imitation switch), входит в состав целого ряда различных ферментных комплексов, ремоделирующих хроматин и участвующих в сборке нуклеосом. В качестве примера можно указать белковые комплексы СНRAC и АСF дрозофилы, а также ISW1a и ISW1b комплексы дрожжей. Ферменты, в состав которых входит ISW1-субъединица, в частности NURF, взаимодействуют с экспонированными «хвостами» гистонов. Соответственно, модификации N-концевых доменов могут определенным образом модулировать активность этой группы ферментов. АТФазная активность ISWI стимулируется нуклеосомами, но не чистой ДНК, тогда как АТФазная активность Swi2/Snf2 в равной мере стимулируется как чистой ДНК, так и ДНК, организованной в нуклеосомы.

Прототипом третьей группы факторов ремоделирования хроматина является CHD-1 (chromodomain helicase DNA binding protein) дрожжей *S. cerevisae*. В составе ATФазной субъдиницы (Chd1) этого комплекса ремоделирования присутствует два хромодомена, которые обеспечивают связывание комплекса с метилированными гистонами. Наиболее хорошо изученным представителем CHD группы факторов ремоделирования хроматина является комплекс NURD (nucleosome remodelling and deacetylation). В составе этого

комплекса наряду с АТФазной субъединицей (Chd3/Chd4, другое название — Mi-2) присутствуют гистондезацетилазы (HDAC1 и HDAC2). NURD играет важную роль в организации неактивных хроматиновых доменов. Подобно ISWI, Mi-2 мобилизует нуклеосомы, но не может переносить их на другую молекулу ДНК. В экспериментах *in vitro* с мононуклеосомами, собранными на коротких фрагментах ДНК, было продемонстрировано, что ISWI перемещает нуклеосомную глобулу от центра фрагмента к его краям, тогда как Mi-2 осуществляет прямо противоположное перемещение нуклеосомной глобулы (от краев фрагмента к его центру).

сомной глобулы (от краев фрагмента к его центру).

АТФазная субъединица четвертой группы факторов ремоделирования хроматина имеет активный центр, состоящий из двух доменов, разделенных протяженным спейсерным участком. К этой группе относятся дрожжевые комплексы ремоделирования хроматина INO80 и SWR1 и человеческий аналог INO80 — hINO80. Помимо АТФазной активности, в составе комплекса INO80 присутствует 3′—5′-хеликазная активность. Показано, что комплекс INO80 участвует в различных процессах, в том числе в процессе репарации двунитевых разрывов ДНК. Отличительной особенностью Swr1 АТФазы является ее способность осуществлять замену димера H2A-H2B на димер, содержащий вариантный гистон H2A.Z (у дрожжей этот гистон называется Htz).

Механизм работы факторов ремоделирования хроматина в настоящий момент не вполне понятен. Продемонстрировано, что АТФазы всех четырех перечисленных выше групп способны генерировать негативные супервитки в ДНК, что само по себе может привести к мобилизации нуклеосомных глобул. Это, возможно, имеет вспомогательное значение при работе факторов ремоделирования хроматина. Сам процесс перемещения нуклеосомной глобулы вдоль ДНК, по-видимому, осуществляется при посредстве конформационных изменений активной субъединицы, которые происходят в связи с гидролизом АТФ. Наиболее простая модель (рис. 5) предполагает, что фермент жестко связывается с двумя участками ДНК, один из которых находится на некотором расстоянии от нуклеосомы, а другой на таком же расстоянии после начала 147 п. н. фрагмента ДНК, намотанного на нуклеосомную глобулу. Изгибание фермента приводит к отрыву от нуклеосомной глобулы фрагмента ДНК, находящегося между связанными участками, и закреплению на глобуле того участка связывания ДНК, который находился перед глобулой. Последующее волнообразное перемещение возникшей петли ДНК

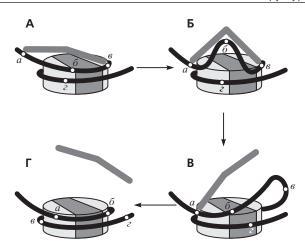


Рис. 5. Ремоделирование хроматина

На рисунке схематически изображен процесс ремоделирования. Сначала комплекс ремоделирования связывается с участками ДНК a и a (A); изменение конформации комплекса приводит к изгибанию ДНК, отрыву участка b и связыванию участка a (Б), после чего комплекс ремоделирования отсоединяется от участка b и возвращается в исходную конформацию, а волна деформации ДНК продвигается по октамеру гистонов (B). В итоге нуклеосома оказывается смещена на ДНК на расстояние a-b, при этом участок b переместился из нуклеосомной ДНК в линкерную, а участок b, напротив, связался октамером (b).

вдоль нуклеосомной глобулы приведет к перемещению глобулы на новую позицию. Другая, более сложная, модель предполагает, что фермент закрепляется на нуклеосомной глобуле в области центра симметрии и «протягивает» ДНК через глобулу. Перемещение ДНК и в этом случае должно быть следствием изменения конформации фермента, который связан с двумя отстоящими друг от друга участками ДНК. Обе модели предсказывают, что перемещение нуклеосомных глобул факторами ремоделирования хроматина должно иметь ступенчатый характер. Это предсказание подвержено экспериментально: размер шага составляет около 50 п. н. для SWI/SNF и около 10 п. н. для других комплексов ремоделирования. Понятно, что процесс перемещения нуклеосом является достаточно энергоемким. Нетрудно подсчитать, что для перемещения нуклеосомной глобулы на 200 п. н. большинству факторов ремоделирования необходимо будет гидролизовать 20 молекул АТФ.

- Комплексы ремоделирования хроматина способны дестабилизировать нуклеосомные глобулы и перемещать их вдоль молекулы ДНК, затрачивая при этом энергию АТФ.
- Большинство комплексов ремоделирования хроматина состоит из нескольких субъединиц, из которых наиболее важной является субъединица, обладающая АТФазной активностью.
- Перемещение нуклеосом факторами ремоделирования хроматина имеет ступенчатый характер. Большинство известных комплексов ремоделирования хроматина затрачивает одну молекулу АТФ для перемещения нуклеосомной глобулы на 10 п. н.

1.7. ВЫСШИЕ УРОВНИ УПАКОВКИ ДНК

Вопрос о высших уровнях упаковки ДНК в ядре остается дискуссионным. Некоторые авторы считают, что 30-нм фибрилла образует малоупорядоченные конгломераты в результате латерального взаимодействия отдельных фибрилл. При этом могут формироватся структуры типа жгута из многих нитей. Другой точкой зрения является представление об иерархической спирали, согласно которому 30-нм фибрилла — соленоид, и каждый последующий уровень представлен соленоидной укладкой фибриллы предыдущего уровня. Наиболее обоснованной является, однако, радиально-петлевая модель организации хромосомы в интерфазе и метафазе. Согласно этой модели, 30-нм фибрилла образует гигантские петли, закрепленные на белковом каркасе хромосомы. Последний называют хромосомным остовом. В интерфазном ядре хромосомный остов составляет часть ядерного матрикса. Ядерным матриксом называют скелетную структуру клеточного ядра, которая сохраняет форму и некоторые особенности морфологии ядра после удаления из него хроматина. Ядерный матрикс можно получить после обработки изолированных ядер нуклеазами и экстракции гистонов 2M раствором NaCl. В составе ядерного матрикса присутствует ядерная ламина (внешняя белковая оболочка ядра), остаточное ядрышко и соединяющая их сеть филаментов и гранул (так называемый диффузный матрикс) (рис. 6). Можно экстрагировать из ядер гистоны, не разрушая ДНК. Эта процедура позволяет получить так называемые нуклеоиды, в составе которых организованная в петли ДНК остается связанной с ядерным

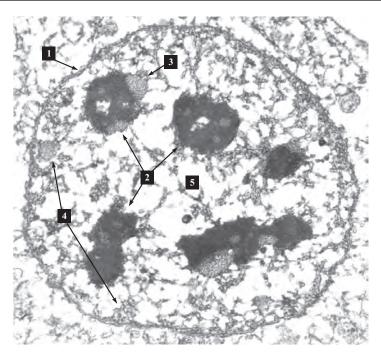


Рис. 6. Ядерный матрикс

На микрофотографии видны: 1 — внешняя белковая оболочка ядра, выстилающая внутреннюю ядерную мембрану — ламина, 2 — остаточное ядрышко, 3 — матрикс приядрышкового и 4 — периферийного гетерохроматина, 5 — диффузный матрикс.

Фотография любезно предоставлена Е. В. Шевалем, МГУ имени М.В. Ломоносова

матриксом. Существенной особенностью участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу является то, что они ограничивают свободу вращения концов ДНК. В силу этого связанные с ядерным матриксом петли ДНК представляют собой обособленные топологические домены. Это было продемонстрировано анализом седиментационных характеристик нуклеоидов при их центрифугировании в градиентах концентрации сахарозы в присутствии разных концентраций бромида этидия. После удаления нуклеосомных глобул связанные на поверхности глобул супервитки ДНК освобождаются, в результате чего петли ДНК оказываются отрицательно суперспирализованы, благодаря чему нуклеоиды являются относительно компактными и имеют достаточно высокий коэффицент седиментации. Бромид этидия интеркалирует

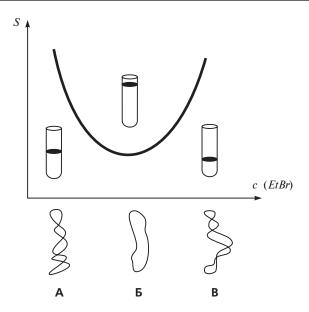


Рис. 7. Титрование нуклеоидов бромистым этидием

Нуклеоиды обрабатывают возрастающими концентрациями бромида этидия и определяют коэффициент седиментации посредством центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы. Чем более сверхспирализованы петли ДНК, тем менее они развернуты, тем «плотнее» нуклеоиды и, как следствие, больше коэффициент седиментации. Соответственно, слой нуклеоидов оказывается ближе к дну центрифужной пробирки. Для сравнения на рисунке показаны примерные конфигурации плазмид при соответствующих концентрациях бромида этидия. Интеркаляция бромида этидия в сверхспирализованную ДНК (А) сначала нейтрализует отрицательную сверхспирализацию (Б), а затем генерирует положительную (В).

в ДНК, и это приводит к ее частичному разворачиванию. По мере повышения концентрации бромида этидия разворачивание двойной спирали ДНК полностью компенсирует суперспирализацию. Петли ДНК оказываются релаксированными. Это делает нуклеоид менее компактным, его коэффицент седиментации уменьшается. При дальнейшем повышении концентрации бромида этидия продолжающийся процесс разворачивания двойной спирали ДНК приведет к образованию положительных супервитков. Нуклеоид опять станет более компактным, и его коэффицент седиментации начнет возрастать. Иными словами, при титровании бромидом этидия седиментационные характеристики нуклеоида изменя-

ются так же, как седиментационные характеристики ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (рис. 7). Это и позволяет говорить о том, что петли ДНК представляют собой обособленные топологические домены. Суперспирализация ДНК в рамках обособленного топологического домена утрачивается после внесения единичного разрыва в одну из цепей ДНК. Обрабатывая нуклеоиды возрастающими концентрациями ДНКазы I, можно внести в среднем по одному разрыву на петлю ДНК. При этом будет обеспечена полная релаксация петель ДНК, о чем можно судить по достижению минимального седиментационного коэффицента. В этой ситуации среднее расстояние между разрывами, которое можно установить, определив средний размер фрагментов однонитевой ДНК, будет равно двухкратной длине петли ДНК. В клетках человека размеры закрепленных на ядерном матриксе петель ДНК, установленные

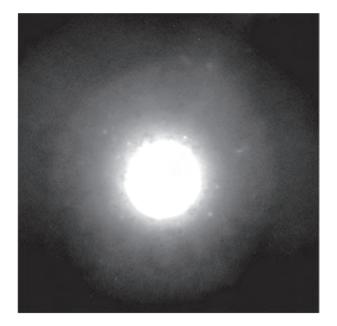


Рис. 8. Ядерное гало

Показан окрашенный DAPI (флуоресцентный краситель, специфически связывающийся с ДНК) препарат пермеабилизированных неионным детергентом клеток, экстрагированных высокосолевым раствором (2M NaCl). Видны остаточное ядро и «корона» — ядерное гало. Гало представляет собой плотную корону развернутых в отсутствие гистонов петель ДНК (см. рис. IV на цветной вклейке).

с помощью описанного выше и ряда других экспериментальных подходов, составляют в среднем 50–150 т. п. н. Нетрудно подсчитать, что организация 30-нм хроматиновой фибриллы в петли обеспечивает финальное сокращение линейных размеров ДНК (учитывая все предыдущие уровни) примерно в 850 раз.

Развернутые петли ДНК, получающиеся после экстракции гистонов, можно увидеть при электронной микроскопии экстрагированных 2 М NaCl метафазных хромосом и интерфазных ядер (рис. IV на цветной вклейке). Впервые такие изображения были получены Лэммли и соавторами для метафазных хромосом и Хэнкоком и соавторами для интерфазных ядер.

и соавторами для метафазных хромосом и Хэнкоком и соавторами для интерфазных ядер.

При анализе с использованием светового флуоресцентного микроскопа экстрагированных 2 М NaCl ядер можно видеть корону петель ДНК, окружающую остаточное ядро (ядерный матрикс). Такие структуры, представляющие собой распластанные на поверхности стекла нуклеоиды, получили названия ядерных гало (рис. 8). В течение многих лет предметом обсуждения оставался вопрос о том, является организация ДНК в петли специфической или случайной. В настоящее время существуют убедительные свидетельства того, что эта организация является специфической по крайней мере для каждого конкретного типа, например в эритробластах человека, одни и те же участки генома прикреплены к ядерному матриксу, разделяя геномную ДНК на петли. Современные методы флуоресцентной *in situ* гибридизации (fluorescent in situ hybridization, FISH) позволяют выявить индивидуальные петли ДНК в составе ядерных гало (рис. 9).

Участки прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу можно картировать с использованием метода вырезания петель ДНК-топоизомераза II ядерного матрикса. ДНК-топоизомераза II ядерного матрикса. ДНК-топоизомераза II ядерного матрикса. ДНК-топоизомераза II ядерного матрикса остается орнмента находится в ядерном матриксе, хотя конкретная функция ДНК-топоизомеразы II в составе ядерного матрикса остается неясной. ДНК-топоизомераза II вносит двунитевые разрывы в ДНК, которые после снятия топологических напряжений либо разделения катенанов зашиваются (лигируются) тем же ферментом. На протяжении всей реакции фермент, состоящий из двух субъединиц, остается связанным с ДНК.

Существует целый ряд ингибиторов ДНК-топоизомеразы II, которые останавливают реакцию на стадии промежуточного ком-

Существует целый ряд ингибиторов ДНК-топоизомеразы II, которые останавливают реакцию на стадии промежуточного комплекса фермент–ДНК. При этом каждая из субъединиц фермента

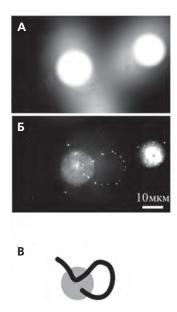


Рис. 9. Индивидуальные петли хроматина

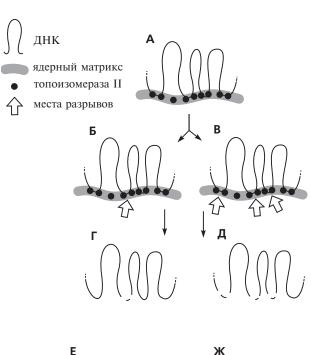
Клонированная ДНК индивидуальных доменов генома выделена, фрагментирована до размера в несколько сот пар нуклеотидов и помечена флуоресцентным красителем. Затем такие пробы прогибридизованы с препаратами ядерных гало (см. рис. 8) в присутствии избытка немеченой тотальной ДНК, чтобы подавить гибридизацию пробы с повторяющимися последовательностями. (А) окрашивание препаратов DAPI, выявляющее всю ДНК — остаточные ядра и ядерные гало; (Б) результаты гибридизации с пробой, выявляющей индивидуальную петлю ДНК (за счет неспецифического свяывания выявляют также и остаточные ядра); (В) абрис выявленной петли ДНК.

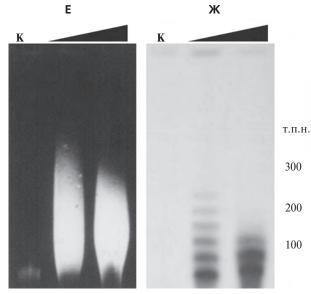
остается ковалентно связанной с 5'-концом разорванной цепи ДНК. Если такие блокированные комплексы обработать денатурирующим агентом, после чего разрушить фермент, то получится препарат ДНК, разрезанный на фрагменты в местах контакта ДНК с ферментом. Если бы топоизомераза II находилась только в ядерном матриксе, то простая обработка живых клеток упомянутыми выше ингибиторами разрезала бы весь геном по участкам прикрепления ДНК к ядерному матриксу. Однако задача осложняется тем, что этот фермент в растворимой форме присутствует в нуклеоплазме и может вносить разрывы в любом месте (если окажется рядом с ДНК в момент обработки клеток ингибитором). Наибо-

лее вероятными точками разрывов будут свободные от нуклеосом участки (участки гиперчувствительности к ДНКазе I). С тем чтобы исключить возможность внесения разрывов вне участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу, ингибиторами ДНК-топоизомеразы II обрабатывают нуклеоиды, из которых экстрагированы как гистоны, так и растворимая фракция ДНК-топоизомеразы II. Это позволяет разрезать геном на отдельные петли ДНК (рис. 10). Для установления позиций участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу на физической карте изучаемой области генома (т. е. позиций разрывов, внесенных в ДНК-топоизомеразой II ядерного матрикса) используется метод непрямого мечения концов фрагментов ДНК, который был описан в разд. 1.5.

ному матриксу на физической карте изучаемой области генома (т. е. позиций разрывов, внесенных в ДНК-топоизомеразой II ядерного матрикса) используется метод непрямого мечения концов фрагментов ДНК, который был описан в разд. 1.5.

Протяженность участков прикрепления может существенно варьировать в разных частях генома, достигая в отдельных случаях размеров, сопоставимых с длиной петель ДНК. Участки прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу включают сложный комплекс функциональных элементов и специальных последовательностей ДНК, необходимых для «заякоривания» петель на элементах хромосомного остова. Наиболее важными функциональными элементами, локализованными в основаниях петель ДНК, являются участки начала репликации. Таким образом, существует прямая зависимость между организацией геномной ДНК, необходимые для «заякоривания» петель на белковом остове хромосомы, изучены еще недостаточно. Известно лишь, что в этом процессе могут принимать участие так называемые МАК (SAR, S/MAR) элементы. Эти элементы представляют собой последовательности ДНК, специфически связывающиеся с ядерным матриксом (хромосомным остовом) *in vitro*. Для обнаружения МАR-элементов смесь фрагментов клонированной ДНК инкубируют с изолированным ядерным матриксом в растворе с физиологической ионной силой в присутствии избытка неспецифического конкурента (фрагментированной бактериальной ДНК). МAR-элементы специфически связываются с ядерным матриксом и остаются в составе комплекса после нескольких отмывок. Следует подчеркнуть, что этот эксперимент нельзя рассматривать как самосборку участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу. Как уже говорилось выше, последние не разрушаются при экстракции ядер 2 М раствором NaCl, в то время как комплекс МAR-элементов с изолированным ядерным матриксом разрушается при экстракции раствором NaCl с существенно более низкой (0,5 M) ментов с изолированным ядерным матриксом разрушается при экстракции раствором NaCl с существенно более низкой (0,5 M)





концентрацией. В геномной ДНК MAR-элементы часто колокализуются с различными регуляторными последовательностями. Однако они были обнаружены и внутри генов, в том числе и в экзонах.

- В составе хромосом 30-нм хроматиновая фибрилла организована в 50–150 т. п. н. петли, закрепленные на ядерном матриксе.
- Участки (области) прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу имеют фиксированные специфические позиции на молекуле ДНК.
- Прикрепленные к ядерному матриксу петли ДНК представляют собой замкнутые топологические домены.
- После удаления из ядер гистонов индивидуальные петли ДНК можно увидеть под микроскопом с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ*.
- В образовании участков прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу важную роль играют MAR-элементы (геномные элементы, которые специфически связываются с изолированным ядерным матриксом при инкубации *in vitro*).

◀ Рис. 10. Картирование границ петельных доменов хроматина

Препараты клеток, ядер или нуклеоидов обрабатывают ингибитором топоизомеразы II. При этом топоизомераза II, расположенная преимущественно в ядерном матриксе (А) и составляющая до 50% белкового компонента матрикса, превращается в эндонуклеазу и расщепляет геномную ДНК в местах закрепления петельных доменов на матриксе (Б, В). В зависимости от концентрации ингибитора меньшая или большая часть молекул топоизомеразы II расщепляет ДНК, тем самым образуя либо олигомеры петель (Б), либо индивидуальные петли (В). Препараты затем депротеинизируют (Г, Д) и анализируют электрофорезом в пульсирующем поле (Е) и саузерн-гибридизацией (Ж). Показаны результаты такого эксперимента для тандемных повторов генов рРНК (К — контрольный образец, не обработанный ингибитором топоизомеразы II, сверху схематически показано увеличение концентрации ингибитора; справа приведены маркеры молекулярных весов в килобазах). Каждый повтор представлен индивидуальным петельным доменом. Видно, что по мере увеличения количества ингибитора пик распределения смещается в сторону более коротких фрагментов (Е, окраска ДНК бромидом этидия), а олигомеры петель сменяются преимущественно мономерами (Ж, гибридизация с пробой, представляющей фрагмент гена 18S рРНК).

1.8. ХРОМОСОМНЫЕ ТЕРРИТОРИИ

Еще во времена становления классической генетики метафазные хромосомы рассматривались в качестве носителей генетической информации. Было, однако, совершенно неясно, что происходит с индивидуальными хромосомами после завершения митоза. Простая окраска ядра красителями, выявляющими ДНК (например, DAPI), не давала никаких ключей к ответу на этот вопрос. При такой окраске можно видеть, что ДНК более или менее равномерно распределяется по всему ядру и что существуют некие компактные участки (гетерохроматиновые области), которые окрашиваются ярче, чем основная масса ДНК. Соответственно, можно было полагать, что хромосомы претерпевают существенную декомпактизацию, так что ДНК каждой хромосомы распределяется по всему ядру. Первые указания на то, что это не соответствует действительному положению вещей, были получены в лаборатории Т. Кремера. Было продемонстрировано, что при локальном облучении ядра лазером повреждаются не все хромосомы, видимые в следующей метафазе. Современные представления о распределении интерфазных хромосом в ядре базируются на результатах гибридизации *in situ* с наборами проб, полученных из индивидуальных метафазных хромосом. Для получения таких проб препараты метафазных хромосом разделяют на проточном флуориметре, после чего препарат уже индивидуальной хромосомы дробят ультразвуком на короткие фрагменты. Эти фрагменты лигируют с универсальными олигонуклеотидными адапторами и амплифицируют. При этом в смеси для ПЦР присутствуют меченные тем или иным образом нуклеотидтрифосфаты; в результате амплфикации получается набор меченых коротких фрагментов ДНК, перекрывающих целиком ту или иную хромосому. Эти эксперименты продемонстрировали, что интерфазные хромосомы занимают в ядре ограниченные и практически не перекрывающиеся области, получившие название «хромосомных территорий» (рис. V на цветной вклейке). Жестких закономерностей во взаимном расположении хромосомных территорий не наблюдается. Тем не менее гомологичные хромосомы, как правило, располагаются далеко друг от друга. Кроме того, в сферических ядрах лейкоцитов богатые генами хромосомы обычно располагаются ближе к центру ядра, а бедные генами хромосомы — ближе к ядерной оболочке. Иными словами, для каждой хромосомы характерна определенная радиальная позиция. Эту позицию принято обозначать, указывая среднее расстояние между центром ядра и центром хромосомной

территории (в процентах радиуса ядра). Химерные хромосомы, возникшие в результате транслокации между хромосомами, находящимися в разных ядерных слоях, занимают промежуточную позицию. В плоских ядрах фибробластов тенденция к расположению богатых генами хромосом в центре ядра прослеживается не столь ясно. В этих ядрах все большие хромосомы имеют тенденцию располагаться ближе к ядерной периферии.

В этих ядрах все большие хромосомы имеют тенденцию располагаться ближе к ядерной периферии.

Между хромосомными территориями существует пространство, которое называют интерхроматиновым доменом (interchromatin domain, ICD). Интерхроматиновый домен служит для транспорта РНК, различных предшественников и регуляторных белков. В нем же располагаются особые компартменты, в которых депонированы факторы сплайсинга и некоторые другие белки. Эти компартменты могут быть выявлены только при иммуноокрашивании клеток с использованием антител, узнающих депонированные белки. В англоязычной литературе компартменты, содержащие факторы сплайсинга, называют splicing speckles или просто speckles. Другими заслуживающими упоминания компартментами подобного рода являются места депонирования РМL-белков, которые называют РМL-тельцами (PML bodies). Хромосомные территории имеют «губчатую» структуру, в силу чего регуляторные белки легко могут проникать внутрь территорий, а РНП-частицы могут посредством простой диффузии перемещаться от мест синтеза в интерхроматиновый домен. Согласно наиболее обоснованной на сегодняшний день модели, базовой структурной единицей хромосомных территорий являются домены размером 1 млн п. н., представляющие собой розетки, построенные из 10 или более петель ДНК. Эти домены соответствуют кластерами репликонов (см. разд. 3.6). Первоначальные наблюдения указывали на то, что активные гены располагаются на поверхности хромосомных территорий. Последующие работы продемонстрировали, что не существует четкой корреляции между транскрипционным статусом гена и его положением внутри хромосомной территории. Исключение осотавляют некоторые активно транскрибирующиеся генные локусы, которые выпетливаются за пределы хромосомной территории. Показательным в данном отношении является локус *НохВ* генов выпетливаются за пределы хромосомной территории. В мыши локус *НохВ* генов включает несколько генов, транскрипция которых активируется последовательно по ходу развития (рис. 11). В модельном эксперименте последовательно обра

ботке эмбриональных стволовых клеток ретиноевой кислотой. Анализ локализации HoxB генов внутри хромосомной территории продемонстрировал, что до индукции ретиноевой кислотой HoxB1 ген, который начинает экспрессироваться первым, расположен на границе хромосомной территории, тогда как HoxB9 ген, экспрессия которого начинается существенно позже, располагается внутри хромосомной территории. После индукции экспрессии HoxB1 генов ретиноевой кислотой HoxB1 ген

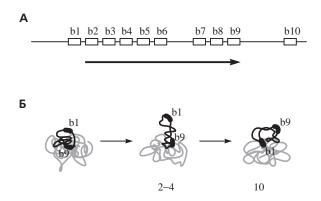


Рис. 11. Последовательная активация генов HoxB мыши

Кластер НохВ генов мыши, расположенный на 11 хромосоме, включает несколько родственных генов (НохВ1-НохВ10), транскрипция которых активируется последовательно по ходу развития (A). Чем ближе ген к «левой» границе кластера, (HoxB1, HoxB2 и пр.), тем ближе к передней части эмбриона он экспрессируется, тем раньше активируется в ходе эмбриогенеза и тем сильнее его ответ на стимуляцию ретиноевой кислотой (РК). Напротив, чем ближе к «правой» границе кластера (HoxB10, HoxB9 и пр.), тем ближе к задней части и тем позже экспрессия, и тем слабее ответ на РК. В недифференциированных эмбриональных стволовых клетках кластер расположен внутри хромосомной территории 11 хромосомы, но вблизи ее поверхности (Б), при этом НохВ1 практически экспонирован на поверхности хромосомной территории (ХТ). При активации РК кластер образует «протуберанец», выпетливающийся из XT11. На вершине протуберанца расположен ранний ген НохВ1, а в основании поздний НохВ9. Спустя несколько дней протуберанец свертывается, при этом HoxB1 оказывается практически «убран» в тело хромосомной территории, тогда как начинающий экспрессироваться НохВ9 выходит на ее поверхность.

выпетливается за пределы хромосомной территории и сохраняет такую локализацию в течение 2–4 дней. HoxB9 ген перемещается к границе хромосомной территории (рис. 11). Через 10 дней после индукции начинается экспрессия HoxB9 гена. Это коррелирует с его перемещением за границы хромосомной территории. Одновременно к границам хромосомной территории перемещается HoxB1 ген, экспрессия которого прекращается.

с его перемещением за границы хромосомной территории. Одновременно к границам хромосомной территории перемещается HoxB1 ген, экспрессия которого прекращается.

Значение выпетливания генов за пределы хромосомной территории в настоящий момент не ясно. Находящиеся за пределами хромосомных территорий активно транскрибирующиеся гены часто локализуются рядом с PML-тельцами. Помимо собственно PML-белков, эти компартменты содержат и ряд других транскрипционных факторов. Высказывалось предположение о том, что перемещение генов к PML-тельцам способствует активации транскрипции. Другое объяснение состоит в том, что выпетливание активно транскрибирующихся генов за видимые границы хромосомной территории является простым следствием декомпактизации соответствующего хромосомного домена.

Существуют экспериментальные подходы, позволяющие изучать динамику перемещений индивидуальной области генома внутри ядра живой клетки. Один из этих подходов базируется на использовании клеток, в геном которых интегрирована последовательность, включающая тандемно расположенные участки узнавания lac-peпрессора Escherichia coli (lac-операторы). В такие клетки трансфецируют конструкт, кодирующий химерный белок, состоящий из lac-peпрессора E. coli и зеленого флуоресцентного белка, экспрессирующийся под контролем эукариотического промотора. Этот белок избирательно связывается с тандемно расположенными участками узнавания lac-peпрессора. Получившийся комплекс хорошо виден под флуоресцентным микроскопом в живых клетках. Наблюдение можно проводить в течение достаточно длительного времени, если обеспечиваются нормальные условия культивирования клеток. Эксперименты такого рода продемонстрировали, что перемещения индивидуальных локусов интерфазных хромосом по ходу S-фазы носят сугубо локальный характер. Крупномасштабные изменения ядерной локализации изучаемых хромосомных локусов происходят только при подготовке клетки к митотическому делению и в ходе клеточной дифференцировки.

- В интерфазном ядре индивидуальные хромосомы занимают неперекрывающиеся пространства, которые называют хромосомными территориями.
- Существуют определенные закономерности в расположении интерфазных хромосом внутри клеточного ядра. В сферических ядрах богатые генами хромосомы располагаются ближе к центру ядра, а бедные генами хромосомы ближе к периферийной части ядра.
- Хромосомные территории построены из блоков в 1 млн п. н. и имеют «губчатый» характер.
- Между хромосомными территориями имеется пространство, которое называют интерхромтиновым доменом. Интерхроматиновый домен сочленяется с «каналами», пронизывающими хромосомные территории.
- Некоторые наиболее активно транскрибирующиеся гены выпетливаются за видимые границы хромосомных территорий.

ХРОМАТИН И ТРАНСКРИПЦИЯ

2.1. ТРАНСКРИПЦИОННО-АКТИВНЫЙ ХРОМАТИН

Цитологи давно обратили внимание на то, что ДНК в ядре упакована неоднородно. При окраске ядер красителями, специфически связывающимися с ДНК, можно видеть области, где ДНК упакована более компактно (иногда их еще называют хроматиновыми глыбками), и области, где локальная концентрация ДНК существенно ниже. Эти области получили названия гетерохроматина и эухроматина соответственно. Было весьма заманчивым связать различия в степени компактизации ДНК с ее транскрипционным статусом. Из общих соображений представлялось очевидным, что транскрипционно-активная ДНК должна быть упакована менее компактно. Первые экспериментальные подтверждения этой точки зрения были получены в опытах по обработке ядерной ДНК ДНКазой I. Оказалось, что активные гены расщепляются ДНКазой быстрее, чем неактивные. В дифференцированных клетках значительная часть генов не работает. Эти гены оказались относительно устойчивыми к ДНКазе І. При сравнении клеток, дифференцированных по разным путям, можно было видеть, что один и тот же ген предпочтительно расщепляется ДНКазой I в тех клетках, где он активен, и относительно устойчив к этому ферменту в клетках, где этот ген не транскрибируется. Феномен предпочтительной чувствительности к ДНКазе І активных генов принято называть общей ДНКазной чувствительностью. Его следует отличать от гиперчувствительности к ДНКазе І, о которой говорилось выше (разд. 1.5).

Обнаружение предпочтительной чувствительности транскрибирующейся фракции генома к ДНКазе I открыло принципиальную возможность выделения и характеристики коротких фрагментов

транскрипционно-активного хроматина. Было продемонстрировано, что транскрипционно-активный хроматин характеризуется повышенным уровнем ацетилирования гистонов нуклеосомной частицы. Примерно в это же время в лаборатории Олфри был разработан метод выделения фрагментов транскрипционно-активного хроматина посредством афинной хроматографии на колонках с иммобилизованной ртутью. И в этом случае было показано, что транскрипционно-активный хроматин характеризуется повышенным уровнем ацетилирования гистонов. Другими отличительными признаками активного хроматина явились обедненность гистоном Н1 и некоторое обогащение различными типами НМG-белков. Сама по себе задержка на ртутной колонке нуклеосом из транскрипционно-активной фракции хроматина указывает на то, что в этих нуклеосомах имеются доступные для взаимодействия SH-группы. Действительно, в нуклеосомах активного хроматина доступными для взаимодействия являются SH-группы цистеина-111 молекул гистонового октамера. С помощью электронной микроскопии было продемонстрировано, что в нуклеосомах транскрипционно-активного хроматина гистоновый октамер частично развернут и имеет U-образную форму (рис. VI на цветной вклейке). Еще одной характерной чертой нуклеосом активного хроматина является частое отсутствие одного из димеров H2A-H2B. В модельном эксперименте при транскрипции фрагмента ДНК, на котором была собрана одна нуклеосома, происходит количественное освобождение димера H2A-H2B, в результате чего октамер гистонов превращается в гексамер (рис. 12). Следует подчеркнуть, что все перечисленные изменения характерны для нуклеосом непосредственно транскриборующихся генов. В то же время общая ДНКазная чувствительность и повышенный уровень ацетилирования гистонов характерны и для хроматина, содержащего потенциально активные гены.

Исследования последних лет позволили выявить целый ряд активные гены.

активные гены. Исследования последних лет позволили выявить целый ряд новых отличительных черт активного хроматина. Наиболее важными из них является присутствие в составе нуклеосомных частиц различных вариантов гистонов и сайт-специфические модификации N-концевых доменов гистонов. Характерными компонентами активного хроматина являются Н3.3 и Н2А.Вbd. Долгое время к числу компонентов активного хроматина относили и гистон Н2А.Z. Содержащие этот вариант гистона нуклеосомные частицы изучены достаточно подробно. В частности, охарактеризована трехмерная структура нуклеосомной глобулы, содержащей Н2А.Z

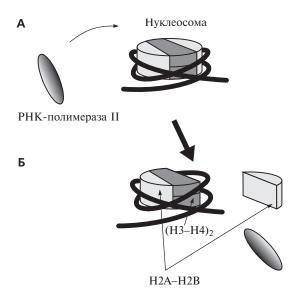


Рис. 12. Транскрипция на нуклеосомных матрицах приводит к утрате димера H2A-H2B

Изучение транскрипции на нуклеосомных матрицах проводили в системе со сконструированной матрицей и иммобилизованной РНК-полимеразой II. Синтетические матрицы получали *in vitro* сборкой октамера гистонов на фрагменте рекомбинантной ДНК, содержащим промотор и последовательность, благприятную для посадки нуклеосомы (А). Анализ продуктов транскрипии методом задержки в геле показал, что транскрипция приводит к образованию в практически эквимолярных с транскриптом количествах производной формы нуклеосомы, лишенной одного из двух гетеродимеров Н2А-Н2В — так называемой гексосомы (Б). Иными словами, транскрипция РНК-полимеразой II матриц, содержащих нуклеосомы, приводит к диссоциации гетеродимера Н2А-Н2В от гистонового октамера.

вместо канонического H2A. Результаты анализа, позволившего разрешить структуру с точностью 2,6 Å, показали, что нуклеосома, построенная при участии H2A.Z, отличается от канонической нуклеосомы по спектру контактов димера H2A.Z-H2B с тетрамером (H3-H4)₂ и по спектру контактов внутри самого димера H2A.Z-H2B. Более того, существенной особенностью такой вариантной нуклеосомной частицы является то, что на измененной поверхности белковой глобулы может удерживаться ион металла. Это важно, так как большинство известных комплексов ремоделирования хроматина включают субъединицу, содержащую металлсвязывающий

домен. Димер H2A.Z-H2B связан с тетрамером (H3-H4)₂ менее прочно, чем димер H2A-H2B; это должно способствовать транскрипции организованной в нуклеосомы ДНК (см. разд. 2.2). Анализ распределения H2A.Z по всему геному показал предпочтительную локализацию этого варианта гистона в промоторных областях. В то же время нуклеосомы, содержащие H2A.Z, легче упаковываются в 30-нм фибриллу (см. разд. 1.4) Существуют экспериментальные данные, демонстрирующие участие H2A.Z в формировании центромерных областей хромосом. Таким образом, роль H2A.Z в формировании активного хроматина представляется не вполне ясной. Скорее всего, этот вариант гистона H2A может участвовать в формировании как активного, так и неактивного хроматина в зависимости от выполнения некоторых дополнительных условий. Отметим, что подобно основным формам гистонов H2A.Z может ацетилироваться. В промоторных областях работающих генов присутствует именно ацетилированная форма H2A.Z. Некоторых вариантов гистонов в активном хроматине меньше, чем в неактивном. Таковыми являются, например, варианты 2 и 4 гистона H1 и гистон macroH2A.

и 4 гистона Н1 и гистон тасгоН2А.

Как уже говорилось, характерной особенностью транскрипционно-активной фракции хроматина, выделенной с помощью любого из упомянутых выше экспериментальных подходов, является высокий уровень ацетилирования гистонов. В экспериментах по сборке хроматина *in vitro* продемонстрировано, что хроматин, собранный с использованием гиперацетилированных гистонов, обладает основными свойствами активного хроматина, в частности повышенной чувствительностью к нуклеазам. С появлением антител, вышенной чувствительностью к нуклеазам. С появлением антител, узнающих гистоны, ацетилированные по различным аминокислотным остаткам, было показано, что значение имеет не только общий уровень ацетилирования, но и конкретные позиции, по которым ацетилируются различные гистоны. Хотя ацетилирование гистонов в целом характерно для активного хроматина, существует одно исключение. Ацетилирование Н4 по позиции К12 обнаружено в некоторых неактивных гетерохроматиновых участках хромосом у дрожжей и дрозофилы. Характерным маркером активного хроматина является ацетилирование Н3 по позиции К9. Ацетилирование гистона Н4 по позиции К16 препятствует образованию 30-нм хроматиновой фибриллы и, соответственно, является принципиально важным для формирования ДНКазо-чувствительного транскрипционно-активного хроматина. На рис. VII на цветной вклейке схематически представлены все основные мишени для различных модификаций в N-концевых доменах гистонов нуклеосомного дла. Каждый из этих доменов имеет 4 лизиновых остатка, которые могут ацетилироваться с образованием 16 возможных изоформ (одна неацетилированная, 4 моноацетилированных по разным позициям, 6 диацетилированных по разным позициям, 6 диацетилированных по разным позициям, 6 диацетилированных по разным позициям, 8 общей сложности для трех гистонов число возможных изоформ будет равно 48. Если учесть комбинаторику различных изоформ в составе одной нуклеосомной частицы (не забывая при этом, что в нуклеосомной глобуле имеется по две копии каждого из входящих в ее состав гистонов), то число возможных вариантов превысит 107. Помимо ацетилирования, гистоны могут также метилироваться, фосфорилироваться, убиквитинилироваться, сумоилироваться и поли-АДФ-рибозилироваться. Недавно было обнаружено, что присутствующие в N-концевом домене гистона Н3 остатки аргинина могут деиминироваться. В совокупность и и модификации делают возможное разнообразие нуклеосомных частиц поистине неисчерпаемым. Как уже говорилось выше (разд. 1.3), совокупность сигналов, экспонированных на поверхности нуклеосом, составляет особый эпигенетический код, называемый также гистоновым кодом. Этот код может считываться различными белками, регулирующими конденсацию хроматиновой фибриллы и участвующими тем или иным образом в репликации, транскрипции, репарации ДНК и друтих генетических процессах. Значение различных комбинаций сигналов гистонового кода еще только начинает изучаться. В качестве одного из примеров расшифрованных сигналов можно указать модификации гистона Н3 по лизиновому остатку в девятой позиции (К9). Этот остаток лизина может как метилироваться, так и ацетилироваться. Понятно, что данные модификации являются взаимоисключающими. Ацетилирование К9 приводит, напротив, к инактивации хроматина. Метилирование К9 приводит, напротив, к инактивации хроматина. Метилирование К9 приводит, напротив, к инактивации хроматина, способствуя возникновению высоко-аффинного участка сврзывания для белка НР1 (разд. 2.4). Таким образом, модификации К9 в N-концевом доме

хроматина.

Несмотря на особую роль отдельных сайтов ацетилирования гистонов, основной характеристикой активного хроматина является высокий уровень ацетилирования гистонов по многим по-

зициям. В течение ряда лет было принято считать, что метилирование гистонов имеет противоположный эффект, т. е. приводит к инактивации хроматина. Работы последних лет показали, что эффект метилирования гистонов может быть прямо противоположным в зависимости от конкретной мишени для метилирования и уровня (моно-, ди- или три-) метилирования этой мишени. Метилирование Н3 по позициям К4, К36 и К79 характерно для активного хроматина. При этом триметилирование Н3 по К4 наблюдается в промоторных областях транскрибирующихся генов, тогда как моно- и диметилирование по той же позиции характерно для внутренней части транскрипционной единицы. Метилирование Н3 по позиции К27 и метилирование Н4 по позиции K20 характерны для стабильно передающегося в ряду клеточных делений неактивного хроматина (см. разд. 2.4). В течение многих лет считалось, что метилирование гистонов в течение многих лет считалось, что метилирование гистонов является необратимой модификацией, так как не было известно ни одной гистондеметилазы. В последние годы открыт целый ряд гистондеметилаз (LSD1, осуществляющая деметилирование Н3 по К4 и Н3 по К9, и семейство гистондеметилаз, содержащих JmiC-домен, в том числе JHDM1A, осуществляющая деметилирование Н3 по К36). Любопытно, что все эти деметилазы удаляют метильные группы из тех позиций, которые характерны для которые характерны для активного хроматина и хроматина, который при определенных условиях может быть активирован. До сих пор не обнаружено деметилаз, которые удаляют метильные группы из тех позиций, которые характерны для перманентно неактивного хроматина (Н3 по K27 и H4 по K20).

В заключение данного раздела следует сказать о том, что существует много различных путей активации хроматина путем внесения определенных модификаций в молекулы гистонов. Это обеспечивает возможность контроля дифференциальной экспрессии генов.

- Для активной фракции хроматина характерна менее компактная упаковка, чем для основной массы хроматина, о чем свидетельствует, в частности предпочтительная чувствительность активного хроматина к нуклеазам.
- Активный хроматин отличается от неактивного как на уровне организации нуклеосомной фибриллы в структуры высших порядков, так и на уровне организации индивидуальных нуклеосом.

- Для активного хроматина характерны высокий уровень ацетилирования гистонов в целом, сайт-специфическое ацетилирование гистона Н3 по позиции К9, сайт-специфическое ацетилирование гистона Н4 по позиции К16, сайт-специфическое ди- и триметилирование гистона Н3 по позициям К4, К36 и К79.
- Для активной фракции хроматина характерным является присутствие вариантных форм гистонов НЗ.3 и H2A.Bbd.

2.2. ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК, ОРГАНИЗОВАННОЙ В НУКЛЕОСОМЫ

Из общих соображений ясно, что нуклеосомные частицы должны являться серьезным препятствием на пути транскрипции. Тем ны являться серьезным препятствием на пути транскрипции. Тем не менее четко продемонстрировано, что все РНК-полимеразы, в том числе и прокариотические, способны транскрибировать ДНК, организованную в нуклеосомы. Механизм транскрипции ДНК, организованной в нуклеосомы, остается предметом научных дискуссий. Существует две основные модели, объясняющие возможность транскрипции нуклеосомной нити. Одна из них предполагает, что нуклеосомная глобула, находящаяся на пути транскрипционного комплекса, временно удаляется, оставаясь при этом связанной с самим транскрипционным комплексом, и далее вновь связывается с ДНК за транскрипционным комплексом. Эта модель получила прямые подтверждения в модельных экспериментах по транскрипции бактериальными РНК-полимеразами организованного в нуклеосому фрагмента ДНК. Результаты этих экспериментов не удалось, однако, воспроизвести при использовании эукариотической РНК-полимеразы II. Другая модель транскрипции нуклеосомной нити предполагает, что дестабилизированные нуклеосомы активной фракции хроматина частично разворачиваются непосредственно в момент прохождения транскрипционного комплекса, в результате чего РНК-полимераза может считывать ДНК, не удаляя гистонов. Надо сказать, что за может считывать ДНК, не удаляя гистонов. Надо сказать, что в местах входа и выхода ДНК из нуклеосомы ДНК-белковые контакты относительно малочисленны, что допускает возможность постепенного разворачивания накрученной на нуклеосому петли ДНК. Работающий транскрипционный комплекс разворачивает двойную спираль ДНК, что компенсируется возникновением домена положительной суперспирализации перед транскрипционным комплексом. Витки ДНК на нуклеосоме представляют собой негативную суперспираль, стабилизированную взаимодействием

с нуклеосомными гистонами. Понятно, что позитивная суперспирализация будет способствовать разворачиванию накрученных на нуклеосому петель ДНК.

с нуклеосомы мини гистонами. Понятно, что позитивная суперспирализация будет способствовать разворачиванию накрученных на нуклеосому петель ДНК.

В обеспечении возможности транскрипции организованной в нуклеосомы ДНК важную роль играют факторы ремоделирования хроматина (разд. 1.6), прежде всего ремоделирующие комплексы, прототипом которых является Swi/Snf. Экспериментально показано, что этот ремоделирующий комплекс необходим для транскрипции организованной в хроматин ДНК. Сравнительно недавно продемонстрировано, что важную роль в транскрипции организованной в нуклеосомы ДНК играет белковый комплекс, получивший название FACT (facilitator of chromatin transcription). Этот белковый комплекс способствует временному удалению из нуклеосомы одного или обоих димеров Н2А-Н2В, облегчая разворачивание петель нуклеосомной ДНК в местах входа и выхода ДНК из нуклеосомной частицы. Для осуществления своей функции FACT должен быть посажен на активные промоторы. Это достигается при участии вспомогательного комплекса ремоделирования хроматина СНD1, который обладает сродством к FACT и к нуклеосомам, содержащим гистон Н3, триметилированный по позиции К4. Как уже говорилось, эта модификация гистона Н3 характерна для активного хроматина. Нуклеосомы, содержащие Н3, триметилированный по позиции К4, локализуются преимущественно в промоторных областях и в начале активных транскрипционных единиц. Для оптимальной работы FACT существенно еще и моноубиквитинилирование гистона Н2В по К120. Считается, что эта модификация способствует ди- и триметилированию Н3 по позиции К4. Некоторые авторы считают, что убиквитинилирование по позиции кация способствует ди- и триметилирования проведенные с использованием метода иммунопреципитации хроматина, выявили неравномерное распределение модифицированных и вариантных форм гистонов в границах транскрипционных единиц (рис. 13). Это объясняется тем, что внесение некоторых модификаций прямо сопряжено с осуществлением транскрипционных единиц (рис. 13). Это объясняется тем, что внесение некоторых модификаций пр

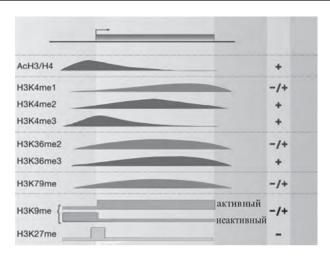


Рис. 13. Модификации гистонов и транскрипционная активность хроматина На схеме показано распределение некоторых модификаций гистонов в активных и неактивных генах (корреляция с интенсивностью транскрипции обозначена справа знаками «+», «-» и «+/-»). Светло-серым обозначены профили распределения по длине гена модификаций, наличие которых не связано с интенсивностью транскрипции, в том числе и модификаций, характерных для неактивного хроматина. Темно-серым показаны профили распределения модификаций, характерных для транскрибируемых генов.

в составе элонгирующего транскрипционного комплекса гистонубиквитинлигазы, которая убиквитинилирует гистон Н2В. Одновременно РАГ привлекает в состав элонгирующего транскрипционного комплекса H3K4 гистонметилазу (Set1 комплекс COMPASS). Этот комплекс осуществляет ди- и триметилирование НЗК4. Монометилирование осуществляется обычной гистонметилазой Set1 и не зависит от убиквитинилирования гистона Н2В. По мере продвижения элонгирующего РНК-полимеразного комплекса вдоль транскрипционной единицы происходит дефосфорилирование Ser5 и фосфорилирование Ser2 в составе СТD. Следствием этого изменения в характере модификации CTD является освобождение гистонметилазы COMPASS и привлечение гистонметилазы Set2, которая осуществляет триметилироване лизинового остатка 36 гистона Н3. Следствием этой сложной цепи процессов является накопление дии триметилированного по К4 гистона Н3 в начале транскрипционной единицы и триметилированного по К36 гистона Н3 в конце транскрипционной единицы. На основании всего вышесказанного можно сделать один вывод, имеющий более общее значение. Определенная группа модификаций гистонов необходима для привлечения РНК-полимеразы ІІ к промоторным областям. Распределение таких модифицированных (и выполняющих ту же функцию вариантных) форм гистонов в границах транскрипционных единиц и в целом в геноме не зависит от уровня транскрипции. Другие модификации осуществляются в прямой связи с процессом транскрипции. Распределение таких модифицированных гистонов прямо коррелирует с уровнем транскрипции соответствующих областей генома.

Сопряженная с транскрипцией смена характера метилирования гистона Н3 имеет большое биологическое значение. Триметилирование Н3К36 в дрожжевых клетках способствует привлечению гистондезацетилазы Rpd3S, которая снижает общий уровень ацетилирования гистонов на большей части транскриционной единицы после каждого раунда транскрипции. Вероятно, это необходимо для предотвращения возможности инициации транскрипции внутри гена. Так называемые криптические промоторы, т. е. последовательности ДНК, которые в принципе могли бы служить местами посадки РНК-полимеразы II, встречаются в геноме эукариот достаточно часто. Организация ДНК в стабильную нуклеосомную структуру препятствует активации этих промоторов.

В заключение данного раздела следует подчеркнуть, что связанные с осуществлением транскрипции модификации гистонов носят динамический характер. С помощью специальных экспериментальных подходов можно наблюдать последовательное ацетилирование-дезацентилирование гистонов, сопряженное с прохождением соответствующих раундов транскрипции.

- При транскрипции РНК-полимеразой II происходит частичная разборка нуклеосом, заключающаяся в удалении одного или обоих димеров H2A-H2B.
- В осуществлении транскрипции организованной в нуклеосомы ДНК важную роль играют комплексы ремоделирования хроматина и белковый комплекс FACT, способствующий временной диссоциации димеров H2A-H2B.
- Существует сопряженная с процессом транскрипции система внесения модификаций в N-концевой домен гистона H3.

2.3. ДОМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА: АКТИВНЫЕ ДОМЕНЫ

Эксперименты по изучению предпочтительной чувствительности к нуклеазам активных генов продемонстрировали, что область предпочтительной чувствительности к нуклеазам, как правило, оказывается существенно более протяженной, чем транскрибирующийся ген. В ряде случаев предпочтительно чувствительными к нуклеазам оказывались достаточно протяженные (100 т. п. н. и более) геномные домены, включающие как транскрибирующиеся, так и молчащие гены, а также межгенные области. В качестве примеров можно указать домены β-глобиновых генов позвоночных и домен генов овальбумина кур (рис. 14). Границы ДНКазо-чувствительных доменов являются достаточно четкими. Переход от ДНКазо-чувствительной области к области, характеризующейся относительной устойчивостью к ДНКазам, происходит в пределах фрагмента ДНК протяженностью в несколько т. п. н. (рис. 14). Это позволяет предположить, что существуют специальные элементы генома и соответствующие им структуры хроматина, которые являются границами ДНКазо-чувствительных доменов. ДНКазочувствительные домены генома привлекли особое внимание исследователей прежде всего потому, что очевидна была определенная зависимость между статусом этих доменов и транскрипционной активностью соответствующих генов. Например, домены β-глобиновых генов позвоночных являются предпочтительно чувствительными к ДНКазе I в эритроидных клетках, но не в клетках, дифференцированных по другим путям. Можно, таким образом,

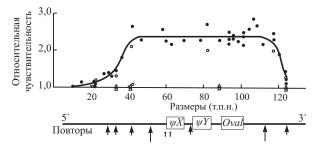


Рис. 14. Профиль чувствительности к ДНКазе I домена гена овальбумина кур

В состав домена входит ген овальбумина (*Oval*) и два псевдогена (ψX и ψY). Над схемой домена приведен профиль относительной чувствительности домена и его окрестностей к ДНКазе I в клетках яйцевода, где овальбуминовые гены экспрессируются.

говорить о том, что ДНКазо-чувствительные домены хроматина являются структурно-функциональными блоками генома, которые могут находиться в активном либо неактивном состоянии в зависимости от типа клеток, или, иными словами, в зависимости от неких дополнительных сигналов. Это положение можно мости от неких дополнительных сигналов. Это положение можно считать основой так называемой доменной гипотезы структурнофункциональной организации эукариотического генома. Данная гипотеза приобрела особую привлекательность после того, как были обнаружены области контроля локуса (locus control regions, LCRs), которые, как следовало из результатов первоначальных экспериментов, осуществляли контроль над всеми параметрами (чувствительность к ДНКазам, транскрипционный статус и время репликации) протяженных доменов генома. Очевидно, что ДНКазочувствительные домены представляют собой области локально деконденсированного хроматина (согласно большинству моделей, области, в рамках которых нарушается компактная упаковка нуклеосомной нити в 30-нм фибриллу). Как уже говорилось выше, экспрессируются далеко не все гены, находящиеся внутри активного домена. Однако все гены, расположенные в активном хроматиновом домене, являются потенциально активными и могут быть быстро вовлечены в транскрипцию. Вопрос о том, как возникает активный хроматиновый домен, до конца не изучен. Понятно, что появление такого домена является результатом сложной цепи событий, превращающей неактивный хроматин в активный. Наиболее важным процессом, приводящим к активации хроматинового домена, является осуществление комплекса сайт-специфических модификаций гистонов. Хотя о доменной организации генома написаны сотни статей, количество изученных модельных систем является весьма скромным. Это домены α -и β -глобиновых генов позвоночных, домен гена лизоцима кур, домен гена α -фетопротеина человека, домен интерфероновых генов человека и некоторые другие.

человека и некоторые другие. Наиболее хорошо изучен домен β -глобиновых генов человека. Этот домен включает 5 генов, которые активируются на разных стадиях развития — эмбриональный ген ϵ , фетальные гены $^{G}\gamma$ и $^{A}\gamma$ и «взрослые» гены δ и β (рис. 15). Перед кластером β -глобиновых генов располагается область контроля локуса, включающая ряд тканеспецифичных энхансеров. Изучение этого регуляторного элемента сыграло большую роль в раскрытии принципов работы геномных доменов, поэтому стоит рассказать о нем более подробно. Известно, что различные нарушения экспрессии глобиновых генов приводят к тяжелым наследственным заболеваниям — та-

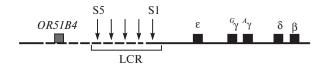


Рис. 15. Структура домена β–глобиновых генов человека

Домен включает 5 генов и 1 псевдоген (не показан). В «левой» части кластера находится область контроля локуса — LCR, состоящая из пяти участков гиперчувствительности к ДНКазе I (расположенных на расстоянии 6,1, 10,9, 14,7, 18 и 21,5 т. п. н. от места начала транскрипции гена є). Еще левее, уже за пределами домена, расположен ген одного из обонятельных рецепторов OR51B4. Входящие в состав домена гены активируются в ходе индивидуального развития в том же порядке, в котором они расположены на хромосоме: на самых ранних эмбриональных стадиях функционирует є, его экспрессия быстро затухает и сменяется γ (оба варианта — $^{G}\gamma$ и $^{A}\gamma$ — экспрессируются одновременно и с примерно равной интенсивностью), а после рождения их, в свою очередь, сменяет β. Ген δ также активируется после рождения, но его экспрессия крайне незначительна.

лассемиям. Анализ характера геномных нарушений при различных талассемиях продемонстрировал, что последовательности ДНК, расположенные на значительном (более 5 т. п. н.) расстоянии перед кластером β-глобиновых генов человека существенны для нормальной экспрессии глобиновых генов. В независимых экспериментах было продемонстрировано, что на расстоянии 6-22 т. п. н. перед кластером β-глобиновых генов человека находится блок участков гиперчувствительности к ДНКазе І, включающий четыре эритроид-специфичных и один перманентный участок гиперчувствительности. Делеции и иные геномные перестройки, приводящие к талассемиям, всегда затрагивали либо собственно глобиновые гены, либо упомянутый блок участков гиперчувствительности к ДНКазе І. Наиболее короткая из делеций, приводящих к үб β-талассемии, так называемая «испанская делеция», удаляла гиперчувствительные участки II-V и 25 т. п. н. ДНК перед ними (рис. 15). При этом изменялся транскрипционный статус и способ упаковки в хроматине (если судить об этом по утрате предпочтительной чувствительности к ДНКазе I) протяженного (более 100 т. п. н.) домена генома, включающего кластер β-глобиновых генов. Изменялось и время репликации этого домена. В нормальных эритроидных клетках он реплицируется в начале S-фазы. В клетках с «испанской делецией» домен β-глобиновых генов реплицировался в конце S-фазы, что характерно для транскрипционно-неактивных областей генома. Все это позволяло предположить, что блок участков гиперчувствительности к ДНКазе I, находящийся на расстоянии 6–22 т. п. н. перед кластером β-глобиновых генов человека, представляет собой особый регуляторный элемент, контролирующий транскрипционный статус протяженного геномного домена на уровне упаковки этого домена в хроматин. Ключевые эксперименты были сделаны на трансгенных мышах. Было продемонстрировано, что, будучи поставленным перед одним из β-глобиновых генов человека или перед всем кластером β-глобиновых генов человека, упомянутый регуляторный элемент (который впоследствии получил название области контроля локуса, LCR) обеспечивает высокий и не зависящий от позиции интеграции уровень экспрессии этих генов в эритроидных клетках трансгенных мышей (рис. 16). Практически сразу после этого было показано, что LCR домена β-глобиновых генов человека работает аналогичным образом и в отношении ряда других трансгенов, поставленных под его контроль. Области контроля локуса, аналогичные LCR домена β-глобиновых генов человека, были обнаружены и в доменах β-глобиновых генов других позвоночных животных (мыши, козы, курицы). Последующие исследования позволили идентифицировать регуляторные элементы, обладающие активностью LCR, и в ряде других области контроля локуса в дляобиновых генома.

Ностью LCR, и в ряде других ооластеи генома.

Детальный анализ области контроля локуса β-глобиновых генов человека продемонстрировал, что она включает несколько эритроид-специфичных энхансеров, позиции которых совпадают с позициями участков гиперчувствительности к ДНКазе І. Наиболее сильный энхансер находится в области гиперчувствительного сайта ІІ. В участках гиперчувствительности ІІ–ІV были картированы многочисленные сайты связывания различных транскрипционных факторов, в частности GATA-1, NF-E2, AP1, CP2. Хотя между регуляторными элементами, расположенными в разных участках гиперчувствительности к ДНКазе І в границах LCR домена β-глобиновых генов человека, имеется много общего, эти регуляторные элементы не являются дублирующими. Они выполняют взаимодополняющие функции. Только полноразмерный LCR способен обеспечить правильный порядок экспрессии эмбриональных глобиновых генов и глобиновых генов взрослого организма на нужных стадиях развития. В настоящее время считается, что это связано с необходимостью образования единого активаторного комплекса, в состав которого входят транскрипционные факторы, связанные с каждым из регуляторных элементов LCR, и транскрипционные факторы, «сидящие» на промоторе.

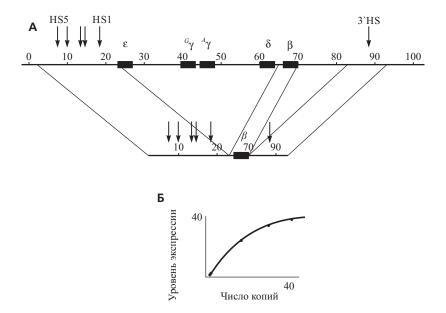


Рис. 16. LCR стабильно обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгена Методами генной инженерии был сконстуирован β-глобиновый минидомен, в состав которого включили всю область контроля локуса, единственный ген В-глобина и район «правой» границы домена с гиперчувствительным сайтом 3' HS (A). Затем были получены трансгенные мыши с интегрированным в различные места генома минидоменами, причем количество интегрировавшихся копий различалось в разных линиях трансгенных мышей. Анализ экспрессии β-глобина показал, что при не слишком большом числе копий трансгена количество РНК прямо пропорционально копийности минидомена независимо от мест встраивания минидомена (Б).

Механизм работы LCR изучен далеко не полностью. Ясно, что этот регуляторный элемент выполняет две разные задачи: поддержание активного статуса домена в целом и обеспечение высокого уровня экспрессии отдельных глобиновых генов на разных стадиях развития. Вторая из перечисленных задач выполняется на уровне взаимодействия LCR с промоторами индивидуальных генов. Вопрос о том, как именно это происходит, будет рассмотрен в разд. 2.8. Здесь же мы остановимся более подробно на вопросе о том, каким образом формируются активные домены и какие механизмы поддерживают их статус. В предыдущем разделе подробно обсуждался вопрос о роли ацетилирования гистонов в организации активного хроматина. В настоящее время существует возможность изучать

распределение различных вариантных и модифицированных форм гистонов в протяженных геномных доменах и даже во всем геноме. Для этого используют метод иммунопреципитации хроматина (chromatin immunoprecipitation, ChIP). Принцип метода показан

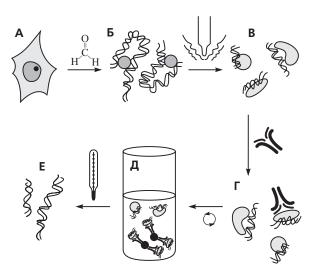


Рис. 17. Метод иммунопреципитации хроматина

Клетки пермеабилизируют и обрабатывают формальдегидом (A), что приводит к образованию белок-белковых и ДНК-белковых сшивок (Б). Затем клетки окончательно лизируют и обрабатывают ультразвуком, в результате чего хроматин дробится на ДНК-белковые комплексы небольшого размера (В). Такие препараты обрабатывают специфическими антителами к изучаемым белкам (Г). К связанным антителами белкам с пришитыми к ним формальдегидом фрагментами ДНК добавляют гранулы сефарозы, на которых иммобилизован белок А (Г). Белок А связывается с антителами, и гранулы сефарозы с комплеками «А-белок-антитело-исследуемый белок-ДНК» осаждают центрифугированием (Д). После этого фрагменты хроматина элюируют, межмолекулярные сшивки разрушают нагреванием образца, выделяют фрагменты ДНК (Е) и анализируют их удобным способом (это может быть гибридизация по Саузерну, ПЦР и т. п.).

Чтобы предотвратить неспецифическое связывание белков с сефарозой или А-белком, на стадии В перед добавлением антител фрагментированный хроматин инкубируют с той же сефарозой, которую потом центрифугированием удаляют из препарата вместе с неспецифически связывающимися компонентами. Также необходимо ставить отрицательный контроль с преиммунной сывороткой, что позволит учесть неспецифическое связывание антител с компонентами хроматина.

на рис. 17. Живые клетки пермеабилизируют и фиксируют формальдегидом. После этого их лизируют и расщепляют хроматин на короткие фрагменты ультразвуком. Фрагменты ДНК, связанные с представляющими интерес белками (например, с гистоном Н3, ацетилированным по К9), осаждают антителами. После разрушения формальдегидных сшивок (чего можно достичь простой инкубацией препарата в течение 12 ч при 65°C) из препарата выделяют ДНК. Эту ДНК анализируют с помощью количественной полимеразной цепной реакции или используют для гибридизации с олигонуклеотидными чипами (ChIP-on-chip). С помощью этого методического подхода проанализированы профили ацетилирования гистонов в разных областях геномов позвоночных животных, включая домены β-глобиновых генов. В целом было выявлено хорошее соответствие между ДНКазо-чувствительными доменами и доменами, содержащими гиперацетилированные гистоны. В то же время было

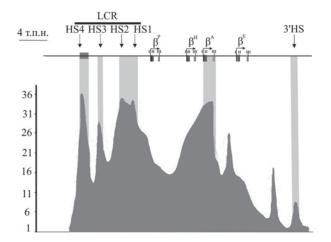


Рис. 18. Транскрипционная активность и уровень ацетилирования гистонов Приведен профиль распределения ацетилированных гистонов в кластере β-глобиновых генов кур. Положение модифицированных гистонов определяли методом иммунопреципитации хроматина. Сверху приведена карта кластера, на которой отмечены гены, а также регуляторные участки (гиперчувствительные сайты HS1-HS4 в составе LCR и 3'-инсулятор). Положения регуляторных элементов, а также наиболее эктивно транскрибирующегося гена β^A , показаны светло-серыми полосами. Видно, что именно в этих районах домена наблюдается наиболее высокий уровень ацетилирования. Цифрами на оси Yобозначена степень обогащения ацетилированными гистонами по сравнению с тотальным хроматином.

продемонстрировано, что в рамках протяженной геномной области, содержащей гиперацетилированные гистоны, уровень ацетилирования может существенно варьировать. Наиболее высокий уровень ацетилирования гистонов характерен для участков, содержащих регуляторные элементы и наиболее активно транскрибирующиеся гены (рис. 18). Профили распределения гистонов, ацетилированных по различным позициям, могут существенно различаться.

В настоящее время процесс создания активных геномных доменов прямо связывают с процессивным (т. е. распространяющимся) ацетилированием гистонов в рамках всего домена. Прежде всего, ацетилированием гистонов в рамках всего домена. Прежде всего, этот процесс должен инициироваться в каком-то определенном месте. Согласно современным представлениям, таким местом может быть область контроля локуса, энхансер или промотор. Связанные с этими регуляторными элементами транскрипционные факторы способны привлекать гистонацетилазы. Эукариотические гистонацетилазы входят в состав больших мультисубъединичных комплексов. Наряду с собственно гистонацетилазой (например, GCN5 в клетках дрожжей) в состав этих комплексов входят субъединицы, способные взаимодействовать с различными транскрипционными факторами и общими факторами инициации транскрипции. Это способствует привлечению гистонацетилаз к промоторам и энхансерам, где они осуществляют локальное ацетилирование гистонов. В состав гистонацетилазных комплексов входят и субъединицы, содержащие так называемый бромодомен, который узнает ацетилированные остатки лизина в молекулах гистонов. В связи с этим возникновение области локального ацетилирования гистонов будет способствовать привлечению дополтилирования гистонов будет способствовать привлечению дополнительных гистонацетилаз, которые будут ацетилировать гистоны нительных гистонацетилаз, которые будут ацетилировать гистоны в составе соседних нуклеосом, перемещаться на эти нуклеосомы и продолжать процесс распространяющегося ацетилирования (рис. 19). Этот механизм распространяющегося ацетилирования не является единственным. Согласно гипотезе Траверса, элонгирующий комплекс РНК-полимеразы II может сам являться тем транспортным средством, которое используется для перемещения вдоль хроматинового домена факторов ремоделирования хроматина, гистонацетилаз и других белков, необходимых для активации хроматиновых доменов. Соответственно, низкоуровневая транскрипция протяженных геномных доменов может быть необходима для их активации. Основное положение гипотезы Траверса, а именно то, что распространяющийся процесс модификации гистонов осуществляется в непосредственной связи с процессом транскрипции, подтверждено в настоящее время эксперименталь-

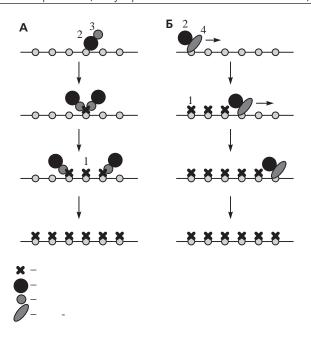


Рис. 19. Механизмы распространения ацетилирования гистонов по хроматиновому домену

Схематически изображены две общепринятые модели. Согласно модели расширяющегося домена (А), локальное ацетилирование привлекает гистонацетилазные комплексы за счет белков с бромодоменами, которые связываются с ацетилированными гистонами. Таким образом, действует положительная обратная связь и происходит распространение ацетилирования. Модель Траверса (Б) предполагает, что гистонацетилазные комплексы взаимодействуют с РНК-полимеразой и ацетилируют гистоны по мере элонгации транскрипции.

но. С использованием метода ко-иммунопреципитации продемонстрировано, что в живых клетках РНК-полимераза II образует комплексы с гистонацетилазами и факторами ремоделирования хроматина. Протяженные (так называемые «межгенные», а точнее говоря, «полнодоменные») транскрипты обнаружены в целом ряде геномных областей, и выявлена корреляция между началом синтеза этих транскриптов и активацией соответствующих доменов генома. Так, продемонстрировано, что в незрелых эритробластах кур, т. е. еще до начала активной транскрипции глобиновых генов, осуществляется транскрипция протяженной геномной области, включающей кластер α-глобиновых генов и 5'-концевые регуляторные элементы домена α-глобиновых генов. Транскрипция начинается

в области расположения удаленного регуляторного элемента домена α -глобиновых генов, имеющего некоторые характеристики области контроля локуса. В неэритроидных клетках полнодоменный транскрипт, включающий кластер α -глобиновых генов, не обнаружен. В домене β -глобиновых генов человека обнаружена транскрипционная единица, включающая весь «взрослый» субдомен этого домена. Делеция промотора данной транскрипционной единицы приводит к инактивации «взрослых» генов δ и β , хотя промоторы этих генов, равно как и область контроля локуса, остаются неповрежденными. Следует подчеркнуть, что каков бы ни был конкретный механизм распространяющейся активации геномного домена, инициация этого процесса может происходить только в области, содержащей комплекс участков узнавания для различных транскрипционных факторов. Именно сюда могут привлекаться гистонацетилазы, которые способны создать область локального ацетилирования гистонов, необходимую как для активации промотора, так и для начала спонтанного распространения «волны» ацетилирования.

- Предпочтительной чувствительностью к ДНКазе обладают не только активные гены, но и более протяженные области генома, включающие эти гены.
- Существуют особые регуляторные элементы, контролирующие транскрипционный статус геномных доменов на уровне упаковки этих доменов в хроматиновый структуры высших порядков.
- Активные хроматиновые домены формируются посредством процессивного ацетилирования гистонов при участии гистонацетилаз, содержащих бромодомен, который узнает гистон НЗ, ацетилированный по позиции К9.
- Процессивное ацетилирование гистонов может быть сопряжено с низкоуровневой транскрипцией. При этом гистонацетилазы и комплексы ремоделирования хроматина перемещаются вдоль генномного домена в комплексе с РНК-полимеразой II.
- Каков бы ни был механизм процессивного ацетилирования гистонов, он инициируется в области контроля локуса, энхансере или промоторе, где собирается необходимый для такой инициации комплекс транскрипционных факторов.

2.4. ДОМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА: НЕАКТИВНЫЕ ДОМЕНЫ

В течение многих лет было принято считать, что нормальным («заданным по умолчанию») состоянием хроматина является полностью неактивное состояние, исключающее возможность транскрипции. Соответственно, предполагалось, что активный хроматин формируется в локальных областях в ответ на действие специальных сигналов. В последние годы стало очевидным, что «заданным по умолчанию» является некое промежуточное состояние хроматина и что особая цепь процессов необходима для формирования как активного, так и неактивного хроматина. Раскрытию механизмов формирования неактивного хроматина во многом способствовало изучение мутаций, подавляющих так называемый эффект положения (т. е. инактивацию гена, оказавшегося рядом с неактивным хроматиновым доменом — гетерохроматином). Такая инактивация является следствием спонтанного расширения гетерохроматинового домена. Соответственно, подавляющие эффект положения мутации, как правило, затрагивают гены, кодирующие необходимые для формирования гетерохроматина белки. Такими белками являются ДНК-метилазы, гистонметилазы, гистондезацетилазы, белки, связывающиеся с метилированными остатками цитозина в ДНК, и так называемые «структурные белки гетерохроматина» (HP1 у высших эукариот и Sir — белки у дрожжей).

У позвоночных животных одним из основных инструментов инактивации как протяженных геномных областей, так и отдельных генов или групп генов является метилирование ДНК. Мишенью для работы эукариотических ДНК-метилаз являются симметрично расположенные остатки цитозина в составе СрG-динуклеотидов. В клетках существует поддерживающая ДНК-метилаза (Dnmt1 — DNA methyltransferase 1), которая восстанавливает симметричный характер метилирования после репликации ДНК (рис. 20). В составе Dnmt1 присутствует особый домен, препятствующий осуществлению метилирования de novo. На определенном этапе эмбрионального развития вся ДНК деметилируется и потом избирательно метилируется *de novo*. Этот процесс осуществляется особой группой ДНК-метилаз (Dnmt3a, Dnmt3b). Каким образом на этой стадии обеспечивается избирательный характер метилирования определенных генов или фрагментов генома, в настоящий момент не ясно. В клетке существует целый класс белков, которые связываются с метилированными остатками цитозина.

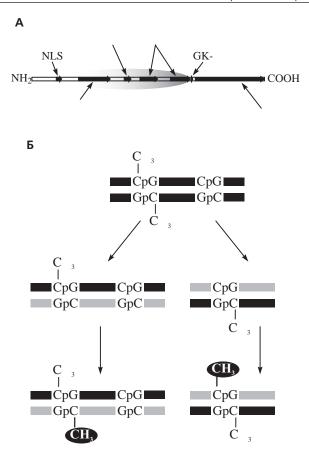


Рис. 20. Метилирование ДНК

За поддержание метилирования ДНК отвечает фермент ДНК-метилтрансфераза 1 — Dnmt1. Слева приведена схема структуры Dnmt1, где отмечены различные функциональные домены белка. Серым выделена часть фермента, препятствующая осуществлению метилирования *de novo*. Схематически изображен (Б) результат работы Dnmt1: после репликации ДНК новосинтезированные молекулы содержат неметилированные и полуметилированные СрG-динуклеотиды. Dnmt1 превращает полуметилированные СрG в полностью метилированные, не затрагивая неметилированные.

Некоторые из этих белков, например MeCP2, содержат репрессорный домен и прямо подавляют транскрипцию. Кроме того, MeCP2 способен привлекать Sin3-комплекс, содержащий гистондезацетилазы HDAC1 и HDAC2. Соответственно, метилирование

ДНК может инициировать процесс дезацетилирования гистонов, результатом которого будет инактивация хроматинового домена. С помощью метилирования ДНК инактивируется транскрипция различных повторяющихся последовательностей, транспозонов и многих тканеспецифичных генов. Специальным случаем инактивации протяженных геномных областей, осуществляющейся при участии метилирования ДНК, является импринтинг, т. е. избирательное выключение только одного из двух родительских аллелей. тельное выключение только одного из двух родительских аллелей. Классическим примером импринтированного локуса является локус генов *IGF2/H19* мыши. Ген *H19* активен только на материнских хромосомах, а ген *IGF2* — только на отцовских хромосомах. В установлении и поддержании импринтинга важную роль играют особые регуляторные последовательности, получившие название «центры выбора импринтинга» (ICR — imprinting choice regions). Это небольшие фрагменты ДНК, которые по-разному метилируются в материнских и отцовских хромосомах (DMR — differentially methylated regions). Механизм работы ICR подробно рассматривается в главе, посвященной инсуляторам. С метилированием остатков цитозина в составе CpG-динуклеотидов связано существование в геномах позвоночных животных так называемых CpG-островков. Метилированный цитозин характеризуется низкой стабильностью и тенденцией к преобразованию в тимин (рис. 21). Поэтому в геноме позвоночных животных существует выраженная диспров геноме позвоночных животных существует выраженная диспро-порция между содержанием CpG-динуклеотидов (представляющих мишени для метилирования цитозинов) и GpC-динуклеотидов, которые не являются мишенями для метилирования. Если бы не было тенденции к конвертации метилированного цитозина в тимин, соотношение между CpG- и GpC-динуклеотидами долж-но бы было быть близким к 1. В действительности же для ДНК позвоночных животных это соотношение составляет около 0,2. позвоночных животных это соотношение составляет около 0,2. Существуют, однако, особые участки генома, в границах которых соотношение CpG/GpC близко к 1. Эти участки, получившие название CpG-островки, обычно являются достаточно короткими (не более 1 т. п. н.) и GC-богатыми. Сохранение в границах CpG-островков среднестатистического соотношения CpG/GpC связано с тем, что в этих участках генома CpG-динуклеотиды не метилируются. Соответственно, не происходит конвертации цитозина в тимин. Метилированию ДНК в границах CpG-островков препятствует связывание с этими областями ряда транскрипционных факторов, прежде всего универсального транскрипционного фактора Sp1 ров, прежде всего универсального транскрипционного фактора Sp1. СрG-островки играют важную роль в функционировании генома позвоночных животных. В пределах СрG-островков расположено

Рис. 21. Мутагенный эффект метилирования ДНК

(A) При дезаминировании, которое в клетке может происходить спонтанно, цитозин превращается в урацил. Так как урацил в норме отсутствует в ДНК, то он легко опознается и удаляется системой репарации. Однако 5-метилцитозин посредством дезаминирования превращается в нормальный для ДНК тимин (Б), в результате чего происходит постепенная замена пар GC (в составе CpG-динуклеотидов) на пары AT.

около 60% всех промоторов, в том числе абсолютное большинство промоторов постоянно экспрессирующихся генов (так называемых генов «домашнего хозяйства») (рис. VIII на цветной вклейке). Промоторы тканеспецифичных генов, как правило, располагаются вне CpG-островков. В тех промоторах, которые располагаются в CpG-островках, все сайты связывания транскрипционных факторов расположены в пределах CpG-островка. В некоторых видах опухолевых клеток происходит *de novo* метилирование ассоциированных с CpG-островками генов, приводящее к инактивации многих генов «домашнего хозяйства», в том числе генов, контролирующих пролиферативный статус клеток.

Многие из неактивных хроматиновых доменов нельзя в строгом смысле слова отнести к гетерохроматину. Конститутивный гетерохроматин локализуется преимущественно в центромерных

и теломерных областях. В формировании компактной хроматиновой конфигурации конститутивного гетерохроматина определенную роль может играть регулярное расположение нуклеосом на повторяющихся последовательностях ДНК. Ключевую роль в формировании компактного гетерохроматина играют особые белки: HP1 (heterochromatin protein 1) у высших эукариот и группа Sir (silent information regulator) белков (Sir1–Sir4) у дрожжей. Белки гетерохроматина (HP1 и Sir) не взаимодействуют непосредственно с ДНК, а узнают определенные сигналы на нуклеосомах. В случае высших эукариот таким сигналом является метилирование лизинового остатка 9 в гистоне Н3. Если стоит вопрос об инактивации транскрипционно-активного домена, то этой модификации должно предшествовать дезацетилирование этого остатка. Гистондезацетилазы могут привлекаться в места формирования неактивных хроматиновых доменов с помощью ряда других белков, в частности белков, содержащих так называемых хромодомен, который участвует в узнавании метилированных остатков лизина в позиции 9 гистона НЗ. Любопытно, что для связывания белка НР1 с хроматином, содержащим метилированный по позиции К9 гистон Н3, необходимо присутствие гистонметилазы (SUV39H1), осуществляющей Н3К9-метилирование. Распространение гетерохроматинового домена обеспечивается тем, что сидящий на хроматине HP1 привлекает SUV39H1, которая осуществляет метилировние лизиновых остатков К9 в соседних молекулах гистона Н3 и одновременно привлекает новые молекулы белка НР1. Последние, в свою очередь, обеспечивают привлечение новых молекул SUV39H1 и их удержание в «точке роста» расширяющегося гетерохроматинового домена (рис. 22).

У дрожжей S. cerevisiae сигналом для связывания Sir2-Sir4 белков с хроматином является дезацетилирование гистонов. Sir2 обладает собственной NAD-зависимой гистондезацетилазной активностью, что может обеспечить процессивное распространение гетерохроматинового домена. Одной из главных мишеней Sir2-дезацетилазы является К16 гистона Н4. Согласно ряду данных, именно дезацетилирование Н4 по К16 является наиболее важным для связывания комплекса Sir-белков. Сайт-специфическое метилирование гистона Н3 по ряду позиций (Н3 по К36, Н3 по К79) препятствует образованию гетерохроматина. Метилирование Н3 по позиции К9, напротив, способствует этому процессу. Помимо Sir-белков, в образовании гетерохроматина участвуют и другие белки, в том числе RAP1 (repressor/activator protein 1).

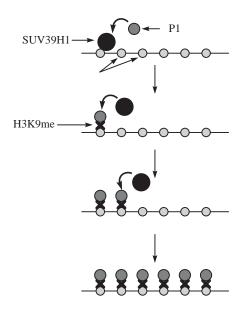


Рис. 22. Расширение гетерохроматинового домена

Гистонметилаза SUV39H1, помимо собственно метилирования гистона H3 в составе нуклеосом по позиции K9, также привлекает белок HP1 за счет межбелковых взаимодействий. Этот белок связывается со свежеметилированным H3 (в силу наличия в его аминокислотной последовательности хромодомена, узнающего метилированный остаток лизина в позиции K9 гистона H3) и, в свою очередь, привлекает SUV39H1. Цепное повторение цикла привлечениеметилирование-привлечение приводит к образованию гетерохроматинового домена.

Для гетерохроматина, стабильно воспроизводящегося в ряду клеточных делений, характерно метилирование гистона Н3 по позиции 27 (Н3К27) и гистона Н4 по позиции 20 (Н4К20). Метилирование Н3 по К27 и Н4 по К20 характерно, в частности, для неактивной копии X хромосомы в женских клетках млекопитающих. Стоит отметить, что уровень метилирования этих аминокислотных остатков пока что остается неясным. Большинство данных указывает на наличие одной метильной группы на Н4К20. Сведения же о Н3К27 на данный момент крайне противоречивы.

Долгое время считалось, что метилирование гистонов является необратимой модификацией. В настоящее время обнаружена группа гистондеметилаз, которые способны удалять метильные группы, присоединенные к лизиновым остаткам в ряде специфических

позиций аминокислотных цепей гистонов Н3 и Н4 (см. разд. 2.1). Любопытно, что метилирование по всем этим позициям связано с активацией или обратимой инактивацией хроматиновых доменов. До сих пор не обнаружено гистондеметилаз, удаляющих метильные группы, маркирующие гистоны конститутивно неактивного хроматина (Н3К27 и Н4К20). В связи с этим неактивные хроматиновые домены являются достаточно статичными. В неделящихся клетках такие домены не могут быть активированы.

Взаимосвязь между метилированием ДНК и метилированием гистонов не до конца изучена. У некоторых организмов, например у *Drosophila melanogaster*, система метилирования ДНК вообще отсутствует, что не мешает формированию неактивных доменов, поддерживающихся с помощью метилирования гистонов. Мутация, нарушающая функцию Н3 lys9-метилтрансферазы (у дрожжей и *Neurospora crassa*), препятствует нормальному метилированию ДНК. Как уже говорилось выше, в некоторых опухолевых клетках происходит *de novo* метилирование ассоциированных с CpG-островками генов. Этому процессу предшествует триметилирование лизина 27 в гистоне H3. Это позволяет предположить, что метилирование ДНК является вторичной модификацией (по отношению к метилированию гистонов), которая закрепляет неактивный статус геномного домена.

Сравнительно недавно было продемонстрировано, что один из путей формирования неактивных хроматиновых доменов связан с сумоилированием N-концевой области гистона H4. Эта модификация способствует привлечению гистондезацетилаз и белка HP1, о роли которых в создании неактивных хроматиновых доменов уже говорилось выше.

Как и в случае активных хроматиновых доменов, формирование неактивных доменов должно инициировать некое первоначальное событие. В настоящее время известно несколько механизмов инициации формирования неактивных доменов. Прежде всего следует упомянуть о роли системы РНК-интерференции. Хотя первоначально РНК-интерференция рассматривалась исключительно как механизм пост-транскрипционной инактивации генов, в настоящее время получены убедительные свидетельства того, что одновременно с расщеплением РНК, комплементарной малым интерферирующим РНК, происходит инактивация соответствующих участков генома. При этом инициируется процесс метилирования гистона Н3 по лизину К9. Механизм сопряжения РНК-интерференции и процесса образования гетерохроматиновых доменов изучен не до конца. Тем не менее с помощью генетических подходов было продемонстрировано, что у делящихся дрожжей (Schizosaccaromyces pombe) многие ключевые компоненты системы РНК-интерференции — Аргонавт 1 (Aurgonaute 1), Дайсер (Dicer), РНК-зависимая РНК-полимераза (Rdp1) — необходимы для формирования гетерохроматина. У дрозофилы инактивация различных компонентов системы РНК-интерференции (piwi, aubergine, homeless) также приводит к утрате гетерохроматиновых доменов, сопровождающейся снижением уровня метилирования НЗ по позиции К9 и делокализацией НР1. Делокализация НР1 и утрата НЗК9 метилирования характерна и для клеток позвоночных животных, дефектных по гену, кодирующему Дайсер. С помощью сайт-специфичного мутагенеза продемонстрировано, что один и тот же домен белка Аргонавт (мотив аспартат-аспартатгистидин) необходим для формирования гетерохроматина и для работы нуклеазы, разрезающей РНК, комплементарную малой интерферирующей РНК. Таким образом, весьма вероятным является предположение, что именно малая интерферирующая РНК определяет мишени для инициации формирования гетерохроматиновых доменов. В связи со всем вышесказанным следует обратить внимание на то обстоятельство, что мишенью для действия малых интерферирующих РНК является первичный транскрипт. И тогда представления, что ключевую роль в формировании многих гетерохроматитиновых доменов играет система РНК-интерференции, могут показаться абсурдными. Действительно, в течение многих лет было принято считать, что гетерохроматиновые области, в частности прицентромерный гетерохроматин, вообще не транскрибируются. Эксперименты последних лет продемонстрировали, что эти представления неверны. На ряде моделей было показано, что прицентромерный хроматин транскрибируется, хотя уровень транскрипции является достаточно низким. Более того, при внедрении в прицентромерный район полной или частичной инактивации подвергаются только те трансгены, которые локализуются внутри транскрибируемой области.

Особый механизм используется для поддержания неактивного статуса так называемых гомеобоксных генов, экспрессия которы

внутри транскрибируемой области.

Особый механизм используется для поддержания неактивного статуса так называемых гомеобоксных генов, экспрессия которых необходима лишь на определенных стадиях развития эмбриона. Инактивация этих генов или, точнее говоря, поддержание их неактивного состояния в ряду клеточных поколений обеспечивается белками группы Polycomb. Наиболее хорошо изучены механизмы репрессии генов белками Polycomb в клетках дрозофилы. В этих клетках белки группы Polycomb формируют два репрессорных комплекса PcG1 и PcG2. Последний называют еще Esc-E(z) (extra sex

combs — enhancer of zeste). Как и многие другие белки дрозофилы, белки группы Polycomb получили названия, происходящие от названий мутаций, нарушающих функцию этих белков. Основными компонентами комплекса PC1 являются белки Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior seh combs (PSC) и RING. Наиболее важным свойством белка Polycomb является наличие хромодомена, практически идентичного хромодомену белка НР1. Тем не менее мишенью для связывания белка Polycomb является только Н3, метилированный по К27, тогда как НР1 связывается с Н3, метилированным по К9. Высокая специфичность связывания Polycomb и HP1 с H3, метилированным по K27 и по K9, соответственно, по-видимому, определяется аминокислотными остатками лежащими за пределами хромодомена. Белок RING (SCE) обладает убиквитинлигазной активностью, специфичной в отношении лизинового остатка 119 гистона H2A. Белок PSC необходим для удержания всех четырех компонентов в составе комплекса. Конкретные функции белка РН в составе РС1 комплекса неизвестны. Наряду с основными компонентами РС1 комплекс может включать и многие другие белки, в частности ТВР — белок, играющий ключевую роль в посадке РНК-полимеразы II на промоторы (см. разд. 2.8). Наиболее важным компонентом комплекса РС2 является белок-продукт гена E(z) — enhanser of zeste¹). В аминокис-ный для гистонметилаз. Действительно, в составе комплекса РС2 (но не в изолированном виде) Е(z) проявляет гистонметилазную активность, специфичную в отношении лизинового остатка 27 (К27) гистона Н3.

В геноме дрозофилы имеются особые последовательности ДНК, которые служат местами посадки РС1 и РС2 комплексов. Эти последовательности называют PRE (Polycomb responce elements). Как именно обеспечивается посадка PC1 и PC2 на PRE, в настоящий момент не известно. Разные PRE не имеют выраженной гомологии. В составе PRE присутствует много участков узнавания для различных сиквенс-специфичных ДНК-связывающих белков, в том числе PHO, GAGA, zeste. Лишь один из этих белков (Pleiohomeotic, PHO) входит в состав комплекса PC2. В составе базового комплекса РС1 ДНК-связывающих белков вообще нет.

¹ Этот ген был обнаружен еще до того, как термин «энхасер» закрепился за определенным элементами генома. Разумеется, энхансеры в том смысле, который вкладывается в этот термин сейчас, являются регуляторными элементами, а не генами, и уж тем более — не белками. Но в данном случае «enhancer» означает буквально «усилитель», и не более того.

Считается, что связывание PC-комплексов с PRE-элементами обеспечивается рядом вспомогательных белков, которые не являются основными компонентами этих комплексов. Согласно наиболее популярной на настоящий момент модели, комплекс РС2 первым связывается с PRE-элементом и осуществляет метилирование Н3 по К27, которое необходимо для привлечения PC1-комплекса. Как развиваются события в дальнейшем, не вполне ясно. PRE-элементы часто находятся на большом расстоянии (десятки тысяч нуклеотидных пар) от контролируемых ими генов. Существуют две модели, объясняющие процесс инактивации генов, находящихся под контролем PRE. Первая модель предполагает, что посаженные на PRE комплексы PcG1 и PcG2 непосредственно что посаженные на PRE комплексы PcG1 и PcG2 непосредственно взаимодействуют с промотором и обеспечивают его инактивацю. При этом протяженный участок хроматиновой фибриллы, который разделяет PRE и промотор, должен выпетливаться. В качестве одного из аргументов в пользу этой модели приводится тот факт, что подавления транскрипции не происходит, если между PRE-элементом и промотором поместить инсулятор. Вторая модель репрессии удаленных промоторов белками Polycomb была сформулирована после того, как в составе PC2-комплекса обнаружили гистонметилазную активность, специфичную в отношении H3K27. Эта модель предполагает, что после посадки PC-комплексов на PRE-элемент инициируется формирование распространяющегося

тистонметилазную активность, специфичную в отношении нэк27. Эта модель предполагает, что после посадки РС-комплексов на PRE-элемент инициируется формирование распространяющегося гетерохроматинового домена, для образования которого существенно взаимодействие белка Polycomb с H3, триметилированным по K27. При этом могут работать механизмы, аналогичные тем, которые обеспечивают формирование гетерохроматиновых доменов при участии HP1 и H3K9-метилирования.

У млекопитающих обнаружены гомологи большинства компонентов РС-комплексов дрозофилы, в том числе и двух компонентов, которые представляются на настоящий момент ключевыми. Гомологами белка Polycomb дрозофилы в клетках человека являются HPC (human polycomb) 1, 2 и 3. В аминокислотной последовательности HPC присутствует хромодомен, обеспечивающий связывание этих белков с триметилированным по K27 гистоном H3. Гомологами белков Esc-E(z) дрозофилы являются EED-EZH2. Находясь в комплексе, эти белки обладают гистонметилазной активностью, специфичной в отношении H3K27. В клетках млекопитающих не обнаружено PRE-элементов. В то же время продемонстрировано, что HPC-белки принимают участие в поддержании неактивного статуса многих генов, в том числе и в неактивной копии X хромосомы. Таким образом, вероятным

механизмом репрессии генов белками Polycomb в клетках млекопитающих представляется создание неактивных хроматиновых доменов путем распространяющегося H3K27-метилирования, осуществляемого EED-EZH2, и с помощью HPC-белков, связывающихся с H3, триметилированным по K27.

В течение многих лет считалось, что белки группы Polycomb участвуют в репрессии весьма небольшой группы генов (гены гомеобоксных белков). Сейчас появились основания для пересмотра этой точки зрения. Было показано что белки группы Polycomb обеспечивают инактивацию глобиновых генов в неэритроидных клетках. Не исключено, что в ближайшее время список тканеспецифичных генов, которые инактивируются при участии белков Polycomb, будет существенно расширен.

- Неактивные хромативные домены (гетерохроматин) формируются с помощью особых архитектурных белков хроматина (HP1, Polycomb, MeCP2).
- Связывание с нуклеосомами необходимых для формирования неактивного хроматина белков регулируется метилированием ДНК и модификациями гистонов.
- Наиболее важными для формирования неактивных хроматиновых доменов модификациями гистонов являются метилирование гистона Н3 по позициям К9 и К27 и метилирование гистона Н4 по позиции К20.
- Процессивное метилирование гистона Н3 по позиции К9 и сопряженный с ним процесс формирования гетерохроматина осуществляются при участии гистонметилазы SUV39H1 и белка гетерохроматина HP1.
- Создание неактивных хроматиновых доменов, в формировании которых участвует белок HP1, инициируется системой PHK-интерференции.
- Для неактивных доменов, организованных при участии белка Polycomb, характерно метилирование гистона НЗ по позиции К27.

2.5. ПОГРАНИЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДОМЕНОВ

Процесс распространения активирующего сигнала (например, ацетилирования гистонов) вдоль генома не может быть безграничным. Это привело бы к активации генов, которые не должны

экспрессироваться в данном типе клеток, и к общему нарушению регуляции всей работы генома. То же можно сказать и в отношении бесконтрольного распространения неактивных гетерохроматиновых доменов. Оно может привести к инактивации тех генов, которые должны экспрессироваться в данном типе клеток. Неудивительно, что, помимо сложного комплекса позитивных регуляторных элементов, в геноме существуют и специальные пограничные элементы, подавляющие влияние на геномный домен регуляторных элементов и хроматиновых структур, находящихся за его пределами. Полноценные пограничные элементы геномных доменов обладают двумя функциональными активностями: способностью ограничивать распространение сигналов, исходящих из тех или иных хроматиновых структур (барьерная функция), и способностью ограничивать действие *цис*-регуляторных элементов. Классическим тестом, позволяющим продемонстрировать наличие второго из перечисленных эффектов (получившим название личие второго из перечисленных эффектов (получившим название эффекта инсуляции), является помещение изучаемого регуляторного элемента между энхансером и промотором (enhancer-blocking assay). Инсулятор полностью блокирует активность энхансера в отношении промотора, расположенного за инсулятором, не оказывая прямого негативного влияния на работу промотора или энхансера самого по себе (рис. 23). Способность инсулятора ограничивать распространение сигналов из хроматина может быть продемонстрирована в экспериментах по защите от эффекта положения. При интеграции репортерного гена в случайную геномную позицию этот ген может оказаться в активном либо неактивном хроматиновом домене и, соответственно, будет активен либо неактивен. Ген, оказавшийся рядом с центромерным участком, может быть активным в одних клетках и неактивным в других клетках, в силу того что центромерный гетерохроматин имеет тенденцию распространяться на соседние области. Этот процесс постепенно затухает; область распространения гетерохроматина оказывается неодинаковой в разных клетках. Если перед интеграцией в эктопическую геномную позицию ген поместить в конструкцию, в составе которой сам ген и контролирующие его работу регуляторные элементы будут заключены между двух инсуляторов, то ген будет экспрессироваться во всех случаях, так как инсуляторы будут блокировать распространение гетерохроматина.

Примером инсуляторов являются scs- и scs'-элементы, фланкирующие локус генов теплового шока дрозофилы. Помимо способности блокировать работу энхансеров, эти элементы обладают также способностью препятствовать распространению хроматиновом домене и, соответственно, будет активен либо неак-

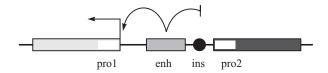


Рис. 23. Инсулятор блокирует действие энхансера

Инсулятор (ins) — это такой регуляторный элемент, который, находясь между энхансером (enh) и промотором (pro2), препятствует активации последнего. При этом собственно активность энхансера не изменяется, и промотор с другой стороны энхансера (pro1) по-прежнему активируется энхансером. Это отличает инсулятор от сайленсера, который просто подавляет активность энхансера. Если бы в рассматриваемой модельной системе на месте инсулятора был сайленсер, то активность энхансера не проявлялась бы в отношении обоих промоторов.

негативных хроматиновых сигналов. Будучи помещены с обеих сторон от трансгена, scs-элементы защищают трансген от позиционных эффектов. Таким образом, scs-элементы проявляют обе принципиальные активности пограничных элементов геномных доменов. Наиболее хорошо изученными инсуляторами дрозофилы являются инсуляторы, работающие при участии белков su(Hw) (suppressor of Hairy-wing) и Mod(mdg4) (modifier of mgd4). Первый такой инсулятор был обнаружен в составе ретротранспозона Соріа. В последующем участки связывания su(Hw) были обнаружены в различных местах генома, не являющихся местами интеграции ретротранспозона Соріа. Инсулятор, присутствующий в составе Соріа, обладает обеими инсуляторными активностями (блокирование действия энхансеров и защита трансгенов от позиционных эффектов). Продемонстрировано, что два таких инсулятора могут взаимодействовать, замыкая расположенный между ними фрагмент хроматиновой фибриллы в петлю.

У позвоночных животных наиболее хорошо изучен инсулятор, расположенный на 5'-конце домена β-глобиновых генов кур. Этот инсулятор также является полноценным, т. е. обладает блокирующей действие энхансеров активностью и активностью хроматинового пограничного элемента. С помощью направленного мутагенеза было продемонстрировано, что за проявление этих активностей отвечают участки связывания разных белковых факторов. Для работы блокирующего действие энхансеров элемента принципиально важным является участок связывания многофункционального белка СТСГ. Этот белок играет ключевую

роль в работе всех ныне известных блокирующих действие энхансеров элементов позвоночных животных. В то же время СТСГ выполняет и некоторые другие функции, участвуя в активации одних генов и подавлении экспрессии ряда других. СТСГ является достаточно большим белком (130 кДа), в составе которого присутствует 11 цинковых пальцев. Благодаря различным комбинациям цинковых пальцев, СТСГ может связываться с широким кругом последовательностей-мишеней на ДНК, а также узнавать другие белки. Этим объясняется полифункциональность данного белка. Экспериментально продемонстрировано, что СТСГ может организовывать хроматиновую фибриллу в петли и участвует в прикреплении ДНК к скелетной структуре ядра — ядерному матриксу. В настоящее время в геномах позвоночных животных обнаружен целый ряд СТСГ-зависимых энхансер-блокирующих элементов, которые не обладают барьерной функцией. Несмотря на это, в литературе такие элементы также нередко называют инсуляторами. Поэтому всегда следует обращать внимание на то, какие именно тесты были использованы для идентификации того или иного инсулятора.

какие именно тесты были использованы для идентификации того или иного инсулятора.

Связыванию СТСГ с ДНК препятствует метилирование СрG-динуклеотидов в границах участка связывания. Поэтому метилирование ДНК может инактивировать инсулятор. Этот механизм инактивации инсулятора играет важную роль в работе центров контроля импринтинга (imprinting choice region, ICR). В качестве примера рассмотрим работу ICR в локусе Igf2/H19 генома мыши (рис. 24). ICR находится между генами Igf2 и H19 в непосредственной близости от гена H19. В составе ICR присутствует СТСГ-зависимый инсулятор. В материнском геноме этот инсулятор препятствует активации гена Igf2 энхансерами, расположенными за геном H19. Ген H19 активно транскрибируется, так как между этим геном и энхансерами нет инсуляторов. В отцовском геноме ICR метилируется. Это приводит к инактивации инсулятора, так как метилирование участка узнавания препятствует связыванию СТСГ. Энхансеры, расположенные за геном H19, получают доступ к промотору гена Igf2. В результате этот ген активно транскрибируется. В то же время метилирование ICR стимулирует образование относительно короткого неактивного домена, захватывающего промоторную область гена H19. В результате в отцовском геноме этот ген инактивируется.

После того как в геноме дрозофилы были обнаружены первые инсуляторы (*scs*- и *scs* '-элементы, фланкирующие локус генов теплового шока), преобладающим было мнение о том, что главной

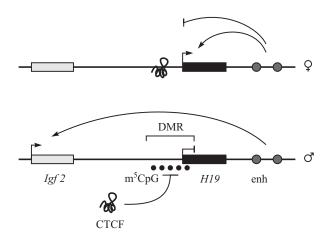


Рис. 24. Схема функционирования ICR в локусе Igf2/H19 мыши

Между генами Igf2 и H19 расположен район, по-разному метилированный в материнских и отцовских хромосомах, — DMR (differentially methylated region). Он захватывает СТСF-зависимый инсулятор и промотор гена H19. В материнской хромосоме DMR неметилирован. СТСF свяывается с инсулятором и блокирует активацию Igf2 нижерасположенными энхансерами. В то же время эти энхансеры стимулируют работу промотора H19. В результате на материнской хромосоме Igf2 репрессирован, а H19 активен. В отцовской хромосоме ДНК в границах DMR метилирована по динуклеотидам CpG. Это блокирует связывание СТСF. В результате инсулятор инактивируется и энхансеры получают возможность стимулировать работу промотора гена Igf2. В то же время, метилирование промоторной области блокирует экспрессию H19. В итоге на отцовской хромосоме, наоборот, Igf2 активен, а H19 — инактивирован.

функцией инсуляторов является обозначение границ геномных доменов. Эта точка зрения нашла подтверждение при изучении некоторых «классических» доменов, например домена β-глобиновых генов кур, на 5'-границе которого расположен полноценный инсулятор, и на 3'-границе — энхансер-блокирующий элемент. Однако последующие исследования показали, что на границах многих «классических» доменов тканеспецифичных генов, характеризующихся зависящим от типа клеточной дифференцировки профилем ДНКазной чувствительности, инсуляторы отсутствуют. Одновременно было обнаружено, что инсуляторы и энхансер-блокирующие элементы могут находиться и внутри геномных доменов. Например, в домене α-глобиновых генов кур группа СТСГ-зависимых энхансер-блокирующих элементов располагается между кластером глобиновых генов и удаленным регуляторным элемен-

том, контролирующим работу этого кластера. Во многих работах пытались выявить соответствие между позициями инсуляторов и позициями MAR-элементов, участвующих в организации участков прикрепления петель ДНК к ядерному матриксу. В большинстве случаев такого соответствия обнаружить не удалось. В настоящее время вопрос о функциях инсуляторов остается дискуссионным. Рядом ученых развиваются представления о том, что наиболее важной функцией этих элементов является установление и поддержание контактов между различными участками хромосомы и даже разными хромосомами, т. е. поддержание пространственной организации генома. В связи с этим следует напомнить о том, что способность белков СТСГ и su(Hw) организовывать ДНК в петли была продемонстрирована с помощью ряда различных экспериментальных подходов.

- Инсуляторами называют геномные элементы, препятствующие действию энхансера на расположенный за инсулятором промотор и препятствующие распространению неактивных хроматиновых доменов.
- Две характерные для инсулятора активности обеспечиваются разными механизмами и могут быть разделены.
- У позвоночных животных основную роль в блокировании действия энхансеров играет белок СТСГ. Для осуществления другой активности инсуляторов (ограничение распространения гетерохроматинового домена) этот белок не существенен.
- Инсуляторы играют важную роль в в установлении импринтинга.

2.6. ГЕНОМНЫЕ ДОМЕНЫ ОТКРЫТОГО ТИПА (ДОМЕНЫ С РАЗМЫТЫМИ ГРАНИЦАМИ)

Было бы весьма заманчивым представить весь геном в виде мозаики единообразно организованных активных и неактивных доменов, механизмы формирования которых описаны выше. В действительности организация генома является более сложной. Широкомасштабное изучение организации геномов различных организмов (прежде всего, генома человека) показало, что существует множество «неканонических» доменов, в том числе доменов с перекрывающимися генами и регуляторными системами. Даже домен гена лизоцима кур, характеризующийся зависящей от типа клеток чувствительностью к ДНКазе I, оказался комплексным, так как внутри этого домена находится еще один ген (cGas41), который экспрессируется в различных типах клеток, в том числе и в клетках, не экспрессирующих лизоцим. При этом локус лизоцима кур предпочтительно чувствителен к нуклеазам лишь в клетках, экспрессирующих лизоцим. Ген cGas41 экспрессируется в клетках, в которых соответствующий домен не является предпочтительно чувствительным к нуклеазам. Таким образом, корреляция между экспрессией гена и предпочтительной чувствительностью соответствующего домена к нуклеазам не является абсолютной. Это подтверждают и некоторые другие примеры: в неэритроидных клетках β-глобиновые гены абортивно транскрибируются, несмотря на то, что в этих клетках домен β-глобиновых генов метилирован и находится в ДНКазо-устойчивой конфигурации.

Домены α-глобиновых генов позвоночных еще в меньшей степени соответствуют «классической» модели, чем домен гена лизоцима кур. Эти домены расположены в богатой генами хромосомной области и являются предпочтительно-чувствительными к нуклеазам во всех типах клеток. Непосредственно перед кластером α -глобиновых генов расположен ген, который транскрибируется во всех изученных типах клеток. У человека этот ген носит довольно странное название «-14», так как его промотор расположен на расстоянии 14 т. п. н. перед первым из генов α-глобинового кластера. Напоминающий область контроля локуса (LCR) регуляторный элемент домена α-глобиновых генов расположен в одном из интронов гена «-14». Существуют и другие примеры перекрывающихся геномных доменов у высших эукариот. Обнаружение такого рода перекрывающихся доменов потребовало теоретического переосмысления доменной гипотезы организации генома. Было предложено различать домены с четкими границами и домены с невыраженными границами. Понятно, что регуляторные системы доменов с невыраженными границами должны существенно отличаться от регуляторных систем доменов с фиксированными границами. Дополнительной задачей регуляторных систем доменов с невыраженными границами является различение «своих» и «чужих» мишеней, которые могут находиться в непосредственной близости. По-видимому, это достигается на пути повышения специфичности взаимодействия энхансеров и сайленсеров с промоторами находящихся под их контролем генов.

Тест на предпочтительную чувствительность к ДНКазе сыграл важную роль в идентификации геномных доменов с четкими границами. Этот подход не может быть использован для изучения ге-

номных доменов открытого типа. Тем не менее существуют пути установления приблизительных границ таких доменов. Один из них заключается в изучении распределения тканеспецифичных участков гиперчувствительности к ДНКазе І. Последние указывают на позиции специфичных для данного типа ткани регуляторных элементов. В качестве примера можно рассмотреть домен α -глобиновых генов позвоночных животных. Регуляторные элементы, контролирующие работу этого домена, активны только в эритроидных клетках. Здесь они колокализуются с участками гиперчувствительности к ДНКазе І. Так, в эритроидных клетках гиперчувствительными к ДНКазе І являются места локализации промоторов α -глобиновых генов. В клетках, дифференцированных по другим путям, соответствующие промоторам α -глобиновых генов участки гиперчувствительности к ДНКазе І отсутствуют. То же можно сказать и про эритроид-специфичные участки гиперчувствительности к ДНКазе I, колокализующиеся с удаленными регуляторными элементами домена α -глобиновых генов. Таким образом, включающая собственно кластер α -глобиновых генов более протяженная геномная область, в которой присутствуют эритроид-специфичные участки гиперчувствительности к ДНКазе I, может рассматриваться как домен α -глобиновых генов. Приблизительные границы этого домена можно установить и анализируя профили распределения некоторых модификаций гистонов (прежде всего, ацетилирования по ряду позиций) (рис. 25).

приолизительные границы этого домена можно установить и анализируя профили распределения некоторых модификаций гистонов (прежде всего, ацетилирования по ряду позиций) (рис. 25).

Как уже говорилось, домены с невыраженными границами всегда находятся в потенциально активной (предпочтительно чувствительной к ДНКазе) конфигурации. В таких доменах актуальной является задача поддержания неактивного статуса домена в большинстве типов клеток. Эта задача решается с помощью сайленсеров разного уровня действия (подавляющих экспресиию одного гена или группы сцепленных генов).

одного гена или группы сцепленных генов).

Особую проблему в перекрывающихся доменах составляет возможность перекрестного действия регуляторных элементов различных генов. Действительно, одной из важных характеристик «классических» энхансеров является их способность активировать практически любые промоторы. В последние годы, однако, обнаружено большое число энхансеров, которые способны избирательно активировать определенные промоторы. В качестве примера укажем на энхансеры имагинальных дисков D. melanogaster. Эти энхансеры располагаются между геном decapentaplegic (dpp) и двумя другими генами (oaf и slh), которые экспрессируются не одновременно с геном dpp. Оказалось, что

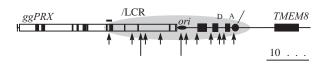


Рис. 25. Организация домена α -глобиновых генов кур

Схема домена, показывающая расположение генов, энхансеров и участка начала репликации (ori). Глобиновые гены (π , α^D и α^A) показаны черными прямоугольниками. Расположенный перед доменом ген «домашнего хозяйства» ggPRX показан светлым прямоугольником. Вертикальные черные линии внутри этого прямоугольника показывают позиции экзонов. Ген $\mathit{TMEM6}$ представляет собой открытую рамку считывания, которая предположительно кодирует трансмембранный белок. Под схемой стрелками обозначены участки гиперчувствительности к ДНКазе I: короткими — эритроид-специфичные, длинными — перманентные. Серой областью показана позиция домена гиперацетилирования гистонов, возникающего в пре-эритробластах.

энхансеры имагинальных дисков способны активировать промотор гена dpp, но не промоторы генов oaf и slh. Замена промотора гена *oaf* промотором гена теплового шока делает этот ген зависимым от энхансера имагинальных дисков (рис. 26). Таким образом, некие особенности организации промоторов генов oaf и slh делают эти промоторы нечувствительными к энхансеру имагинальных дисков, что позволяет последнему избирательно активировать экспрессию гена dpp. Можно привести и другие примеры избирательного действия энхансеров на определенные промоторы. Понятно, что такого рода избирательность может обеспечить необходимую специфичность работы регуляторных систем различных генов, расположенных в перекрывающихся доменах. Работа этих регуляторных механизмов может дополнительно модулироваться инактивируемыми инсуляторами, например инсуляторами, которые инактивируются CpG-метилированием. Эти регуляторные элементы могут разделять домен на динамические функциональные зоны (субдомены), в рамках которых возможно сконцентрировать работу позитивных регуляторных механизмов на промоторе одного гена или промоторах нескольких функционально-связанных генов.

 Геномные домены открытого типа находятся в богатых генами областях и содержат перемежающиеся гены домашнего хозяйства и тканеспецифичные гены.

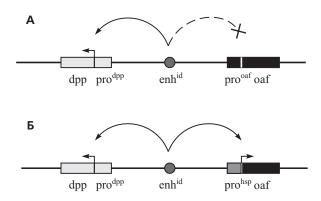


Рис. 26. Функциональная изоляция регуляторных механизмов

В доменах, содержащих перекрывающиеся неродственные гены, важную роль играет функциональная изоляция регуляторных систем. Одним из механизмов такой изоляции является существенное повышение специфичности влияния энхансера на определенный промотор или группу промоторов. У D. melanogatser энхансер имагинальных дисков (enh^{id}) расположен между генами dpp и oaf, но активирует только промотор гена dpp, но не oaf (A). Если генно-инженерными манипуляциями заменить собственный промотор гена oaf на промотор гена белка теплового шока (pro^{hsp}) , то ген oaf приобретает способность активироваться энхансером enh^{id} (Б).

- Геномные домены открытого типа находятся в потенциально активной (предпочтительно чувствительной к ДНКазе I) хроматиновой конфигурации во всех типах клеток.
- Приблизительные границы геномных доменов открытого типа можно установить при изучениии распределения тканеспецифичных участков гиперчувствительности к ДНКазе I и распределения модифицированных форм гистонов.
- В геномных доменах открытого типа существенное значение имеет разграничение регуляторных систем, контролирующих экспрессию тканеспецифичных и постоянно экспрессирующихся генов. Это достигается при участии инсуляторов и энхансеров, специфичных в отношении индивидуальных промоторов или небольшой группы промоторов, контролирующих экспрессию функционально связанных генов.

2.7. ДИНАМИКА НУКЛЕОСОМ И НУКЛЕОСОМНЫХ ФИБРИЛЛ

В предыдущих разделах подробно рассматривались организация нуклеосом и способы упаковки нуклеосомной фибриллы в структуры высшего порядка, в частности в 30-нм фибриллу и более плотно упакованные гетерохроматиновые структуры. Для понимания роли этих структур в регуляции работы генома важно знать, насколько статичными они являются. Один из подходов к решению этого вопроса заключается в установлении времени обмена белков, участвующих в формировании тех или иных хроматиновых структур. Для этого используют экспериментальный подход, получивший название FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Принцип метода состоит в следующем. В клетках экспрессируют химерный белок, содержащий изучаемый компонент хроматина, слитый с флуоресцирующим белком (например, с зеленым флуоресцентным белком, GFP). В большинстве случаев такие химерные белки упаковываются в нуклеосомы и другие хроматиновые структуры, хотя этот факт требует специального подтверждения в каждом конкретном случае. Предположим, что в клетках экспрессирован конкретном случае. Предположим, что в клетках экспрессирован гистон Н3, слитый с GFP. После включения этого химерного белка в нуклеосомы весь хроматин будет иметь зеленую окраску при помещении клеток под флуоресцентный микроскоп. При достаточно интенсивном освещении клеток светом с длиной волны, вызывающей возбуждение флуорохрома, происходит его обесцвечивание (bleaching). Существуют устройства, позволяющие направить лазерный луч на часть клеточного ядра и вызвать обесцвечивание флуорохрома в этой части ядра. В том случае, когда содержащий флуорохром белок не связан (т. е. не входит в состав стабильных иммобилизованных комплексов), свечение восстанавливается иммобилизованных комплексов), свечение восстанавливается в течение короткого промежутка времени после облучения (рис. IX на цветной вклейке). Это происходит благодаря обмену белков, находящихся в облученной и необлученной частях ядра. Время, необходимое для восстановления флуоресценции в облученной части ядра, будет обратно пропорционально скорости обмена содержащего флуоресцентную метку белка. Эксперименты подобного рода продемонстрировали, что скорость обмена белков нуклеосомного ядра является чрезвычайно низкой. Для гистонов Н2А и Н2В она составляет несколько часов, скорость обмена гистонов Н3 и Н4 еще ниже. После включения в состав тетрамера эти гистоны не обмениваются в течение нескольких клеточных поколений. В то же время скорость обмена гистона H1 измеряется минутами, а белка гетерохроматина HP1 — секундами (2–20 с). Это указывает

на то, что, в противоположность нуклеосомным глобулам, хроматиновые структуры высших порядков являются весьма динамичными. В каждый конкретный момент времени существует равновесие между более компактными и менее компактными структурами. Но это не значит, что происходит обратимая декомпактизация протяженных гетерохроматиновых доменов — динамические переходы между различными хроматиновыми структурами высших порядков имеют узко локальный характер. Тем не менее при этом периодически обеспечивается возможность взаимодействия различных регуляторных белков даже с теми последовательностями ДНК, которые упакованы в компактный гетерохроматин.

- В противоположность нуклеосомам, хроматиновые структуры высших порядков являются крайне динамичными. В каждый конкретный момент времени существует сложное равновесие между более компактными и менее компактными конфигурациями хроматиновых фибрилл (начиная с 30-нм фибриллы).
- Динамичность хроматиновых структур высших порядков обеспечивает возможность взаимодействия регуляторных белков даже с последовательностями ДНК, расположенными в наиболее компактных гетерохроматиновых доменах.

2.8. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ У ЭУКАРИОТ

В эукариотических клетках разные группы генов транскрибируются различными РНК-полимеразами. РНК-полимераза I транскрибирует гены предшественника основных рибосомных РНК. РНК-полимераза III транскрибирует гены, коротких — 5S рибосомных и транспортных — РНК. Гены, кодирующие абсолютное большинство клеточных белков, транскрибируются РНК-полимеразой II. Поэтому мы будем говорить в этом разделе только о регуляции работы генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II.

шинство клеточных белков, транскрибируются РНК-полимеразой II. Поэтому мы будем говорить в этом разделе только о регуляции работы генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II. Основная особенность систем регуляции транскрипции в эукариотической клетке связана с тем, что мишенью для регуляторных сигналов является ДНК, организованная в хроматин. Это значительно расширяет возможности избирательной активации генов. Регуляция транскрипции осуществляется на двух основных уровнях: активация хроматинового домена и активация собственно промотора, условием которой часто является удаление либо перемещение расположенных на промоторе нуклеосом. Активация хроматиновых доменов подробно рассматривается в разд. 2.3. Здесь обсуждается цепь событий, приводящая к активации индивиду-

обсуждается цепь событий, приводящая к активации индивидуальных промоторов.

Промотор является ключевым элементом системы регуляции транскрипции у прокариот, в клетках которых существуют конститутивные и индуцибельные промоторы. В последнем случае активация промотора осуществляется с помощью регуляторных белков. Значение промотора сохраняется и в эукариотических клетках. Важным отличием эукариотических промоторов, однако, является то, что в определении их позиций значительную роль играют эпигенетические факторы.

В составе большинства эукариотических промоторов присутствуют ТАТА-бокс и инициаторная последовательность (inr). ТАТА-бокс, находящийся обычно на расстоянии 25–30 п. н. от старта транскрипции, у эукариот имеет менее консервативный характер, чем у прокариот. Роль ТАТА-бокса может играть почти любая АТ-богатая последовательность. Последовательность inr представляет собой так называемый пиримидиновый бокс

характер, чем у прокариот. Роль ТАТА-бокса может играть почти любая АТ-богатая последовательность. Последовательность *inr* представляет собой так называемый пиримидиновый бокс (YYANWYY¹) и находится непосредственно у точки старта транскрипции. Существует много компьютерных программ, позволяющих предсказывать позиции эукариотических промоторов. К сожалению, найденные с помощью этих программ промоторы далеко не всегда работают в живых клетках. Основная проблема с предсказанием позиций эукариотических промоторов заключается в том, что эти предсказания делаются на основе анализа последовательности ДНК без учета эпигенетических факторов. Между тем позиции активных промоторов в значительной мере определяются на уровне организации ДНК в хроматиновую фибриллу. Инициаторный комплекс РНК-полимеразы ІІ является слишком большим для того, чтобы его можно было собрать на межнуклеосомном спейсере. Для сборки этого комплекса промотор должен быть тем или иным образом освобожден от нуклеосом. Это может быть обеспечено рядом механизмов. Во многих случаях достаточно привлечения к промоторной области фактора (факторов) ремоделирования хроматина. Этот процесс может осуществляться при участии тканеспецифичных транскрипционных факторов. Важную роль играет также локальное ацетилирование гистонов, в том числе гистона Н2А. Z в промоторных областях. Согласно последним данным, гистон Н2А. Z присутствует как в активных, так и в неактивных промоторах, и именно его ацетилирование существенно для активации промотора. Показано, что

Однобуквенный код для обозначения нуклеотидов приведен в приложении.

для поддержания свободного от нуклеосом участка в промоторной области он должен быть фланкирован двумя нуклеосомами, содержащими гистон Н2А. Z. Следует особо отметить, что гистон Н2А. Z. включается в нуклеосомы по независимому от репликации пути. Это обеспечивает возможность избирательной активации промоторов сайт-специфичным включением этого гистона в нуклеосомы в коде клеточной дифференцировки или реакций на те или иные внешние сигналы. Существуют и другие механизмы создания свободных от нуклеосом участков (участков гиперчувствительности к ДНКазе I). Эти механизмы описаны в разд. 1.5.

Свободный от нуклеосом промотор служит местом сборки преинициаторного транскрипционного комплекса, включающего РНК-полимеразу II и шесть консервативных неспецифических (general) факторов транскрипции (обычно их называют общими транскрипционными факторами): TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH. Лишь один из этих общих транскрипционных факторов (TFIID) способен узнавать промотор. В состав этого фактора транскрипции, состоящего из нескольких субъединиц, входит белок, способный связываться с ТАТА боксом (ТАТА-віокіс, ТВР) и ряд вспомогательных белков (ТВР-аssociated factors, TAFs). В экспериментах *in vitro* с использованием сильного аденовирусного промотора, содержащего классический ТАТА-бокс, ТВР способен замещать полноценный ТFIID, обеспечивая базальный уровень транскрипции. В этой системе не требуется также TFIIA. Белки ТАF способны узнавать отличные от ТАТА-бокса домены промотора и абсолютно необходимы для инициации транскрипции на широком классе промоторов, не содержащих ТАТА-бокса. Кроме того, они являются мишенями для взаимодействия с тканеспецифичными транскрипционными факторами. Сторки преинициаторного комплекса при участии общих факторов транскрипции с определенных групп промоторов.

В несколько упрошенном виде современная модель сборки преинициаторного комплекса при участии общих факторов транскрипции с определенных групп промоторов.

В несколько упрошенном виде современная модель сборки премоторо и, связываясь с н

транскрипции.

Для сборки транскрипционного комплекса *in vivo* на большинстве промоторов, помимо общих транскрипционных факторов требуется целый ряд дополнительных белков. Регуляторные белки, способствующие активации промотора, как правило, называют транскрипционными факторами. Уже говорилось выше, что эти факторы могут взаимодействовать с ТАF-белками, участвуя в определении места посадки на ДНК фактора TFIID. Известно очень много транскрипционных факторов. Некоторые из них являются универсальными, например фактор Sp1. Большинство характеризуется определенной специфичностью в отношении типа ткани. Например, в эритроидных клетках существенную роль в инициации транскрипции глобиновых генов играют транскрипционные факторы GATA-1 и NF-E2.

Наряду с промоторами важную роль в регуляции транскрипции эукариотических генов играют энхансеры и сайленсеры, которые, соответственно, стимулируют и подавляют активность промоторов. соответственно, стимулируют и подавляют активность промоторов. Так случилось, что первыми были охарактеризованы энхансеры различных вирусов (вируса SV40, цитомегаловируса и т. д.). Эти энхансеры не проявляют тканевой специфичности. Они могут работать, находясь на значительном удалении от промотора и будучи расположены в различных ориентациях. В геноме эукариотической клетки многие энхансеры являются тканеспецифичными и могут работать только в тандеме с промотором определенного класса. Механизм работы энхансеров/сайленсеров пока еще не раскрыт и остается предметом дискуссий. Известно, что большинство энхансеров содержит участки связывания для различных транскрипционных факторов. Так, энхансер вируса SV-40 содержит несколько участков связывания транскрипционного фактора Sp1. скрипционных факторов. Так, энхансер вируса SV-40 содержит несколько участков связывания транскрипционного фактора Sp1. Энхансеры α- и β-глобиновых генов содержат участки связывания транскрипционных факторов GATA-1 и NF-E2. В геноме дрожжей существуют так называемые UAS (upstream activating sequences), которые играют важную роль в процессе сборки инициаторного комплекса PHK-полимеразы II. Последовательности UAS расположены на небольшом (менее 1 т. п. н.) расстоянии от промоторов. Считается, что комплекс связанных с UAS транскрипционных факторов прямо взаимодействует с TAF-белками, способствуя удержанию TFIID на промоторе. При этом небольшой фрагмент ДНК, разделяющий UAS и промотор, образует петлю. На этой петле могут находиться две или три нуклеосомные глобулы. Энхансеры высших эукариот могут располагаться на существенно большем расстоянии от контролируемых ими генов (иногда это расстояние превышает 100 т. п. н.). Подобно UAS дрожжей, энхансеры высших эукариот являются местами сборки тех или иных активаторных комплексов. Именно по причине взаимодействия с комплексом транскрипционных факторов активные энхансеры оказываются расположены в свободных от нуклеосом участках (участках гиперчувствительности к ДНКазе I). Основной вопрос, который возникает при попытке объяснить механизм действия эукариотических энхансеров, состоит в том, как активаторный сигнал передается на значительные расстояния. В современной литературе обсуждается несколько моделей, объясняющих передачу активаторного сигнала от энхансера к промоторам (рис. 27). Все эти модели можно разделить на две большие группы: модели, основанные на процессивном распространении активирующего сигнала (tracking), и модели, основанные на непосредственном взаимодействии энхансера и промотора с выпетливанием разделяющего их фрагмента (looping). Механизмом распространяющегося активирующего сигнала может быть создание домена гиперацетилированных гистонов (см. разд. 2.3). Ясно, однако, что такой механизм не может действовать на очень больших расстояниях. Действительно, между удаленными энхансерами и регулируемыми ими генами часто располагаются гены, которые данным энхансером не активируются. Ацетилирование же гистонов не обладает избирательностью и должно привести к активации всех генов, расположенных в гиперацетилированном домене. Модель, генов, расположенных в гиперацетилированном домене. Модель, предполагающая прямое взаимодействие энхансера и промотора предполагающая прямое взаимодействие энхансера и промотора (с выпетливанием разделяющего их фрагмента ДНК), эту проблему легко решает. В настоящее время получены убедительные доказательства того, что удаленные энхансеры (а точнее говоря, связанные с энхансерами регуляторные белки) прямо взаимодействуют с промоторами, образуя сложный активаторный комплекс с транскрипционными факторами, локализованными на промоторе. В англоязычной литературе этот активаторный комплекс называют chromatin hub. Сам факт взаимодействия удаленных регуляторных элементов с контролируемыми ими промоторами подтвердился в экспериментах по изучению трехмерной организации ДНК в ядре. Используемый при этом экспериментальный подход, получивший название ЗС («три цэ» — chromosome conformation capture), заключается в том, что из сшитых формальдегидом ядер удаляют гистоны, после чего ДНК обрабатывается рестриктазами и лигируется по липким концам. Понятно, что вероятность лигирования свободно диффундирующих в растворе фрагментов ДНК крайне мала. В то же время вероятность лигирования фрагментов, связанных друг с другом посредством бел-

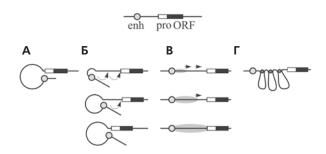


Рис. 27. Модель действия энхансера

На рисунке показаны основные обсуждаемые в настоящее время модели взаимодействия энхансера (enh) и промотора (pro). А — прямое взаимодействие при выпетливании района между энхансером и промотором; \mathbf{b} — опосредованное, или сканирующее, выпетливание (в отличие от предыдущего варианта, при котором взаимодействие промотора и энхансера происходит «сразу»); \mathbf{b} — распространение некоего активирующего сигнала; \mathbf{r} — приближение энхансера к промотору каким-то дополнительным механизмом (например, белками, укладывающими хроматин между энхансером и промотором в компактную структуру).

ков, будет значительно выше. Соответствующие различия могут быть зарегистрированы с использованием количественной или полуколичественной полимеразной цепной реакции (рис. 28). С помощью этого экспериментального подхода было продемонстрировано прямое взаимодействие LCR-домена β-глобиновых генов мыши с промоторами глобиновых генов. Было также показано, что структура активирующих комплексов изменяется при переходе домена из потенциально активной в активную форму (рис. 29). Аналогичные наблюдения были сделаны и при изучении ряда других геномных локусов. Выявлены также случаи участия в образовании сложного активаторного комплекса (chromatin hub) регуляторных элементов, расположенных на разных хромосомах. Такие межхромосомные взаимодействия могут играть важную роль в координации экспрессии связанных в функциональном отношении генов, которые располагаются на разных хромосомах.

Следует отметить, что модель образования прямого активаторного комплекса с участием промоторов и удаленных энхансеров не исключает возможности последующего ограниченного распространения активирующего сигнала, т. е. создания активного хроматинового домена, характеризующегося повышенным уровнем ацетилирования гистонов.

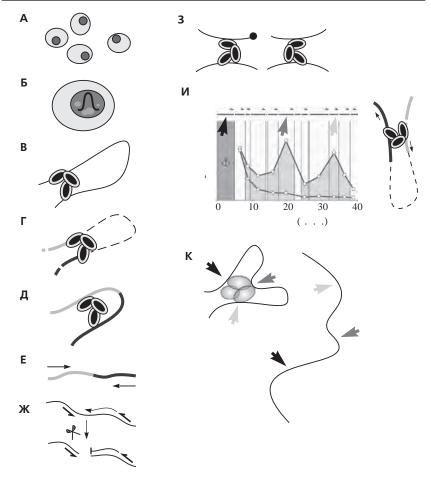


Рис. 28. Принцип метода 3С

В основе метода лежит лигирование рестриктных фрагментов, зафиксированных ДНК-белковыми сшивками, при низкой концентрации ДНК. Клетки (А) обрабатывают формальдегидом, что приводит к образованию белок-белковых и ДНК-белковых сшивок (Б). Затем клетки лизируют, осаждают хроматиновую фракцию и детергентом отмывают несвязанные белки. Полученные ДНК-белковые препараты (В) обрабатывают рестриктазами (Г). Полученный препарат сильно разбавляют. Благодаря разбавлению фрагменты ДНК оказываются изолированными друг от друга, кроме тех, которые остались объединены белковыми сшивками. Очевидно, что это могут быть только участки ДНК, которые изначально *in vivo* входили в состав каких-либо крупных надмолекулярных комплексов. Затем в полученный разбавленный препарат добавляют лигазу. В этих условиях лигироваться могут только пространственно сближенные рестриктные фрагменты — т. е. только фрагменты, объединенные белковыми сшивками (Д) — иными словами, взаимодействовашие in vivo. После лигирования выделяют ДНК и детектируют продукты лигирования

с помощью ПЦР, используя праймеры с разных рестриктынх фрагментов (Е). В том случае, когда праймеры расположены на удаленных рестриктных фрагментах, такая амплификация возможна только при условии успешного лигирования двух разных рестриктных фрагментов, находящихся в составе комплекса.

двух разных рестриктных фрагментов, находящихся в составе комплекса. Очевидно, что этот метод, опирающийся на статитстические закономерности, должен включать целый ряд контролей. Во-первых, необходимо убедиться в полноте рестрикции, а также в том, что различные сайты узнавания ДНК рестриктазой (рестриктазами) подверглись расщеплению с равной эффективностью. Для этого используют саузерн-гибридизацию или ПЦР-стоп (Ж). В последнем случае сигналом рестрикции служит прекращение амплификации через рестриктный сайт. Во-вторых, необходимо убедиться, что факт лигирования адекватно отражает пространственную сближенность фрагментов. Не исключены ситуации, когда даже при наличии сшивки между двумя фрагментами лигирование идти не будет (например, когда конец рестриктного фрагмента маскирован и недоступен для лигирования или же свободные концы фрагментов слишком коротки (3)). Контролем в ланном случае служит использование праймеров к лругим ние идти не будет (например, когда конец рестриктного фрагмента маскирован и недоступен для лигирования или же свободные концы фрагментов слишком коротки (3)). Контролем в данном случае служит использование праймеров к другим концам рестриктных фрагментов либо анализ с помощью другой рестриктазы. На практике схема эксперимента и полученные с помощью этого метода результаты выглядят выглядят так, как показано в секции И. Рассматривается анализ гипотетической геномной области, в рамках которой «якорный фрагмент» взаимодействует с двумя нижележащими фрагментами в одном типе клеток и не взаимодействует с этими фрагментами в другом типе клеток. На рисунке приведена гипотетичесския рестриктная карта и показаны позиции праймеров для ПЦР (вверху). Видно, что в данном эксперименте все праймеры однонаправлены. Это позволяет избежать артефактов неполной рестрикции — при такой взаимной ориентации невозможна внутренняя амплификация с нерестрицированных участков. В то же время, это не мешает получать продукт амплификации при лигировании кросс-сшитых фрагментов, так как (см. схему справа) один из четырех статистически равноценных продуктов лигирования является матрицей для ПЦР именно при однонаправленной ориентации праймеров. Самый левый рестриктный фрагмент является «якорем», т. е. сравниваются эффективность амплификации с пар праймеров, где один из праймеров — из «якорного» фрагмента, а второй — последовательно из всех остальных. Таким образом, анализируется вопрос, взаимодействует ли «якорный» фрагмент с каким-либо из нижележащих фрагментов. На графике показаны сравнительные интенсивности амплификаций (определяемые с помощью количественной ПЦР) в случаях, когда якорный фрагмент взаимодействует с нижележащими фрагментами (верхняя кривая) и когда якорный фрагмент ни с какими нижележащими фрагментами не взаимодействует (нижняя кривая). В нашем примере фрагменты, отмеченные светло-серой и темно-серой стрелками, в одном из двух типов клеток *йюю* (с сукорным фрагменты). Это означает, что именно эти рестриктные фрагменты сближе

В нашем примере фрагменты, отмеченные светло-серой и темно-серой стрелками, в одном из двух типов клеток дают существенно больший сигнал, чем соседние фрагменты. Это означает, что именно эти рестриктные фрагменты сближены с «якорным фрагментом» *in vivo* (К, схема слева). Если пиков в анализируемой области не наблюдается, это означает, что вся область представлена в «расправленном» виде. Важно отметить, что использование в качестве «якоря» только одного фрагмента не позволяет достоверно сделать вывод о «расправленной» конфигурации — для этого необходимо последовательно использовать в качестве «якорей» все остальные рестриктные фрагменты. Иными словами, приведенные на рисунке эксперименты не исключают существования «узлов» во втором типе клеток — они лишь исключают участие в «узлах» левого фрагмента.

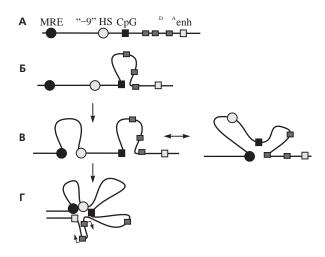


Рис. 29. Формирование единого активаторного комплекса

На примере домена α -глобиновых генов кур показано, как активация домена отражается на его пространственной организции. Домен α -глобиновых генов кур (A) включает три гена — эмбриональный π и взрослые α^D и α^A . Помимо генов, в состав домена входят регуляторные элементы: главный регуляторный элемент (MRE — main regulatory element, аналог области контроля локуса), участок гиперчувствительности к ДНКазе, расположенный на расстоянии 9 т. п. н. перед геном π («–9» HS), CpG-островок и энхансер (enh), расположенный после гена α^D . В не-эритроидных клетках взаимодействий между различными функциональными элементами домена практически нет (Б). В недифференциированных предшественниках эритробластов наблюдаются отдельные взаимодействия между некоторыми элементами, причем возможно несколько вариантов таких взаимодействий (В). Наконец, в зрелых эритробластах практически все регуляторные элементы, наряду с промоторами транскрибируемых генов, объединены в структуру, получившую название «хроматиновый хаб» (chromatin hub) (Г). Стрелками показано направление транскрипции работающих генов.

В последние годы активно обсуждается модель, связывающая активацию транскрипции с перемещением гена из неактивного в активный ядерный компартмент. Примером активного компартмента могут служить PML-тельца. Это небольшие компартменты, содержащие PML-белки и ряд транскрипционных факторов. В разд. 1.8 мы говорили о том, что наиболее активные генные домены выпетливаются из хромосомных территорий. Показано, что при этом они перемещаются к PML-тельцам, что, по-видимому, способствует активации транскрипции. Область, прилежащая к ядерной оболочке, и области, прилежащие к конститутивному (на-

пример, прицентромерному) гетерохроматину, являются неактивными компартментами. Предполагается, что простое перемещение генов в эти компартменты приводит к их долговременной инактивации. В модельном эксперименте показано, что активный трансген, поставленный под контроль сильного энхансера, локализуется в эухроматине. Трансген без энхансера локализуется рядом с центромерными областями хромосом (рис. Х на цветнной вкейке). Следует подчеркнуть, что речь идет не об интеграции трансгена в эухроматиновую или гетерохроматиновую область хромосомы, а просто о размещении соответствующего хромосомного домена внутри ядра Существует цельй ряд экспериментальных данных свидетельматиновую или гетерохроматиновую область хромосомы, а просто о размещении соответствующего хромосомного домена внутри ядра. Существует целый ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что локализация в ядре многих тканеспецифичных генов зависит от их транскрипционного статуса. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* было продемонстрировано, что в эритроидных клетках глобиновые гены располагаются далеко от конститутивного гетерохроматина, тогда как в неэритроидных они практически контактируют с конститутивным гетерохроматином. В лимфоидных клетках целый ряд генов инактивируется при участии белка «Ikaros». Эта инактивация коррелирует с перемещением соответствующих генов в один из прицентромерных компартментов. Белок Ikaros, по-видимому, играет важную роль в этом перемещении, так как, с одной стороны, на ДНК (в частности, в промоторной области λ5 и других генов, которые инактивируются в лимфоидных клетках) имеются участки узнавания Ikaros, а с другой стороны, Ikaros способен образовывать комплексы с прицентромерным гетерохроматином.

Важную роль в познании механизма переключения экспрессии β-глобиновых генов. Организация кластера β-глобиновых генов человека рассматривается в разд. 2.3. У человека этот кластер состоит из пяти родственных генов, один из которых (ε) экспрессируется на ранней эмбриональной стадии, два других (^Сγ и ^Aγ) экспрессируются в клетках взрослого организма. Расположение генов в домене (начиная от области контроля локуса) соответствует порядку их активации по ходу развития эмбриона. Наиболее интересным представляется тот факт, что экспрессивсех этих генов контролируется одной и той же группой энхансеров, расположение, что активация транскрипции того или иного из β-глобиновых генов напрямую зависит от установления прямого физического контакта между промотором этого гена

и LCR. Понятно, что вероятность установления такого контакта обратно пропорциональна расстоянию между геном и LCR. Иными словами, просто в силу своей близости к LCR эмбриональный ген є должен транскрибироваться предпочтительно по сравнению с другими β-глобиновыми генами. Эффективная транскрипция последних будет возможна лишь после принудительного выключения гена є с помощью некоего отличного от LCR контрольного механизма. Сформулированная гипотеза, которую можно назвать «пространственно-статистической» моделью активации транскрипции β-глобиновых генов, позволила сделать несколько предположений, и они были проверены экспериментально. Прежле всего, процесс активации инливидуальных глобиновых Прежде всего, процесс активации индивидуальных глобиновых генов должен носить статистический характер. Следовательно, в популяции эмбриональных эритроидных клеток, экспрессирующих преимущественно глобиновый ген є, должно присутствовать щих преимущественно глобиновый ген є, должно присутствовать определенное количество клеток, экспрессирующих другие глобиновые гены. При этом в некий фиксированный момент времени на каждой из хромосом может экспрессироваться только один из глобиновых генов (ген, промотор которого находится в комплексе с LCR). Это предсказание оказалось вполне справедливым лишь в случае домена β-глобиновых генов мыши. В эмбриональных эритроидных клетках человека гены «взрослых» глобинов вообще не экспрессировались. Другое предсказание, которое можно сделать на основании «пространственно-статистической» модели функционирования LCR, состоит в том, что любое изменение позиции гена (перестановка генов, внедрение дополнительных копий генов и изменение протяженности межгенных спейсеров) в домене, находящемся под контролем LCR, должно существенным образом влиять на характер экспрессии всех генов в домене (в том числе и на время активации транскрипции различных генов по ходу рази на время активации транскрипции различных генов по ходу развития организма). В случае домена β-глобиновых генов человека это предсказание было подтверждено результатами экспериментов с трансгенными мышами, в геном которых были внедрены перестроенные копии данного домена. Наиболее показательными перестроенные копии данного домена. Наиболее показательными можно считать результаты эксперимента, в котором были изменены относительные позиции генов ϵ (эмбриональный ген) и β (ген, экспрессирующийся в эритроидных клетках взрослого организма). После инверсии всего кластера β -глобиновых генов относительно LCR ген β оказывается расположенным ближе всего к LCR, тогда как ген ϵ , напротив, оказывается наиболее удаленным от LCR. При такой конфигурации домена в эмбриональных эритроидных клет-ках трансгенных мышей экспрессируется ген β , а эмбриональный ген є остается неактивным. Этот результат позволяет утверждать, что конкуренция за LCR является важным элементом механизма регуляции экспрессии β-глобиновых генов. Понятно, однако, что переключение экспрессии глобиновых генов в эмбриогенезе не может быть объяснено только конкуренцией промоторов индивидуальных генов за доступ к LCR. Должны существовать дополнительные регуляторные системы, инактивирующие эмбриональные гены и активирующие гены взрослого организма. Здесь, скорее всего, работает механизм создания активных субдоменов при участии связанного с транскрипцией ацетилирования гистонов. Как уже говорилось, уровень ацетилирования гистонов в границах домена β-глобиновых генов существенно различается (рис. 18). Наиболее высокий уровень ацетилирования характерен для области контроля локуса и для той группы глобиновых генов (эмбриональные, либо взрослые), которые транскрибируются в данном типе клеток.

Наряду с энхансерами, в геноме эукариот присутствуют сайленсеры, которые подавляют активность находящегося под их контролем промотора. Принцип действия сайленсеров, по-ви-

Наряду с энхансерами, в геноме эукариот присутствуют сайленсеры, которые подавляют активность находящегося под их контролем промотора. Принцип действия сайленсеров, по-видимому, мало отличается от принципа действия энхансеров. Как и энхансеры, сайленсеры представляют собой площадки связывания транскрипционных факторов. Именно последние определяют направление действия регуляторного элемента (активация транскрипции либо ее подавление). Одни и те же регуляторные элементы могут быть энхансерами в одном типе клеток и сайленсерами в другом типе клеток. Классическим примером является LCR-домена β-глобиновых генов, который активирует экспрессию находящихся под его контролем генов в эритроидных клетках и подавляет экспрессию тех же генов в неэритроидных клетках.

- Важную роль в регуляции инициации транскрипции у эукариот играет процесс освобождения промотора от нуклеосом.
- Энхансеры существенны как для создания активного хроматинового домена, так и для поддержания стабильности инициаторного комплекса РНК-полимеразы II.
- Энхансеры участвуют в образовании единого инициаторного комплекса с промотором. При этом разделяющая энхансер и промотор хроматиновая фибрилла выпетливается.
- Один и тот же регуляторный элемент может быть энхансером и сайленсером в зависимости от набора связанных с этим элементом белковых факторов.

2.9. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ

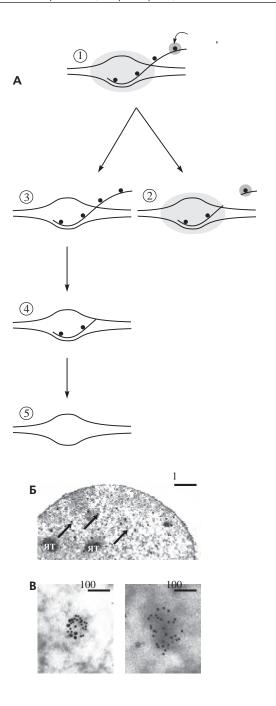
При обсуждении механизмов транскрипции эукариотической ДНК принято говорить о том, что РНК-полимераза II перемещается вдоль молекулы ДНК, удаляя или частично разворачивая находящиеся на ее пути нуклеосомные глобулы. В действительности, вопрос о том, что именно перемещается, не является столь очевидным. Довольно давно было высказано предположение, что РНК-полимераза II фиксирована на

Рис. 30. Транскрипционные фабрики

Для выявления сайтов транскрипции в ядре пермеабилизованные клетки инкубировали с биотинилированным ЦТФ. Через 5 мин клетки фиксировали и полученные препараты последовательно обрабатывали протеазами и нуклеазами (А). Затем тонкие срезы инкубировали с антителами к биотину, конъюгированными с частицами золота в 9 нм (1) Биотин в составе транскрипта преимущественно маскирован РНК-полимеразой и другими белками. Обработка препарата РНКазой А, расщепляющей одноцепочечную РНК (2), не освобождает маскированный биотин, а доступный — удаляет; тем самым мишеней для антител после обработки РНКазой А не остается. Напротив, обработка протеиназой К (3) полностью убирает белки, не затрагивая РНК, и количество мишеней для антител увеличивается. Последующая обработка РНКазой А может уменьшить количество мишеней. Это позволяет более точно локализовать позиции работающих транскрипционных комплексов (4), так как защищена от нуклеазного расщепления только та часть транскрипта, которая остается в гетеродуплексе с ДНК. РНКаза Н расщепляет именно РНК в составе гетеродуплексов (5), полностью расщепляя все оставшиеся после протеиназы К и РНКазы А мишени антител. Такое поведение при различных обработках позволяет убедиться в том, что выявленные мишени действительно являются районами активной транскрипции.

Иммуноэлектронная микроскопия (Б; препарат приготовлен, как показано на A, 1) выявляет в ядре относительно немного отдельных мест, где идет транскрипция (показаны стрелками; черная полоса = 1 мкм). При большем увеличении (В, Г; препараты получены разными методами, поэтому их вид несколько различается; полоса = 100 нм) видно, что эти места представляют собой кластеры из нескольких работающих (включающих биотинилированный предшественник) молекул РНК-полимеразы ІІ. Эти кластеры получили название «транскрипционные фабрики». Важно отметить, что кластеры включения биотина видны как после удаления одноцепочечной РНК, так и до него). После же удаления всей РНК, в том числе и той, которая находится в составе РНК-ДНК гибрида, кластеры исчезают. Это позволяет утверждать, что использованный метод действительно обеспечивает возможность визуализации мест транскрипции.

Б, В: фотография любезно предоставлена проф. Peter R. Cook, Oxford. Впервые опубликована в Iborra F. J. et al. "Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories' in human nuclei" J Cell Sci (1996) 109:1427—36.



скелетных структурах ядра, а перемещается молекула ДНК. В модельном эксперименте продемонстрировано, что иммобилизованная на носителе РНК-полимераза способна осуществлять процесс транскрипции. Анализ ядерной локализации коротких фрагментов новосинтезированной РНК показал, что в ядре эукариотической клетки осуществляющие транскрипцию молекулы РНК-полимеразы II организованы в кластеры, включающие 4-20 транскрипционных комплексов (рис. 30). Эти кластеры, диаметр которых составляет ≈70 нм, получили название «транскрипционные фабрики». По приблизительным оценкам в ядрах культивируемых клеток присутствует около 2000 транскрипционных фабрик, которые закреплены на скелетных структурах ядра. На некоторых модельных системах было показано, что активация транскрипции тканеспецифичных генов сопряжена с привлечением промоторов этих генов к трансрипционным фабрикам, осуществляющим транскрипцию расположенных рядом генов домашнего хозяйства.

• Процесс транскрипции осуществляется закрепленными на ядерном матриксе молекулами РНК-полимеразы II, организованными в транскрипционные фабрики.

ХРОМАТИН И РЕПЛИКАЦИЯ

3.1. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Репликация ДНК является одним из наиболее важных биологических процессов, который обеспечивает точное воспроизведение наследственной информации. Основные особенности процесса репликации ДНК были установлены при изучении E. coli и оказались общими для прокариот и эукариот. Напомним, этими особенностями являются: (1) полуконсервативный характер репликации; (2) двунаправленная репликация; (3) синтез одной из цепей ДНК (обычно ее называют отстающей цепью) в виде серии коротких фрагментов, которые получили название фрагментов Оказаки. Образование фрагментов связано с тем, что все известные ДНК-полимеразы могут синтезировать ДНК только в одном направлении (от 5'-конца к 3'-концу), в силу чего одна из комплементарных цепей ДНК должна синтезироваться в направлении, противоположном направлению движения репликативной вилки (рис. 31). ДНК-полимеразы сами по себе не способны инициировать синтез комплементарной цепи на однонитевой ДНК-матрице, а могут только наращивать цепь ДНК. Праймером для синтеза новой цепи в обычной ситуации служит короткий фрагмент РНК. ДНК-полимераза, способная синтезировать РНК-праймеры, получила название праймазы. В настоящее время известно много эукариотических ДНК-полимераз, но лишь одна из них (ДНК-полимераза α) обладает праймазной активностью. Помимо этой полимеразы, в репликации геномной ДНК эукариот ключевую роль играют ДНК-полимеразы δ и ε.

Наиболее важными характеристиками репликативных ДНК-полимераз являются процессивность (способность строить длинные цепи ДНК) и точность копирования (fidelity). Характеристики основных ДНК-полимераз высших эукариот и их дрожжевых

и бактериальных аналогов представлены в табл. 1. Точность копирования ДНК связана с наличием у ДНК-полимеразы 3′—5′-ясэонуклеазной активности. Эта активность необходима для удаления ошибочно включенного в цепь некомплементарного нуклеотида. ДНК-полимераза α не обладает 3′—5′-ясэонуклеазной активностью и поэтому является наименее точной из трех репликативных полимераз. Процессивность этой полимеразы также является достаточно низкой. Точность копирования ДНК-полимеразами δ и ε высока благодаря наличию у обеих полимераз 3′—5′-ясэонуклеазной активности. Что касается процессивностью синтеза в отсутствие каких-либо кофакторов, а ДНК-полимераза 6 обладает сходной процессивностью в присутствии белка РСNA (ргоliferating cell писlear antigen). Эксперименты по направленному мутагенезу продемонстрировали, что все три перечисленные выше ДНК-полимеразы а представляется очевидной: этот фермент обеспечивает синтез затравок для лидирующей цепи и фрагментов Оказаки. Распределение ролей между полимеразами δ и ε остается не вполне ясным. Продемонстрировано, что эти полимеразы участвуют в синтезе разных цепей ДНК. Наиболее популярной, хотя и не общепринятой, является модель, согласно которой ДНК-полимераза в синтезирует лидирующую цепь ДНК, гогда как ДНК-полимераза в очитезе разных цепей дНК. Наиболее популярной, хотя и не общепринятой, является модель, согласно которой ДНК-полимераза в синтезирует лидирующую цепь ДНК, тогда как ДНК-полимераза в очитезе разных цепей дНК. Наиболее популярной, хотя и не общепринятой, является модель, согласно которой ДНК-полимераза в очитезе разных цепей дНК. наиболее популярной, хотя и не общепринятой, является модель, согласно которой ДНК-полимераза в очитезе разных цепей дНК. полимеразу от практически сразу после синтеза рожение дНК-полимеразу о практически сразу после синтезирует фратменты Оказаки, построенные ДНК-полимеразой α. Улаление РНК-затравок осуществляет РНК-полимераза в ока в выветсные дНК-полимераза в ока в вывется пременение полагают, что распределение ролей между ДНК-полимераза в (

а также белок RPA (replication protein A) — белок, связывающийся с однонитевой ДНК, и репликационный фактор С (RFC). Последний является мультисубъединичным белком, который обладает АТФ-азной активностью. Считается, что RFC стабилизирует весь репликационный комплекс и увеличивает процессивность ДНК-полимеразы δ в присутствии PCNA и RFA. Белки PCNA и RFC высококонсервативны; в противоположность этому, RFA является видоспецифичным. Для нормального осуществления репликации необходимы еще по крайней мере две энзиматические активности. Это процессивная ДНК-хеликаза и ДНК-топоизомераза І. Примером процессивной ДНК-хеликазы является Т-антиген вируса SV-40. В эукариотических клетках роль процессивной ДНК-хеликазы выполняет шестисубъединичный комплекс белков МСМ, речь о котором пойдет ниже. Топоизомераза І абсолютно необходима для снятия топологических напряжений, возникающих при локальном расплетании ДНК.

Наряду с основными репликативными ДНК-полимеразами,

дима для снятия топологических напряжений, возникающих при локальном расплетании ДНК.

Наряду с основными репликативными ДНК-полимеразами, в эукариотических клетках обнаружено большое число различных вспомогательных ДНК-полимераз, которые используются в специальных случаях и нештатных ситуациях. Довольно давно было продемонстрировано, что ДНК-полимераза в играет ключевую роль в репарации поврежденной ДНК. Сравнительно недавно открытые ДНК-полимеразы ι, η, ζ и Rev1 необходимы для прохождения репликативного комплекса через точечные повреждения в ДНК (апуриновые сайты, тимидиновые димеры, дезаминированные основания и т. д.). Главные репликативные полимеразы останавливаются, встретив на своем пути упомянутые повреждения ДНК. В этом случае вступает в действие одна из полимераз, способная «прочитать» тот или иной поврежденный участок. При этом некоторые полимеразы включают в строящуюся цепь ДНК правильный нуклеотидный остаток, тогда как другие включают любой нуклеотидный остаток, что, естественно, может привести к мутации. После прохождения поврежденного участка «вспомогательная» полимераза заменяется одной из основных репликативных полимераз, и процесс репликации продолжается.

Известно, что геном клеток высших эукариот организован в большое число независимо работающих репликонов (более подробно этот вопрос обсуждается в разд. 3.6). Репликация ДНК в каждой конкретной области генома заканчивается тогда, когда происходит встреча репликативных комплексов, движущихся навстречу друг другу. Для завершения процесса репликации необ-

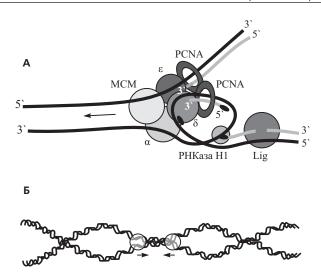


Рис. 31. Схема репликативной вилки

Репликацию осуществляет мультферментный комплекс, называемый реплисомой. На рисунке (А) схематично изображено устройство реплисомы (показаны только наиболее важные компоненты). Хеликазный комплекс МСМ2-6 расплетает двойную цепь ДНК. Синтез РНК-затравок осуществляет ДНК-полимераза α (показана только одна молекула праймазы, обеспечивающая затравками отстающую цепь). Собственно репликацию осуществляют ДНК-полимеразы б и є. Кольцевой белок PCNA надет на двойную спираль ДНК и обеспечивает процессивность ДНК-полимераз, а также является «платформой» для различных дополнительных компонентов реплисомы. РНКаза Н1 удаляет РНК-затравки, а лигаза сшивает фрагменты Оказаки на отстающей цепи. Для синхронизации репликации обеих цепей матрица отстающей цепи завернута в петлю, «продергиваемую» по мере переключения ДНК-полимеразы б на следующий фрагмент Оказаки. По окончании синтеза ДНК в репликоне два дочерних дуплекса оказываются переплетены друг с другом (Б), частично «унаследовав» зацепления цепей материнского дуплекса.

ходимо не только удалить репликативные комплексы с ДНК, но и разделить перекрещенные молекулы ДНК, которые возникают при объединении соседних репликонов (рис. 31). Эта проблема решается ДНК-топоизомеразой ІІ. Этот фермент вносит двунитевой разрыв в одну из молекул ДНК. После прохождения через этот разрыв другой молекулы (процесс разделения катенанов) тот же фермент восстанавливает целостность молекулы ДНК, в которую был внесен двунитевой разрыв (рис. 32).

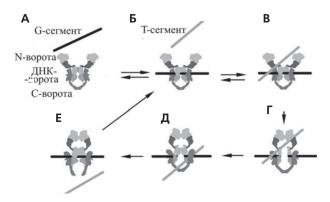


Рис. 32. Схема работы топоизомеразы II

Основными функциональными элементами феремнта являются так называемые ворота — N-ворота, ДНК-ворота и С-ворота (A). Сначала ДНК-ворота связываются с одной молекулой ДНК (Б), а N-ворота — с другой (В). После этого в ДНК-воротах происходит расщепление ДНК (Г), вторая молекула транспортируется через разрыв в С-ворота (Д), и, наконец, расщепленная молекула ДНК религируется в ДНК-воротах, а транспортированная — освобождается из С-ворот (Е). Фермент возвращается в исходную конфигурацию (Б) и высвобождает молеулу ДНК из ДНК-ворот.

- Базовые механизмы репликации ДНК мало отличаются у прокариот и эукариот.
- Основными компонентами репликационного комплекса эукариот являются ДНК-полимеразы α , δ и ϵ и белки PCNA, RFA и RFC.
- Роль процессивной ДНК-хеликазы в клетках эукариот выполняет шестисубъединичный комплекс МСМ-белков.

3.2. ИНИЦИАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ ДНК У ЭУКАРИОТ

В хромосоме *E. coli* существует определенное место (*ori*), в котором начинается репликация ДНК. Фрагмент ДНК, содержащий *ori*, способен поддерживать репликацию плазмид в клетках *E. coli*. Существуют ли генетически детерминированные участки начала репликации в клетках эукариот, долгое время оставалось неясным. Первоначальный прогресс в изучении этого вопроса был связан с открытием и характеристикой автономно-реплицирующихся элементов дрожжей.

3.3. АВТОНОМНО РЕПЛИЦИРУЮЩИЕСЯ ЭЛЕМЕНТЫ (ARS) ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE*

При поиске потенциальных участков начала репликации пекарских дрожжей *S. cerevisiae* успешным оказался тот же экспериментальный подход, который использовался для тестирования активности участка начала репликации ДНК *E. coli*. Были идентифицированы фрагменты ДНК, способные поддерживать автономную репликацию плазмид в клетках *S. cerevisiae*. Элементы генома, способные поддерживать автономную репликацию плазмид в дрожжевых клетках, получили название автономно реплицирующихся последовательностей (autonomously replicating sequences, ARS). Сравнение ряда ARS-элементов позволило идентифицировать необходимую для работы репликатора последовательность (консенсус): WTTTATRTTTW. Наличие консенсусной последовательности указывало на возможность специфического связывания с ней, существенного для инициации репликации белка. В течение долгого времени обнаружить такой белок не удавалось. Недавно продемонстрировано, что с консенсусом ARS связывается чрезвычайно консервативная группа белков ORC (origin recognition complex). Консенсусный элемент

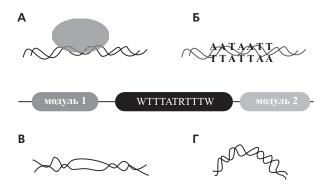


Рис. 33. Структура ARS дрожжей

Основу ARS составляет консенсусная последовательность (в середине). Однако сама по себе она обеспечивает низкий уровень инициации репликации. Помимо консенсуса, для максимальной активности ARS необходимы вспомогательные модули, которых может быть несколько и которые могут быть различными у разных ARS. В роли вспомогательных модулей могут выступать сайты связывания ряда транскрипционных факторов (A), AT-богатые (Б), легкоплавкие (В) и перманентно изогнутые (Г) последовательности ДНК.

сам по себе способен обеспечивать автономную репликацию плазмид в дрожжевых клетках, однако уровень репликации является достаточно низким. Для максимальной активности ARS-элемента наряду с консенсусной последовательностью необходимы вспомогательные модули. Ими являются сайты связывания ряда транскрипционных факторов, АТ-богатые, легкоплавкие и перманентно изогнутые последовательности ДНК (рис. 33). Набор вспомогательных элементов и порядок их расположения относительно консенсусного элемента различаются для разных копий ARS.

Понятно, что способность некоего геномного элемента работать в качестве репликатора (в частности, обеспечивать автономную репликацию плазмид в дрожжевых клетках) не обязательно указывает на то, что этот геномный элемент выполняет функцию участка начала репликации хромосомной ДНК. В связи с этим было важно разработать методы картирования реально работающих участков начала репликации. В случае дрожжевых хромосом для картирования участков начала репликации преимущественно использовались электрофоретические методы. Существует два типа двумерного электрофореза, позволяющих установить позицию работающего участка начала репликации. Первый метод основан на выявлении участка генома, в составе которого присутствуют наиболее короткие фрагменты новореплицированной ДНК. Это, очевидно, и будет участок начала репликации. Эксперимент ставят следующим способом. Сначала ДНК, разрезанную на большие фрагменты теми или иными рестриктазами, разделяют по размеру в обычном агарозном геле. Понятно, что фрагмент ДНК, содержащий репликационную «луковицу» или одну репликационную вилку, будет тем больше, чем большая часть его реплицировалась. Во втором направлении электрофорез проводят в денатурирующих условиях (в щелочной агарозе). При этом подвижность выплавившихся фрагментов новореплицированной ДНК будет обратно пропорциональна их размеру. Проба, расположенная в участке начала репликации или в непосредственной близости от него, позволит визуализировать наиболее протяженную диагональ новосинтезированных фрагментов (рис. 34).

Двумерный электрофорез в нейтральных условиях основан на том факте, что различные промежуточные продукты репликации (одиночные вилки, сходящиеся вилки и «луковицы») имеют разную электрофоретическую подвижность в концентрированном акриламидном геле. Если разделять фрагменты реплицирующейся ДНК сначала по размеру, а потом по форме, то можно идентифицировать различные репликационные интермедиаты (рис. 35).

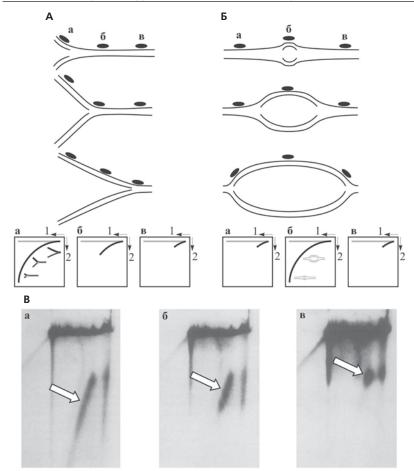
Как уже говорилось выше, оба упомянутых электрофоретических подхода были использованы для выяснения того, работают ли ARS в качестве участков начала репликации в дрожжевых хромосомах. В результате было продемонстрировано, что все хромосомные участки начала репликации содержат ARS-элементы. С другой стороны, было показано, что многие ARS в дрожжевых хромосомах являются «молчащими», т. е. не работают в качестве участков начала репликации. Иными словами, в дрожжевых хромосомах имеется избыток потенциальных репликаторов (ARS-элементов). Выбор того из них, который будет использован в качестве участка начала репликации хромосомной ДНК, по-видимому, зависит от хроматинового контекста.

- ARS-элементы способны обеспечивать автономную репликацию плазмид в дрожжевых клетках.
- Наиболее важной частью ARS *S. cerevisiae* является консенсусная последовательность длиной 11 п. н., с которой связывается комплекс ORC-белков. Для полноценной работы ARS необходим ряд вспомогательных элементов.
- Все геномные участки начала репликации S. cerevisiae включают ARS- элементы. В то же время в геноме присутствуют «молчащие» ARS-элементы, которые не работают в качестве участков начала репликации.

Рис. 34. Электрофорез по Huberman

Из расшепленной рестриктазами тотальной ДНК получают фракцию, обогащенную репликативными вилками. Для этого проводят хроматографию на бензоилированно-нафтоилированной DEAE-целлюлозе. Ароматические группы взаимодействуют с неспаренными основаниями в одноцепочечных районах, которые в норме существуют только в репликативных вилках. Полученный препарат разделяют двумерным электрофорезом в агарозном геле, после чего гибридизуют с пробами из разных частей фрагмента. В первом направлении разделение ведут в нейтральных условиях. При этом дуплексы сохраняются, и разделение идет по массе всей молекулы. Понятно, что чем полнее прошла репликация, тем массивнее и тем менее подвижной будет такая молекула. Во втором направлении разделение ведется в денатурирующих условиях, т. е. делятся по размерам не двуцепочечные молекулы, а их одноцепочечные компоненты. Родительские цепи в этих условиях остаются близко к старту, тогда как короткие цепи новосинтезированной ДНК разделяются в геле, занимая позиции, соответствующие их размерам.

одноценочечные компоненты. Родительские цепи в этих условиях остаются близко к старту, тогда как короткие цепи новосинтезированной ДНК разделяются в геле, занимая позиции, соответствующие их размерам. Показаны схемы результатов эксперимента для случаев (А) «вилок» — когда в полученных фрагментах присутствует только одна репликативная вилка, и (Б) «луковиц» — сохраняются обе вилки. Отмечены гибридизационные пробы. Вид-



но, что чем ближе гибридизационная проба к участку начала репликации (либо к концу рестриктного фрагмента со стороны движения репликативных вилок), тем меньшие новосинтезированные фрагменты с ее помощью можно выявить: только проба a распознает короткие новосинтезированные цепи в случае A, и только проба $\partial -$ в случае B, тогда как длинные новосинтезированные цепи распознают все пробы. Полноразмерные родительские цепи выявляются горизонтальной полосой в верхней части геля, так как, мигрируя в составе разных интермедиатов в нейтральных условиях, они все движутся одинаково в денатурирующих.

На (В) приведены результаты реального эксперимента, соответствующие схеме А. Хорошо видны диагонали разной длины (обозначены стрелками), выявляемые пробами, расположенными на разном расстоянии от участка начала репликации.

B: из Nawotka K.A. et al. "Two-Dimensional Gel Electrophoretic Method for Mapping DNA Replicons" Microbiology and Cellular Biology (1988) 8:1408 с любезного разрешения авторов и American Society for Microbiology.

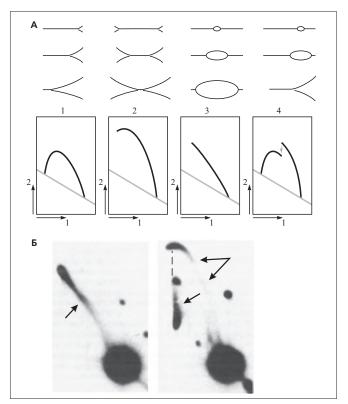


Рис. 35. Электрофорез по Fangman

Фракцию рестриктных продуктов, обогащенных репликативными интермедиатами (см. подпись к рис. 34), анализируют двумерным электрофорезом в нейтральных условиях. Разделение в первом направлении ведут при стандартных условиях, и продукты делятся по молекулярной массе. При разделении во втором направлении используют такие условия, при которых форма молекул оказывает наибольшее влияние на их подвижность. Линейные молекулы мигрируют быстрее, чем разветвленные. Репликативные интермедиаты могут быть четырех типов (А): Ү-образные (одна репликативная вилка в рестриктном фрагменте) при такой комбинации условий разделения дают дугу (1), «двойные Y» (две сходящиеся вилки) дают вытянутую арку (2), «луковицы» (две расходящиеся вилки) — практически прямую линию (3) и «несимметричные луковицы» — дугу, разрывом переходящую в арку, когда одна из вилок уходит за пределы рестриктного фрагмента. Тонкой серой линией отмечена диагональ, вдоль которой мигрируют нереплицирующиеся линейные молекулы. Также показана типичная экспериментальная картина (Б): хорошо видны две разные ситуации, соответствующие «луковице» (слева) и несимметричной «луковице» (справа). Треки репликативных интермедиатов показаны стрелками, пунктиром — разрыв-переход дуги в арку.

Б: из Brewer B.J. et al. "The Localization of Replication Origins on ARS Plasmids in S. cerevisiae" Cell (1987) 51:463 с любезного разрешения авторов и Elsevier.

3.4. УЧАСТКИ НАЧАЛА РЕПЛИКАЦИИ ДНК ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

Многочисленные попытки обнаружить в геноме человека и других высших эукариот последовательности ДНК, способные поддерживать автономную репликацию плазмид в клетках этих организмов, привели к крайне неоднозначным и в целом негативным результатам. Неограниченной способностью к автономной репликации обладали лишь плазмиды, содержащие участки начала репликации различных ДНК-содержащих вирусов высших эукариот. Однако для работы этих участков начала репликации требовалась экспрессия одного или нескольких вирусных белков. В простейшем случае для работы участка начала репликации вируса SV-40 требовалась экспрессия Т-антигена SV-40. Плазмиды, содержащие различные фрагменты человеческой ДНК, обладали крайне ограниченной способностью к репликации в культивируемых клетках человека. Сам факт репликации этих плазмид удалось подтвердить только путем анализа профилей метилирования ДНК. Практически во всех штаммах *E. coli*, которые используются для наращивания плазмид, присутствует метилаза Dam, которая метилирует остатки аденозина в составе тетрануклеотидов GATC. В эукариотических клетках такого фермента нет, поэтому при репликации плазмидной ДНК в эукариотических клетках Dam-метилирование утрачивается.

Вероятность инициации репликации в границах присутствующего в плазмиде фрагмента человеческой ДНК была пропорциональна длине этой последовательности. При этом уровень автономной репликации плазмид в клетках человека крайне низок. В частности, не обеспечивалось поддержание в клетках селективного маркера, необходимого для роста клеток на тех или иных селективных средах.

Неспособность участков начала репликации ДНК высших эукариот поддерживать автономную репликацию плазмид существенно затруднила идентификацию и характеристику этих участков начала репликации. Важную роль в изучении участков начала репликации (ori) ДНК высших эукариот сыграли работы по картированию ori в отдельных областях генома. В начальных работах анализировалась встречаемость различных фрагментов определенной геномной области в препарате ДНК, синтезированной в начале S-фазы. Не отличаясь высокой точностью, этот подход позволил продемонстрировать, что инициация репликации ДНК происходит не случайным образом. Более того, были установлены приблизительные позиции ori в амплифицированном домене

гена дигидрофолатредуктазы китайского хомячка (DHFR) и ряде других геномных доменов. В последующем данные участки начала репликации стали популярными моделями для отработки более точных методов картирования *ori*. На протяжении многих лет главной моделью для более точного картирования *ori* ДНК позвоночных животных стал ампликон гена дигидрофолатредуктазы китайского хомячка.

Современные методы картирования *ori* основаны на особенностях репликационных структур в ДНК (рис. 36). Участок начала репликации является местом смены комплементарных начала репликации является местом смены комплементарных матриц для синтеза ведущей и прерывистой цепей ДНК. Поэтому позиция участка начала репликации может быть установлена анализом полярности синтеза ведущей или прерывистой цепи ДНК. Для этого необходимо проанализировать интенсивность гибридизации препарата фрагментов Оказаки либо препарата ведущих цепей новосинтезированной ДНК с раздельными цепями ряда фрагментов ДНК, представляющих различные участки интересующей области. Получение препарата фрагментов Оказаки не представляет особой сложности, так как фрагменты Оказаки имеют стандартный размер. Препарат ведущих цепей новосинтезированной ДНК может быть получен из клеток, культивировавшихся в присутствии ингибиторов синтеза белка. Было показано, что в этих условиях синтез фрагментов Оказаки практически полностью подавляется, в то время как синтез лидирующих цепей продолжается. Оба метода анализа полярности синтеза цепей ДНК (ведущей и прерывистой) были с успехом использованы для картирования *огі* в домене гена DHFR китайского хомячка. При этом анализ полярности синтеза фрагментов Оказаки позволил определить позицию этого участка начала репликации с точностью этом анализ полярности синтеза фрагментов Оказаки позволил определить позицию этого участка начала репликации с точностью до 0,5 т. п. н. В последующем технически более простой метод анализа полярности синтеза ведущих цепей ДНК использовался для установления позиций участков начала репликации в целом ряде геномных доменов в клетках человека и других организмов. Во всех случаях были получены результаты, показывающие, что участки начала репликации имеют фиксированные позиции. Но этому противоречат результаты, полученные с использованием электрофоретического метода идентификации различных репликационных структур. Существуют большие технические сложности в приложении этого метода для изучения генома высших эукариот, причиной чего, естественно, является очень большой размер генома и относительно низкая чувствительность гибридизации с радиоактивными пробами. Проблема решается автоматически,

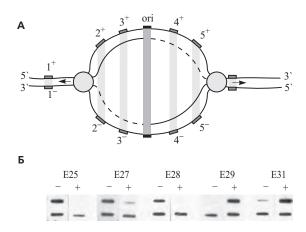


Рис. 36. Картирование участков начала репликации

Запуск участка начала репликации сопровождается расхождением двух репликативных вилок (А). При этом в том месте, где располагается участок начала репликации, новосинтезированные цепи ДНК превращаются из ведущей в отстающую и наоборот. Выделив отдельные фракции ведущей и отстающей цепей, их можно прогибридизовать с олигонуклеотидными пробами, равномерно расположенными в изучаемой области $(1^+...5^+$ на одной цепи и $1^-...5^-$ на другой), и установить область, в которой происходит смена полярности синтеза ведущей и отстающей цепей ДНК. Характерная экспериментальная картина приведена в нижней части рисунка (Б). Здесь приведены результаты гибридизаций пар олигонуклеотидных проб к разным цепям ДНК (+ и —) с ведущей цепью и тотальной ДНК. Хорошо видно, что в позициях Е25...Е28 с ведущей цепью гибридизуются «—»-пробы, а в позициях E29 и E31 — «+»-пробы. Таким образом, между пробами Е27 и Е29 находится участок начала репликации. Следует сказать о том, что смена полярности синтеза ведущей и отстающей цепей ДНК будет происходить и в участке терминации репликации (месте встречи репликативных вилок). Различить участки инициации и терминации репликации можно, проанализировав направление движения репликативных вилок исходя из направления (5'-3') олигонуклеотидов, с которыми предпочтительно гибридизуются ведущие и отстающие цепи новосинтезированной ДНК.

когда объектом исследования служит амплифицированный локус. При работе с неамплифицированными областями генома перед постановкой двумерного электрофореза приходится обогащать изучаемый препарат ДНК репликационными структурами. Понятно, что это может служить дополнительным источником артефактов. При использовании электрофоретических методов картирования

участков начала репликации были получены довольно неожиданные результаты. Было продемонстрировано, что в локусе гена DHFR репликация может начинаться в широкой зоне (≈80 т. п. н.), расположенной между генами DHFR и 2BE2121. Места предпочтительной инициации репликации совпадали с позициями участков начала репликации, картированными определением полярности синтеза ведущей и отстающей цепей ДНК. Результаты экспериментов по анализу репликационной структуры протяженных областей генома с помощью идентификации репликонов на растянутых препаратах ДНК (разд. 3.6) также свидетельствуют о том, что существуют предпочтительные позиции участков начала репликации, хотя во многих клетках репликация начинается в других геномных позициях.

В настоящее время для точного картирования предпочтительных позиций участков начала репликации наиболее часто используют методы, базирующиеся на количественной ПЦР. С помощью данметоды, оазирующиеся на количественной ПЦР. С помощью данной техники оказалось возможным реализовать наиболее простой и однозначный с теоретической точки зрения метод картирования участков начала репликации. Этот метод заключается в анализе относительной встречаемости в различных размерных фракциях новосинтезированной ДНК ряда проб, равномерно распределенных в пределах анализируемой области. Понятно, что в наиболее новосинтезированной днк ряда проо, равномерно распределенных в пределах анализируемой области. Понятно, что в наиболее коротких фракциях новосинтезированной ДНК должны быть предпочтительно представлены последовательности, расположенные в непосредственной близости от участка начала репликации. Более простой вариант данного метода заключается в том, что выделяют препарат относительно коротких фрагментов новосинтезированной ДНК и с помощью количественной ПЦР определяют содержание в этом препарате ряда тест-фрагментов из изучаемой геномной области. Тест-фрагменты, локализованные в непосредственной близости от участка начала репликации, будут представлены в этом препарате наибольшим числом копий (рис. 37). Обсуждаемые экспериментальные подходы были успешно использованы для картирования участков начала репликации во многих неамплифицированных геномных областях. Именно так были картированы, в частности, участок начала репликации, лежащий в 3'-области гена ламина В2 человека, участок начала репликации домена β-глобиновых генов человека (частично перекрывающийся с геном β-глобиновых генов человека (частично перекрывающийся с геном β-глобина), участок начала репликации, расположенный в 5'-концевой области гена *с-тус* человека, участки начала репликации домена гена *DHFR* китайского хомячка (*огі*й и *огі*й'), участок начала репликации домена гена *DHFR* китайского хомячка (*огі*й и *огі*й'), участок начала репликации домена гена *DHFR* китайского хомячка (*огі*й и *огі*й'), участок начала репликации домена гена *DHFR* китайского хомячка (*огі*й и *огі*й'), участок начала репликации домена гена *DHFR* китайского хомячка (*огі*й и *огі*й'), участок начала репликации домена гена *DHFR* китайского хомячка (*огі*й и *огі*й'),

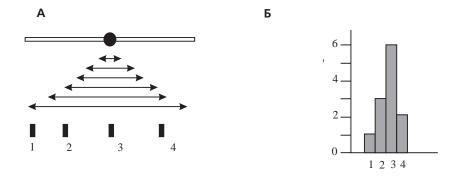


Рис. 37. Картирование участков начала репликации с помощью анализа препаратов коротких цепей новосинтезированной ДНК

(А) В асинхронно реплицирующихся клетках препарат новосинтезированной ДНК состоит из набора разноразмерных фрагментов (двунаправленные стрелки), в центре которых находится участок начала репликации. После денатурации ДНК такой препарат может быть получен просто при выделении фракции относительно коротких фрагментов. Длина этих фрагментов должна быть больше длины фрагментов Оказаки и меньше средней длины однонитевых фрагментов родительской ДНК, возникающих в результате случайных разрывов. Из рисунка видно, что проба 3, расположенная в участке начала репликации, будет представлена во всех фрагментах новосинтезированной ДНК. Пробы же, удаленные от участка начала репликации, будут присутствовать лишь в наиболее длинных фрагментах новосинтезированной ДНК. Иными словами, в препарате цепей новосинтезированной ДНК последовательности, происходящие из участка начала репликации, представлены существенно большим числом копий, чем последовательности, находящиеся на большом расстоянии от участка начала репликации. (Б) С помощью количественной ПЦР можно проанализировать представленность различных проб в препарате коротких цепей новосинтезированной ДНК. Показаны ожидаемые результаты анализа гипотетического репликона, представленного в секции А. Проба 3, локализующаяся в участке начала репликации, дает наиболее высокий сигнал.

мячка. Очевидными преимуществами данного экспериментального подхода являются высокая точность картирования и сведение к минимуму (включение плотностной метки в новосинтезированную ДНК) необходимых манипуляций с живыми клетками. Для сравнения можно упомянуть, что при анализе полярности синтеза ведущих цепей ДНК клетки приходится инкубировать в течение нескольких часов с ингибиторами синтеза белка. При анализе полярности синтеза прерывистой цепи ДНК фрагменты

Оказаки метят включением ³²Р дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, для проникновения которых в клетки необходима пермеабилизация мембраны неионными детергентами. Метод сравнения относительной представленности различных областей генома в тотальной ДНК и препарате коротких цепей новосинтезированиой ДНК можно использовать и для полногеномного картирования позиций участков начала репликации. С этой целью препараты гибридизуют с олигонуклеотидными чипами высокой плотности. Понятно, что перед гибридизацией в препараты надо ввести флуоресцентную метку. Картированные с высокой точностью участки начала репликации высших эукариот имеют между собой мало общего (если говорить о гомологии последовательности ДНК). Наиболее важным является то, что с каждым из них связывается комплекс белков ОКС. У высших эукариот для посадки на ДНК белков группы ОКС не требуется какой-либо консенсусной последовательности ДНК. Важнее для посадки ОКС определенное хроматиновое окружение. Отсутствие простого функционального теста на активность репликатора в клетках высших эукариот в течение многих лет служило препятствием для выяснения того, существуют ли принципиально важные для активности репликатора последовательности ДНК. Как уже говорилось выше, в геноме высших эукариот не удалось

важные для активности репликатора последовательности ДНК. Как уже говорилось выше, в геноме высших эукариот не удалось обнаружить элементов, поддерживающих автономную репликацию плазмид в клетках. Суммируя имеющиеся на настоящий момент экспериментальные наблюдения, можно сказать, что в культивируемых клетках высших эукариот плазмидная ДНК реплицируется с низкой эффективностью. В то же время, в эукариотической ДНК не найдено специфических последовательностей, которые обладали бы способностью существенно стимулировать репликацию плазмидной ДНК. Не выполняют эту функцию и фрагменты ДНК, включающие наиболее хорошо изученный участок начала репликации из домена гена *DHFR* китайского хомячка. По-вирепликации из домена гена *DHFR* китайского хомячка. По-видимому, у высших эукариот репликация ДНК может в принципе начинаться в любой точке. Ограничения на свободу инициации репликации накладывает упаковка ДНК в хроматин в условиях недостатка факторов репликации. Такая ситуация (упаковка и недостаток факторов) типична для всех клеток по завершении ранних стадий эмбрионального развития. Именно поэтому в абсолютном большинстве случаев могут реализоваться — и реализуются — преимущества участков начала репликации перед прочими районами генома. Поэтому синтез ДНК предпочтительно инициируется именно в участках начала репликации, а не в случайных регионах. Однако в условиях избытка необходимых факторов репликации,

например при микроинъекции плазмид в яйцеклетки шпорцевой лягушки, синтез ДНК может инициироваться где угодно, а не только в участках начала репликации. Таким образом, функциональная активность участков начала репликации (активность репликаторов) ДНК высших эукариот может быть тестирована только в хромосомном контексте. Это можно сделать двумя способами. в хромосомном контексте. Это можно сделать двумя способами. Первый заключается в делеционном анализе участков начала репликации в нормальной геномной позиции. Замена нормального фрагмента геномной ДНК на гомологичный фрагмент, несущий ту или иную делецию, может быть осуществлена клеточной системой гомологичной рекомбинации (разд. 5.1). Однако активность этой системы в большинстве клеток высших эукариот достаточно низка. Другой экспериментальный подход заключается в изучении активности репликаторов в эктопических геномных позициях. Для этого анализируемый фрагмент ДНК должен быть интегрирован в новую хромосомную позицию, после чего следует выяснить, работает ли он в этой позиции в качестве участка начала репликации. В настоящее время проведено несколько успециых экспери-В настоящее время проведено несколько успешных экспериментов такого рода. Их результаты стали особенно информативными после разработки техники сайт-специфической интеграции плазмидных конструктов в одну и ту же геномную область. В этих экспериментах было продемонстрировано, что все известные участки начала репликации содержат элементы, способные обеспечивать инициацию репликации в эктопических позициях. С помощью направленного мутагенеза были выявлены и некоторые необходимые элементы индивидуальных участков начала репликации, в том числе АТ-богатые и перманентно-изогнутые репликации, в том числе Ат-оогатые и перманентно-изогнутые последовательности ДНК, полипуриновые/полипиримидиновые блоки и участки связывания ряда транскрипционных факторов. Важно то, что ни один из этих элементов не присутствует во всех изученных репликаторах ДНК высших эукариот. В настоящее время большинство исследователей склонны считать, что позивремя большинство исследователей склонны считать, что позиции участков начала репликации задаются на эпигенетическом уровне. Ключевым событием является обеспечение возможности посадки на ДНК белков ORC (см. след. разд.). Действительно, в модельном эксперименте показано, что привлечение белков ORC и сdc6-киназы к произвольно выбранному участку генома превращает его в участок начала репликации.

Соотношение процессов репликации и транскрипции не вполне очевидно. Как уже говорилось выше, существующие экспериментальные данные позволяют утверждать, что в клетках позвоночных животных имеется много ori, из которых лишь часть активируется во время каждого конкретного раунда репликации. Существенно,

что активация того или иного ori подавляет активацию ряда соседних ori. Это обеспечивает сохранение относительно постоянного размера репликонов. Анализ распределения ori в индивидуальных областях генома, например в домене β -глобиновых генов кур, позволил продемонстрировать, что в клетках, дифференцированных по разным путям, предпочтительно используются разные ori. Закономерности, определяющие выбор активных ori, пока не изучены.

- В геноме высших эукариот не обнаружено последовательностей ДНК, обеспечивающих высокий уровень репликации плазмид в их клетках.
- В геноме высших эукариот можно картировать предпочтительные позиции участков начала репликации.
- Геномные участки начала репликации высших эукариот работают в качестве участков начала репликации в эктопических позициях.
- Хотя обнаружен ряд специальных последовательностей ДНК, часто присутствующих в участках начала репликации, никакой консенсусной последовательности, необходимой для инициации репликации ДНК в клетках высших эукариот, не существует.
- Главной характеристикой участков начала репликации ДНК высших эукариот является то, что в этих местах с ДНК связывается комплекс ORC-белков. В определении позиций участков начала репликации важную роль играет доступность ДНК для посадки ORC-белков.

3.5. ИНИЦИАЦИЯ РЕПЛИКАЦИИ ДНК У ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

В настоящее время цепь событий, приводящих к инициации репликации ДНК у высших эукариот, может быть представлена лишь в самом общем виде. Процесс начинается с посадки ORC-белков на все потенциальные участки начала репликации. Комплекс ORC включает 6 белков с молекулярными массами от 50 до 120 кДа. У дрожжей *S. cerevisiae* ORC-белки связываются с консенсусом ARS. Предпочтительные позиции посадки ORC-комплексов на ДНК высших эукариот могут задаваться с помощью тех или иных эпигенетических маркеров. Интересно, что ORC2 остается связанным с хроматином на протяжении всего клеточного цикла, в то время как ORC1 диссоциирует от ДНК во время митоза. Таким образом, позиции единожды обозначенных точек сборки ORC-комплекса на ДНК могут задаваться перманентно связан-

ными молекулами ORC2. Что служит сигналом для первоначального обозначения участков начала репликации у многоклеточных животных, происходящего при переходе к средней бластуле, остается неясным. Комплекс ORC-белков служит центром сборки пререпликативного комплекса. Она происходит в фазе G₁ после разрушения митотических циклинов и некоторых других негативных регуляторов и при высоком уровне специфичных для фазы G₁ факторов инициации репликации, в том числе Cdc6/Cdc18 и Cdt1/DUP. При упоминании тех или иных факторов инициации репликации (Cdc6, Cdt1, Dbf4) здесь и далее мы используем названия белков *S. cerevisiae*, которые нередко употребляют и для всего класса подобных белков. При этом следует иметь в виду, что все факторы инициации репликации достаточно консервативны и гомологи факторов инициации репликации *S. cerevisiae* обнаружены у *S. pombe* и высших эукариот. Связывание ORC-белков приводит к локальным изменениям характера упаковки ДНК в хроматин, облегчающим инициацию репликации. В состав пререпликативного комплекса, центром сборки которого служит комплекс ORC, входят белки комплекса МСМ (minichromosome maintenance). Название отражает то обстоятельство, что МСМ-белки были первоначально идентифицированы с помощью генетических методов как продукты экспрессии генов, необходимые для

ки были первоначально идентифицированы с помощью генетических методов как продукты экспрессии генов, необходимые для репликации дрожжевого генома и ARS-плазмид (минихромосом) в дрожжевых клетках. Помимо гексамера МСМ2–МСМ7, Сdc6 и Cdt1, пререпликативный комплекс включает белок МСМ10. Он взаимодействует со всеми белками гексамера, и его присутствие необходимо для удержания МСМ2–МСМ7 на ДНК.

Комплекс МСМ2–МСМ7 играет ключевую роль в инициации репликации. Этот комплекс представляет собой латентную ДНК-хеликазу, которая активируется при конформационной перестройке комплекса, стимулируемой фосфорилированием одной или нескольких субъединиц. После инициации репликации МСМ-хеликаза освобождается из репликативного комплекса и начинает двигаться вместе с репликативными вилками подобно большому Т-антигену вируса SV-40. Активация хеликазной активности комплекса МСМ2–МСМ7 происходит при участии циклин-зависимой (СDК) и Dbf4-зависимой (DDK) киназ.

Очевидно, что инициация репликации должна происходить один-единственный раз каждый клеточный цикл. Иными словами, после начала репликации необходимо сделать невозможной

ми, после начала репликации необходимо сделать невозможной повторную инициацию. Это достигается инактивацией комплекса ORC-Cdc6-Cdt1 или его компонентов. У *S. cerevisiae* происхо-

дит фосфорилирование Сdc6 киназами CDK, начиная с конца G_1 -фазы. Фосфорилированный Cdc6 затем убиквитинилируется и подвергается протеасомной деградации. В клетках многоклеточных организмов аналогичным образом инактивируется Cdt1. Также у дрожжей и животных происходит CDK-зависимое фосфорилирование ORC2, что препятствует его связыванию с ДНК.

У многоклеточных животных обнаружен дополнительный регуляторный механизм. В их клетках присутствует небольшой белок геминин. Он связывается с Cdt1 и ингибирует его. В конце митоза и ранней G_1 -фазе геминин убиквитинилируется крупным регуляторным комплексом — циклосомой (также называемой APC/C — апарhаse-promoting complex/cyclosome). Убиквитинилированный геминин разрушается протеасомой, тем самым высвобождая Cdt1 для нового раунда инициации репликации.

- Основным событием в процессе инициации репликации ДНК высших эукариот является сборка пререпликативного комплекса, включающего комплекс ORC-белков и комплекс MCM-белков.
- Гексамер МСМ-белков представляет собой латентную ДНК-хеликазу, которая активируется фосфорилированием одной или нескольких субъединиц гексамера.

3.6. РЕПЛИКОНЫ И КЛАСТЕРЫ РЕПЛИКОНОВ

В классических экспериментах Хубермана и Риггса было показано, что в клетках высших эукариот репликация ДНК начинается одновременно в нескольких местах. Эти авторы вводили в ДНК активно делящихся клеток высокорадиоактивный предшественник (³Н-тимидин). Через короткий промежуток времени инкубационную среду разводили свежей средой без радиоактивного предшественника, в результате чего его концентрация значительно снижалась. После непродолжительной инкубации клетки лизировали, ДНК растягивали на стеклах и покрывали фотоэмульсией. После экспозиции можно было видеть картину, которая показана на рис. ХІ на цветной вклейке. В определенных местах (предположительно на одной и той же нити ДНК) можно было видеть треки, отражающие включение радиоактивного предшественника. Направление движения репликативных вилок легко определялось по уменьшающейся толщине треков (как было сказано выше, второй этап включения радиоактивной метки в ДНК проводили при существенно мень-

шей концентрации радиоактивного предшественника). В целом, полученные результаты позволяли заключить, что репликация начинается одновременно в нескольких точках и имеет двунаправленный характер. Фрагмент ДНК, который реплицируется с одного участка начала репликации, получил название репликон. Фотография, показанная на рис. XI на цветной вклейке, позволяет сделать еще одно важное предположение: активные репликоны организованы в кластеры. Действительно, в экспериментах по авторадиографии растянутой на стеклах импульсно-меченой ДНК обычно видны либо кластеры репликонов, либо вообще пустые поля. Единичные репликоны встречаются крайне редко.

обычно видны лиоо кластеры репликонов, лиоо воооще пустые поля. Единичные репликоны встречаются крайне редко.

Для выявления включенного в ДНК ³Н-тимидина препараты растянутой на стекле ДНК покрывали фотоэмульсией и экспонировали в течение нескольких месяцев. В настоящее время для анализа репликонов в реплицирующуюся ДНК включают бромодезоксиуридин или другие модифицированные предшественники (или их комбинации), которые могут быть визуализированы с помощью конъюгированных с флуорохромом антител. Это позволило сократить время получения результатов до нескольких часов, что сократить время получения результатов до нескольких часов, что стало вторым рождением метода анализа репликационных структур в растянутой на стекле ДНК. В настоящее время такой подход с успехом используется для анализа репликационной структуры индивидуальных областей генома. Для того чтобы «привязать» картинку распределения репликонов к индивидуальной области генома, проводят гибридизацию с рядом проб из изучаемой области генома. Пробы подбирают таким образом, чтобы распределение их в изучаемой области (совокупность сигналов и расстояний между ними) представляло собой своеобразный «штрих-код», позволяющий идентифицировать эту область при знадизе изображений пот ними) представляло собой своеобразный «штрих-код», позволяющий идентифицировать эту область при анализе изображений под микроскопом. Понятно, что гибридизационные пробы должны содержать модифицированный нуклеотид, который может быть выявлен с помощью конъюгированных с флуоресцентной меткой антител. Описанный экспериментальный подход позволяет не только изучать репликативную структуру индивидуальных областей генома, но и картировать участки начала репликации, работающие в индивидуальных клетках. С помощью этого метода был сделан ряд важных наблюдений. В частности, показано, что активация того или иного участка начала репликации подавляет активность соседних, поэтому в нормальных условиях средний размер репликонов остается постоянным, несмотря на использование альтернативных участков начала репликации. Но при подавлении активности ДНК-полимераз активируются дополнительные участки начала репликации, и средний размер репликонов резко сокращается.

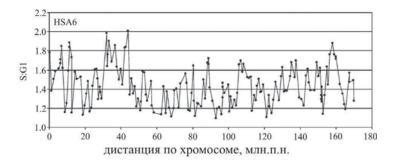
В исследованиях, выполненных с использованием других экспериментальных подходов, были получены дополнительные доказательства организации репликонов в кластеры. Было продемонстрировано, что репликативные вилки распределяются внутри ядра не случайным образом. При включении в ДНК делящихся клеток бромодезоксиуридина и последующей его визуализации конъюгированными с флуорохромом антителами можно видеть компартменты, в которых осуществляется репликация. Эти компартменты получили название репликационных фокусов (foci). Форма и размеры репликативных компартментов изменяются по ходу S-фазы (рис. XII на цветной вклейке). В начале S-фазы работающие кластеры репликонов относительно маленькие. Они практически равномерно распределяются по всему ядру, за исключением ядрышка и ядерной периферии. Далее наблюдается значительное увеличение среднего размера кластеров репликонов, который достигает максимума к концу S-фазы.

Подобно транскрипции, репликация ДНК осуществляется олимеразами, иммобилизованными на ядерном матриксе. При анализе под электронным микроскопом клеточных ядер, из которых была удалена основная масса хроматина, удалось обнаружить грушевидные структуры, в которых сконцентрированы репликационные комплексы (рис. XIII на цветной вклейке). Эти структуры получили название репликационных фабрик. В составе каждой репликационной фабрики присутствует более 20 репликативных комплексов. В начале S-фазы репликационные фабрики относительно малы (меньше 250 нм по длинной оси) и общее число их соответствует числу репликационных фокусов, которые можно видеть под флуоресцентным микроскопом. Далее происходит постепенное увеличение размеров репликационных фабрик (250–400 нм в середине S-фазы и более 400 нм в конце S-фазы). Изменяется и их распределение внутри ядра. В начале S-фазы они распределяются достаточно равномерно по всему объему ядра. В середине S-фазы репликационные фабрики кластеризуются на ядерной периферии и в околоядрышковом пространстве. Все эти наблюдения позволяют отождествить выявленные в составе ядерного матрикса репликационные фабрики и репликационные фокусы, которые можно идентифицировать до экстракции хроматина.

- Репликация ДНК высших эукариот инициируется одновременно во многих точках. Фрагмент генома, который реплицируется с одного участка начала репликации, называется репликоном.
- Репликоны организованы в кластеры. Это связано с организацией репликативных комплексов в репликационные фабрики.

3.7. РАННИЕ И ПОЗДНИЕ РЕПЛИКОНЫ

В клетках высших эукариот не все репликоны начинают работать одновременно. Существуют ранние репликоны, активирующиеся в начале S-фазы, репликоны, активирующиеся в различные временные интервалы по ходу S-фазы, и поздние репликоны, активирующиеся в конце S-фазы. Есть несколько экспериментальных подходов, позволяющих определить время репликации представляющего интерес гена. Наиболее общий подход заключается в том, что с использованием сортера разделяют клетки, находящиеся на разных стадиях S-фазы. Из этих клеток выделяют ДНК и тем или иным способом определяют относительную представленность изучаемых генов в данных препаратах ДНК. Альтернативный метод подсчета состоит в определении, насколько препарат ДНК из клеток, находящихся в S-фазе, обогащен определенными последовательностями по сравнению с препаратом ДНК из клеток, находящихся в фазе G_1 . Понятно, что наибольший уровень обогащения (близкий к двукратному) будет наблюдаться для генов, которые реплицируются в самом начале S-фазы. С появлением олигонуклеотидных чипов, представляющих протяженные области генома и отдельные хромосомы, появилась возможность составить карты, отражающие время репликации отдельных хромосомных доменов. На рис. 38 показаны карты времени репликации (с разрешением в 1 млн п. н.) хромосом 6 и 13 человека. Можно видеть, что раннереплицирующиеся и позднереплицирующиеся домены достаточно часто сменяют друг друга. Но существуют достаточно протяженные области, которые в целом реплицируются рано или, наоборот, поздно. Наиболее характерными в этом отношении являются две позднереплицирующиеся области на хромосоме 13. Достаточно давно было установлено, что большинство активно транскрибирующихся генов реплицируется в начале S-фазы. Анализ распределения активных генов и раннереплицирующихся доменов в границах отдельных хромосом в целом подтвердил наличие корреляции между транскрипционной активностью



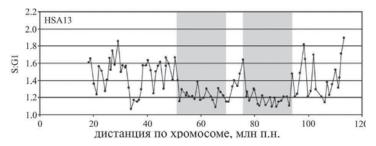


Рис. 38. Времена репликации

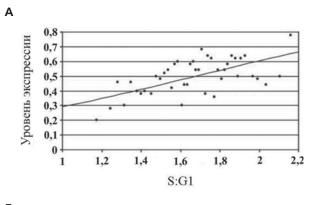
Карты времени репликации (с разрешением в 1 млн. п. н.) человеческих хромосом 6 (сверху) и 13 (снизу). Серым выделены так называемые «генные пустыни» — районы, сильно обедненные генами (по сравнению со средней для генома величиной). Видно, что эти области являются позднереплицирующимися.

Из Woodfine K. et al. "Replication timing of the human genome" Human Molecular Genetics (2004) 13:191 с любезного разрешения Oxford University Press.

и временем репликации (рис. 39). Корреляция эта является, однако, далеко не абсолютной.

Для ряда геномных областей характерна асинхронная репликация, когда генный локус, находящийся на одной из хромосом, реплицируется в начале S-фазы, а тот же локус, находящийся на другой хромосоме, реплицируется в конце S-фазы. Асинхронную репликацию обычно связывают с наличием импринтинга (разд. 2.4). По некоторым данным, асинхронно реплицирующиеся области могут составлять до 20% человеческого генома.

Изучение времени репликации отдельных геномных доменов показало, что одни и те же области генома в разных типах клеток могут реплицироваться в различные моменты S-фазы в зависимости от того, какие группы тканеспецифичных генов активно работают в данном типе клеток. Было показано, что в неэритроидных клетках фрагмент ДНК протяженностью ≈ 200 т. п. н., включающий



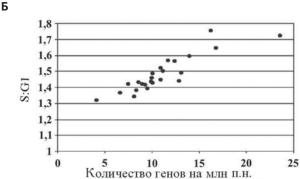


Рис. 39. Транскрипция и репликация

(A) Время репликации фрагментов ДНК, содержащих различные гены, определяли, сравнивая представленность этих фрагментов генома в клетках, находящихся в S-фазе, с их количеством в клетках в G_1 -фазе. Относительную интенсивность транскрипции определяли по обилию соответствующих мРНК в изучаемых клетках. Видна положительная, хотя и не очень яркая, корреляция между интенсивностью транскрипции гена и его репликацией в ранней S-фазе. (Б) Корреляция между средним временем репликации всех хромосом человека и плотностью генов на них. Каждая экспериментальная точка соответствует индивидуальной хромосоме. Хорошо видно, что богатые генами хромосомы реплицируются раньше.

Из Woodfine K. et al. "Replication timing of the human genome" Human Molecular Genetics (2004) 13:191 с любезного разрешения Oxford University Press.

кластер β-глобиновых генов, реплицируется в конце S-фазы, в то время как фланкирующие области реплицируются асинхронно. В эритроидных клетках появляется существенно более протяженный (≈1000 т. п. н.) раннереплицирующийся домен, включающий кластер β-глобиновых генов. Эти результаты четко продемон-

стрировали, что как ранне-, так и позднереплицирующийся домены организуются направленно в результате реализации некой клеточной программы. Это предполагало наличие регуляторного элемента (элементов), контролирующего установление временных зон репликации. Действительно, в экспериментах по изучению активности участка начала репликации домена β-глобиновых генов человека в новых геномных позициях (в геноме трансгенных мышей) было выявлено, что область контроля локуса (LCR) домена β-глобиновых генов содержит весь комплекс регуляторных элементов, необходимых для поддержания позднереплицирующего домена в неэритроидных клетках и раннереплицирующегося домена в эритроидных клетках. Делеционный анализ показал, что регуляторные последовательности, необходимые для поддержания ранне- и позднереплицирующего доменов, находятся в разных функциональных зонах LCR. Регуляторные последовательности, необходимые для установления временных зон репликации, были обнаружены и в некоторых других геномных областях.

функциональных зонах LCR. Регуляторные последовательности, необходимые для установления временных зон репликации, были обнаружены и в некоторых других геномных областях.

Следует подчеркнуть, что зависимость между активной транскрипцией гена и его репликацией в начале S-фазы не является абсолютной. Некоторые активно транскрибирующиеся гены находятся в позднереплицирующихся геномных доменах. Иными словами, не транскрипция сама по себе, а статус хроматинового домена определяет время активации участков начала репликации. Не последнюю роль здесь может играть ацетилирование гистонов. Недавно было продемонстрировано, что одна из гистонацетилаз (НВО1) прямо взаимодействует с белками, участвующими в инициации репликации (МСМ2 и ORC1). В ряде работ была выявлена корреляция между ранней репликацией и наличием модификаций гистонов, характерных для активного хроматина (ацетилирование НЗ по К9, дии триметилирование НЗ по К4). Одновременно было показано, что для позднереплицирующихся областей характерно наличие модификаций гистонов, связанных с формированием неактивных хроматиновых доменов (ди- и триметилирование НЗ по К9).

- Не все участки начала репликации ДНК высших эукариот активируются одновременно в начале S-фазы. Существуют ранние и поздние репликоны.
- Есть положительная корреляция между транскрипционной активностью и ранней репликацией.
- Время репликации тканеспецифичных генов часто зависит от типа клеточной дифференцировки и контролируется теми же регуляторными

- элементами, которые контролируют активацию транскрипции тканеспецифичных генов.
- Раннереплицирующиеся домены характеризуются наличием типичного для активного хроматина спектра модификаций гистонов. Позднереплицирующиеся домены характеризуются наличием типичного для неактивного хроматина спектра модификаций гистонов.

3.8. РЕПЛИКАЦИЯ ХРОМАТИНА

Нуклеосомы представляют очевидное препятствие для продвижения репликационной вилки. Показано, что расположенные перед репликационным комплексом нуклеосомы удаляются и перемещаются на новосинтезированную ДНК. При этом не существует никакого предпочтения в отношении лидирующей или отстающей цепей. Не вполне ясно, каким именно образом происходит удаление нуклеосом. В течение ряда лет считалось, что сам по себе репликационный комплекс обладает достаточной энергией, для того чтобы «расчистить себе дорогу», удалив расположенные перед ним нуклеосомы. В настоящее время получены убедительные свидетельства, что для удаления нуклеосом, находящихся перед репликативным комплексом, необходимы факторы ремоделирования хроматина. Показано также, что перемещению нуклеосомы за репликационную вилку предшествует диссоциация димеров Н2А-Н2В. В этом процессе участвует белковый комплекс FACT (т. е. работает та же система, которая обеспечивает дестабилизацию нуклеосом по ходу транскрипции — см. разд. 2.2). FACT непосредственно взаимодействует с комплексом МСМ-белков, что и обеспечивает привлечение FACT к репликационным вилкам. Тетрамер гистонов (Н3-Н4)2 переносится на новисинтезированную ДНК целиком. После этого к нему могут присоединяться как димеры Н2А-Н2В из разобранных нуклеосом, так и димеры Н2А-Н2В, построенные из новосинтезированных гистонов.

как димеры Н2А-Н2В из разобранных нуклеосом, так и димеры Н2А-Н2В, построенные из новосинтезированных гистонов. Понятно, что при простом перемещении родительских нуклеосом на новосинтезированную ДНК плотность нуклеосом на ДНК уменьшится в два раза. Этого не происходит потому, что одновременно с переносом на новосинтезированную ДНК родительских нуклеосом происходит сборка новых. Процесс сборки новых нуклеосом изучен достаточно подробно. В модельном эксперименте можно осуществить самосборку нуклеосом на чистой ДНК. Для этого необходимо тем или иным образом частично компенсиро-

вать положительный заряд молекул гистонов. Это можно сделать с помощью включения в инкубационную смесь отрицательно заряженных шаперонов либо просто повышая ионную силу. Собранные в такой системе нуклеосомные частицы будут расположены на ДНК нерегулярно. Для достижения регулярного распределения нуклеосом вдоль ДНК в инкубационной смеси должен присутствовать фактор ремоделирования хроматина, например АСГ или RCF (каталитическая субъединица SWI).

RCF (каталитическая субъединица ISWI) или Вгаhmа (каталитическая субъединица SWI).

В живых клетках реализуются те же подходы, хотя, разумеется, в более сложной форме. Нуклеосомы собираются в два этапа. Сначала на ДНК собирается тетрамер гистонов НЗ и Н4. В этом процессе участвуют переносчики гистонов САF-1 (chromatin assembly factor 1) и ASF1 (antisilencing function 1). Гистоны НЗ и Н4 переносятся в ядро в виде гетеродимеров. Новосинтезированные гистоны особым образом ацетилируются. N-концевой домен гистона НЗ ацетилируется по большинству остатков лизина, тогда как N-концевой домен гистона Н4 ацетилируется преимущественно по позициям К5 и К12. Помимо N-концевых доменов, ацетилируются и остатки лизина, которые находятся внутри нуклеосомной глобулы. Наиболее характерным является ацетилирование НЗК56 и Н4К91. Эти модификации играют важную роль в регуляции процесса созревания хроматина. Ацетилирование новосинтезированных гистонов осуществляется гистонацетилазами группы В (наиболее охарактеризованный представитель — Наt1), которые не участвуют в ацетилировании гистонов, входящих в состав собранных нуклеосом. Характерное для новосинтезированных гистонов ацетилирование N-концевых доменов Н3 и Н4 удаляется через достаточно большой промежуток времени (20–60 мин.) после сборки нуклеосоминых частиц. Ацетилирование Н3 по К56 удаляется на границе G2- и М-фаз клеточного щикла. Ключевую роль в транспорте гетеродимеров гистонов Н3-Н4 к местам осуществления репликации играет переносчик гистонов САF-1, который обладает сродством к PCNA. САF состоит из трех субъединиц. Самая большая из этих субъединиц (р150) содержит сайт димеризации и сайт связывания с PCNA. Эти процессы (димеризация и связывание с PCNA) являются взаимоисключающими. Фосфорилирование р150 киназой Сdс7-Dbf4 препятствует димеризации р150, способствуя таким образом взаимодействию р150 с PCNA. На этом уровне осуществляется координация процесса репликации ДНК и процесса сборки новых нуклеосом. Фактор АSF1 не обладает сродством к PCNA. Привлечение этого фактора к реп

образованию тетрамера (Н3-Н4)₂. Недавно была охарактеризована трехмерная структура комплекса ASF1 с гетеродимером Н3-Н4. В составе этого комплекса ASF1 взаимодействует с С-концевыми доменами обоих гистонов. С-концевой домен гистона Н3 необходим для сборки тетрамера (Н3-Н4)₂. Это объясняет механизм, с помощью которого ASF1 препятствует образованию тетрамера. С-концевой домен гистона Н4 взаимодействует с гистоном Н2А в составе нуклеосомы. Нарушение этого взаимодействия может способствовать диссоциации димера Н2А-Н2В. Поэтому ASF1 может участвовать как в сборке, так и в разборке нуклеосомных глобул.

Подобно гетеродимерам Н3-Н4, гетеродимеры новосинтезированных гистонов Н2А-Н2В собираются уже в цитоплазме. Транспорт этих димеров в ядро и присоединение их к тетрамеру (Н3-Н4)₂ осуществляет белок-переносчик NAP-1 (nucleosome assembly protein 1). Как и в модельном эксперименте *in vitro*, для обеспечения регулярного расположения нуклеосом на вновь синтезированной ДНК требуются комплексы ремоделирования хроматина. Эту функцию могут выполнять комплексы ремоделирования хроматина, содержащие как каталитическую единицу SWI (Вгаhma), так и ISWI (RCF, ACF). Присутствующий в клетках дрозофилы фактор ремоделирования хроматина Brahma может связываться с переносчиком гистонов ASF1. Каким образом к репликационным вилкам привлекаются другие комплексы ремоделирования хроматина (RCF, ACF), пока остается неясным. С высокой степенью вероятности можно предположить, что они также способны связываться с одним из переносчиков гистонов, участвующих в сборке нуклеосом, либо непосредственно с компонентами репликационного комплексы ремоделирования хроматина необходимы и для осуществления репликационного комплексы ремоделирования хроматина необходимы и для осуществления репликационного комплексы ремоделирования хроматина необходимы и для осуществления репликации ЛНК. организованной в нуклеосомы.

комплекса. Последнее представляется вполне логичным, так как комплексы ремоделирования хроматина необходимы и для осуществления репликации ДНК, организованной в нуклеосомы. При репликации хроматина весьма актуальной является проблема воспроизведения профилей пост-трансляционных модификаций гистонов. В настоящее время наиболее полно изучен процесс воспроизведения профилей пост-трансляционных модификаций гистонов, необходимых для поддержания неактивных хроматиновых доменов, в первую очередь прицентромерного гетерохроматина. Ключевую роль здесь играет PCNA, который образует комплекс с поддерживающей ДНК-метилтрансферазой (Dnmt1) и гистондезацетилазами. В свою очередь, Dnmt1 образует комплексы с целым рядом ферментов, вносящих характерные для неактивного хроматина пост-трансляционные модификации гистонов. Наиболее важной является способность Dnmt1 привлекать к репликационным вилкам гистонметилазы, специфичные

в отношении НЗК9 (G9a) и НЗК27 (EZH2). К репликационным вилкам привлекается и комплекс, осотоящий из МВD1, SETDBH и CAF1. Этот комплекс осуществляет метилирование гистона НЗ по позиции К9. Само по себе метилирование осуществляет гистониетилаза SETDBH. Процесс метилирование тистонов зависит от наличия в ДНК метилированных СрG-динуклеотидов, которые узнает белок МВD1, и от осуществления репликации. Координацию с репликацией обеспечивает присутствующий в составе комплекса САF1. В этой конкретной системе именно метилированые дНК определяет те участки генома, которые будут упакованы в нуклеосомы, содержащие Н3, метилированный по К9. В связи с этим следует отметить, что Dnmt1 не может метилировать ДНК в составе канонических нуклеосомных частиц. По-видимому, именно по этой причине в клетке существует процесс созревания нуклеосом. Как уже говорилось выше, новосинтезированные гистоны Н3 и Н4 ацетилированы по ряду позиций. Раньше считалось, что эти модификации необходимы для транспорта гистонов в клеточное ядро. В настоящее время продемонстрировано, что транспортироваться в дпро (с помощью САF-1 и АSF1) могут и немодифицированные гистоны. В то же время, ацетилирование Н3 и Н4, особенно ацетилирование Н3К56 и Н4К91, дестабилизирует нуклеосомную глобулу. Так обеспечивается определенный временной интервал, в течение которого может осуществляться метилирование организованной в нуклеосомы ДНК. Не исключено, что этот интервал используется и для замещения канонических гистонов ва их вариантные формы. Зависящая от репликации сборка нуклеосом илет преимущественно из основных форм гистонов. Вариантные формы включатотя в нуклеосомы днК гистона Н3.3 используется белок-переносчик Н1RA. Ясно, что перед сборкой новых нуклеосом, содержащих вариантные гистоны, необходимо разобрать старые нуклеосомы. Ряд экспериментальных результатов позволяет предплолюжить, что в этом процессоу участвует фактор округаесом, с одержащия Н3.3 а справижением транскрипцией замена Н3.1 на Н3.3 сама по себе будет способствовать концентрации Н3.3 в гранскрипцие

СЕNР-А и другие центромерные варианты гистона Н3 (CenH3) включаются в хроматин по независимому от репликации пути. Недавно из клеток разных организмов были выделены белковые комплексы, обеспечивающие включение белков CenH3 в нуклеосомы. В клетках человека этот комплекс включает ряд центромерных белков, переносчик гистонов нуклеофосмин (nucleophosmin) и субъединицы белкового комплекса FACT, способствующего частичной разборке гистонового октамера (см. разд. 2.2). Размещение новоснтезированного белка CENP-А в центромерных участках хромосом, вероятно, обеспечивается центромерными белками, присутствующими в составе белкового комплекса, который отвечает за включение CENP-А в нуклеосомы. В клетках дрозофилы включение в нуклеосомы центромерного варианита гистона Н3 (белок Cid) осуществляется с помощью переносчика гистонов RbAp48.

центромерного варианита гистона Н3 (белок Cid) осуществляется с помощью переносчика гистонов RbAp48.

Что касается включения в нуклеосомы вариантных форм гистона Н2A, то для этого не требуется полной разборки нуклеосомы. Замена «канонического» димера Н2A-Н2В на димер Н2A.Z-Н2В происходит при участии комплекса ремоделирования хроматина Swr1. Переносчики, необходимые для замещения канонического Н2A на другие вариантные формы (Н2A.X, macroH2A и H2A.Bbd), пока не охарактеризованы.

- При осуществлении репликации ДНК находящиеся перед репликационной вилкой нуклеосомы разбираются на тетрамер и димеры H2A-H2B.
- Тетрамер (Н3-Н4)₂ полностью переносится на вновь реплицированную ДНК. К нему могут присоединяться как «старые» димеры Н2А-Н2В, так и димеры, состоящие из вновь синтезированных гистонов.
- Сборка нуклеосом из новосинтезированных гистонов осуществляется в несколько этапов. Сначала из димеров H3-H4 собирается тетрамер (H3-H4)₂, потом к нему присоединяются димеры H2A-H2B.
- Перенос в ядро димеров H3-H4 и димеров H2A-H2B осуществляется при участии разных переносчиков.
- Вариантные формы гистонов включаются в нуклеосомы по независимому от репликации ДНК пути при участии особых переносчиков.

3.9. КОНДЕНСАЦИЯ И РАСХОЖДЕНИЕ ХРОМОСОМ В МИТОЗЕ

Нормальное протекание митоза требует, чтобы сестринские хромосомы оставались рядом друг с другом вплоть до расхождения, происходящего в анафазе. Связь и удержание хроматид

осуществляет белковый комплекс когезин. Основой когезина дрожжей S. cerevisiae является гетеродимер белков SMC1 и SMC3 (SMC — structural maintenance of chromosomes). Также в состав когезина входят белки Scc1 (Scc — sister chromatid cohesion; другие названия — Mcd1 или Rad21) и Scc3 (он же Psc3 и SA1/2), не относящиеся к семейству SMC.

Когезин — один из нескольких крупных белковых комплексов, основу которых составляют белки семейства SMC и активность которых абсолютно необходима для нормального функционирования генома. К семейству SMC, помимо субъединиц когезина SMC1 и SMC3, относятся еще ряд белков, также важных для нормального функционирования генетического аппарата клетки. Это компоненты конденсина SMC2 и SMC4 (см. ниже) и еще одного комплекса — SMC5 и SMC6, принимающего участие в репарации. Все они устроены одинаково (рис. 40). Это большие белки, содержащие 1000–1300 аминокислотных остатков. На N-конце расположен глобулярный домен с мотивом Walker A, на С-конце — другой глобулярный домен с мотивом Walker B. Остальная часть белка представлена протяженным суперспиральным трактом, который в середине прерван «шарниром». В этом шарнире мокоторыи в середине прерван «шарниром». в этом шарнире мо-лекула белка складывается так, что два суперспиральных тракта образуют единый домен, а оба глобулярных домена, соединяясь, образуют функционирующую АТФазу. Две таких сложенных белковых молекулы димеризуются своими шарнирами, образуя V-образный димер. Белки SMC не образуют гомодимеров, только у-образный димер. Велки SMC не образуют гомодимеров, только гетеродимеры. Длина каждого плеча этого гетеродимера — около 50 нм, что соответствует примерно 150 п. н. ДНК. Гетеродимер весьма гибок, наблюдаются различные конформации: V-образная, Y-образная, I-образная, кольца. В состав полного комплекса — когезина, конденсина или SMC5/6 — обязательно входит также одна молекула белка из семейства клейзинов. В случае когезина это α -клейзин Scc1, или Rec8 в мейотических клетках, для конденсина — β -клейзин Kle-2 или γ -клейзин XCAP-H, для SMC5/6 δ-клейзин Qri2. Клейзин связывается с глобулярными доменами обоих SMC-белков гетеродимера и «замыкает» его. Тем самым образуется «скрепка» (clamp) на дуплексе ДНК, и связь когезина с ДНК — сугубо топологическая. Размыкание белкового комплекса в любом месте приводит к высвобождению ДНК. Внутренний просвет SMC-гетеродимеров достаточен, чтобы заключить не только «голую» ДНК, но и 10-нм фибриллу с нуклеосомами (см. рис. 1).

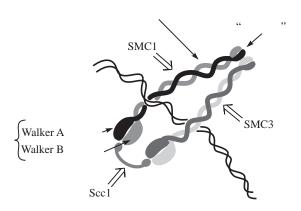


Рис. 40. Белки SMC

Все белки суперсемейства SMC устроены одинаково. На рисунке изображена схема строения когезина. Этот комплекс состоит из SMC1, SMC3 и α -клейзина Scc1. Гетеродимер имеет замкнутую форму, охватывая двуспиральную ДНК. Молекула клейзина замыкает гетеродимер, и для снятия когезина с ДНК необходимо расшепить молекулу клейзина.

У дрожжей S. cerevisiae погрузка когезина на хроматин происходит в G_1 -фазе клеточного цикла. Погрузку осуществляет белковый комплекс Scc2-Scc4. На хромосоме когезиновые комплексы располагаются с шагом около 10 т. п. н., но в центромерном районе — гораздо чаще. Никакой предпочтительности нуклеотидной последовательности при посадке когезина не обнаружено. В отличие от дрожжей у многоклеточных животных посадка когезина происходит не в G₁-фазе, а в конце телофазы, и для ее осуществления, помимо белков-погрузчиков, необходимы факторы репликации ORC и MCM2-7. Любопытно, что сайты связывания белка-погрузчика Scc2 часто не совпадают с сайтами локализации когезина. По-видимому, когезиновые комплексы могут скользить по хроматиновой нити. Механизм этого скольжения не установлен, однако, по косвенным данным, для перемещения необходима транскрипция — возможно, когезиновое кольцо «проталкивается» элонгирующей РНК-полимеразой. Косвенным подтверждением этого является частое совпадение сайтов локализации когезина с районами «схождения» транскрипции — участками между генами, транскрибируемыми навстречу друг другу. Интересной особенностью таких районов генома является пониженная плотность

нуклеосом. Особенно много когезина обнаруживается в прицентромерном районе. Это необходимо для надежной когезии хроматид в метафазе. Показано, что субъединица Scc3 когезина дрожжей способна взаимодействовать с белком Swi6 (дрожжевым гомологом HP1). Благодаря этому когезиновые комплексы рекрутируются на Swi6-содержащий прицентромерный гетерохроматин в количестве, гораздо большем, чем на плечах хромосом.

гораздо большем, чем на плечах хромосом.

Погрузка когезина на хроматин не является, однако, достаточной для удержания сестринских хроматид. Несмотря на практически полное отсутствие данных о механизме этого процесса, ясно, что установление когезии хроматид — активный процесс, в котором, помимо когезина, принимают участие и другие белки. Для когезии необходимы ассоциированная с PCNA ацетилтрансфераза Eco1 (у человека — Eso1), комплекс RFC, ДНК-полимераза к и другие белки. Вероятно, установление когезии как-то связано с прохождением реплисомы. Стоит отметить, что процесс установления когезии четко локализован во времени: молекулы когезина, синтезированные после окончания S-фазы, не участвуют в удержании сестринских хроматид, хотя и устанавливаются на хроматин.

В профазе митоза у большинства эукариот (но не у S. cerevisiae) практически все когезиновые комплексы снимаются с плеч хромосом. Ассоциированными с хроматином остаются крайне незначительная

практически все когезиновые комплексы снимаются с плеч хромосом. Ассоциированными с хроматином остаются крайне незначительная доля когезиновых комплексов на плечах хромосом и когезины, расположенные в прицентромерных районах. Диссоциация когезина в профазе обусловлена фосфорилированием субъединицы Scc3 киназами Aurora B и Polo-подобной киназой. Прицентромерный когезин защищен от действия киназ белком шугозином. Центромерная локализация шугозина обеспечивается его фосфорилированием киназой Aurora B. Она присутствует в ядре в составе крупного комплекса с регуляторными факторами INCENP, сурвивином и бореалином. Этот комплекс, называемый комплексом хромосомных пассажиров (СРС — chromosomal passenger complex), играет важную роль в регуляции разных аспектов клеточного цикла и в разных его фазах локализуется в разных частях клетки.

После снятия большей части когезинов с плеч хромосом происходит конденсация интерфазного хроматина в митотические хромосомы. Однако прелюдия к конденсации хромосом начинается задолго до митоза, в ранней G₂-фазе. Первым этапом этого процесса является фосфорилирование гистона Н3 по серину-10. Эта модификация вносится киназой Aurora B. Сначала фосфорилируется Н3 в центромерных областях, затем модификация распро-

страняется к теломерам. Не вполне ясен смысл этой модификации. Наиболее вероятно, что фосфорилирование серина-10 приводит к удалению белка гетерохроматина HP1, так как фосфосерин-10 мешает хромодомену HP1 взаимодействовать с находящимся рядом триметилированным лизином-9. В то же время одного только фосфорилирования серина-10 недостаточно для удаления HP1, необходимо также ацетилирование лизина-14. Таким образом, вопрос о роли фосфорилирования H3S10 остается открытым.

Собственно конденсация хромосом осуществляется надмолекулярным белковым комплексом конденсином. Он чрезвычайно похож на когезин. Основу конденсина как и когезина составляют два белка

Собственно конденсация хромосом осуществляется надмолекулярным белковым комплексом конденсином. Он чрезвычайно похож на когезин. Основу конденсина, как и когезина, составляют два белка семейства SMC — SMC2 и SMC4. Также в состав конденсина входит несколько не-SMC субъединиц. Наиболее изученный конденсин I X. laevis содержит белки XCAP-D2, XCAP-G и γ-клейзин XCAP-H (XCAP — Xenopus chromosome associated protein), образующие субкомплекс 11S. Клейзин XCAP-H, связываясь с гетеродимером SMC2-SMC4, рекрутирует белки XCAP-D2 и XCAP-G. Вместе эти три не-SMC компонента конденсина образуют субкомплекс 11S. Помимо конденсина I, существует также конденсин II. Его основу составляет тот же гетеродимер SMC2-SMC4, однако вместо γ-клейзина в него входит белок подсемейства β-клейзинов Kle-2. Он рекрутирует не D2 и G субъединицы, а D и G2.

Белок XCAP-H способен также взаимодействовать с топоизомеразой II. Тем самым по-видимому обеспечивается снятие про-

Белок ХСАР-Н способен также взаимодействовать с топоизомеразой II. Тем самым, по-видимому, обеспечивается снятие пространственных затруднений при работе конденсина. Необходимо отметить, что активность топоизомеразы II необходима и ранее, на стадии репликации ДНК. Нормальная активность конденсина возможна только в присутствии киназы Aurora B. Погрузка конденсина происходит в самом начале митоза, в ранней профазе. В конце анафазы конденсиновые комплексы снимаются с хромосом; механизм этого процесса пока неясен.

В конце анафазы конденсиновые комплексы снимаются с хромосом; механизм этого процесса пока неясен.

Полный конденсиновый комплекс (но не гетеродимер SMC2-SMC4) является ДНК-активируемой АТФазой. Расшепление АТФ необходимо для конденсации хромосом. Кроме того, нормальное функционирование конденсина *in vivo* возможно только в присутствии топоизомеразы І. Окрашивание митотических хромосом антителами к конденсину выявляет линейный осевой элемент в каждой хроматиде. Вероятно, после компактизации митотических хромосом конденсиновые комплексы остаются в центре хромосом, поддерживая их компактность и образуя вместе с рядом других компонентов белковый остов. Дополнительный вес этой

гипотезе придают данные о способности когезиновых комплексов взаимодействовать друг с другом, как шарнирными районами, так и C/N-концевыми глобулярными доменами, образуя протяженные

взаимодействовать друг с другом, как шарнирными районами, так и С/N-концевыми глобулярными доменами, образуя протяженные упорядоченные структуры, причем такие взаимодействия наблюдаются преимущественно в присутствии ДНК.

Выше было сказано, что существует два типа конденсинов, отличающихся клейзиновым компонентом и другими белками 11S-субкомплекса. Логично предположить, что конденсины I и II должны отличаться не только составом. Действительно, были выявлены различия между ними в локализации на хромосомах и в точных временах различных фаз активности (погрузке на хроматиновые фибриллы, стадиях конденсации) конденсинов I и II. Однако обнаруженные различия незначительны и совершенно не принципиальны. Они никак не объясняют, почему существует два различных конденсиновых комплекса, тогда как, например, когезин у всех эукариот только один.

В начале анафазы происходит расшепление оставшихся на хромосоме когезинов сепаразой. Непосредственной мишенью сепаразы является субъединица Scc1. Большую часть клеточного цикла сепараза ингибирована секурином. Для активации сепаразы секурина должен быть ингибирован. Это осуществляется путем полиубиквитинилирования этого белка, благодаря чему он направляется на протеасомную деградацию. Полиубиквитинилирование секурина осуществляет циклосома, но только после того, как с ней свяжется белок Сdc20. Большая часть клеточного цикла Сdc20 присутствует в виде неактивного комплекса с другим белком — Mad20. Высвобождение Сdc20 происходит только после правильного присоединения микротрубочек веретена деления ко всем кинетохорам. У позвоночных, помимо этого, сепараза фосфорилируется митотическими циклин-зависимыми киназами (CDK), что также приводит к ее инактивации в начале митоза. Активация сепаразы возможна только после инактивации митотических циклинов, что также осуществляет циклосома. Субъединица Scc1, в свою очередь, в митозе фосфорилируется Рою-подобной киназой, что делает ее более доступной для сепаразы. более доступной для сепаразы.

- Когезия сестринских хроматид обеспечивается белковым комплексом когезином, основу которого составляют гетеродимер белков семейства SMC.
- Установление когезии требует участия дополнительных факторов, помимо когезина, и четко локализовано во времени.
- Дольше всего когезия сохраняется в центромерных районах.

- Конденсация хроматина в митотические хромосомы осуществляется конденсином, который также является гетеродимером белков семейства SMC с дополнительными белками.
- Конденсин не только обеспечивает конденсацию хромосом, но и поддерживает их в компактном состоянии.
- Все SMC-содержащие белковые комплексы представляют собой топологические замкнутые кольца, «надетые» на одну или две 10-нм фибриллы.

ХРОМАТИН И РЕПАРАЦИЯ

В ходе жизнедеятельности клетки постоянно возникают разнообразные повреждения ДНК — от повреждений отдельных нуклеотидов до разрывов цепей. Некоторые из повреждений относительно безопасны и приводят «всего лишь» к точечным мутациям, например дезаминированные азотистые основания. Другие же, например двуцепочечные разрывы, активируют те или иные сигнальные каскады, блокируя клеточный цикл в так называемых контрольных точках. Очевидно, однако, что любые нарушения структуры ДНК должны быть устранены как можно быстрее, даже «безопасные» точечные мутации.

Столь же очевидно, что упаковка ДНК в хроматин скрывает позиции повреждений, существенно осложняя не только репарацию, но и детекцию повреждений. С другой стороны, упаковка ДНК в хроматин может влиять на подверженность генетического материала нарушениям — опять-таки за счет различной доступности участков ДНК для тех или иных воздействий. Так как для эффективной репарации необходим доступ к ДНК, то неизбежно следует необходимость существенного вмешательства в структуру хроматина перед началом репарации и восстановления первоначальной структуры после нее. Это ставит проблему восстановления модификаций хроматина после успешной репарации. Кроме того, возникает еще одна интересная проблема: как было сказано, для успешной репарации необходимо обеспечить доступ к ДНК. Для этого, в свою очередь, необходимо разрыхлить структуру хроматина, а самый очевидный способ добиться этого — ацетилировать гистоны. Однако ацетилирование гистонов (да и вообще доступность ДНК) является признаком, и более того — стимулом активации генов! Таким образом, можно ожидать, что репарация может приводить к снятию инактивации генов. В связи с этим весьма примечателен тот факт, что активации репарации двуцепочечных разрывов предшествует привлечение в соответствующий фрагмент хроматина гистонацетилаз, которое, однако, вскоре сопровождается привлечением дезацетилаз. Вскоре после завершения репарации уровень ацетилирования гистонов в «исправленном» районе быстро снижается до уровня, наблюдавшегося до репарации.

- Репарация требует ремоделирования хроматина.
- Репарация может сопровождаться активацией транскрипции, блокирование которой осуществляется быстрым возвращением исходного эпигенетического статуса.

4.1. ФОТОРЕПАРАЦИЯ

Этот путь репарации, в первую очередь, необходим для репарации УФ-индуцированных повреждений, среди которых преимущественно образуются пиримидин-6-4-пиримидиноны и циклобутановые пиримидиновые димеры (рис. 41). Влияние упаковки генома в хроматин проявляется уже при образовании таких повреждений: циклобутановые производные обнаруживаются в основном в тех участках малой бороздки ДНК, которые отвернуты от гистонового октамера; фотопродукты наблюдаются преимущественно в линкерной ДНК, хотя выявляются и в нуклеосомной, причем равномерно по всей длине нуклеосомной ДНК. Все УФ-индуцированные повреждения вызывают нарушения структуры двойной спирали, которые и служат маркером наличия повреждений. Репарация таких повреждений также сильно зависит от структуры хроматина. На свободной от нуклеосом ДНК или линкерных районах репарация идет существенно быстрее.

щественно оыстрее. Повреждения, индуцированные ультрафиолетом, могут репарироваться без вырезания нуклеотидов или азотистых оснований. С поврежденным участком связывается ДНК-фотолиаза, которая «выворачивает» модифицированные основания и под действием света с длиной волны 340–400 нм расшивает фотопроизводные, после чего возвращает нуклеотидам исходную конформацию и диссоциирует. Фотолиаза дрожжей *S. cerevisiae* Phr1 демонстрирует явное предпочтение нетранскрибируемой

Рис. 41. Продукты УФ-облучения ДНК

Основными продуктами воздействия на ДНК ультрафиолетового облучения являются циклобутановые пиримидиновые димеры (A) и более сложные димеры — пиримидин-6-4-пиримидиноны (Б).

цепи активных генов. Кроме того, ее ингибирует РНК-полимераза II, «застрявшая» на повреждении ДНК. Повышение эффективности фоторепарации требует активности ремоделирующих комплексов SWI/SNF и ISW2. При этом SWI/SNF дестабилизирует нуклеосому, контактирующую с повреждением, индуцированным УФ-излучением, а ISW2 осуществляет слайдинг на соседний участок ДНК.

- Локализация УФ-индуцированных повреждений опосредована структурой хроматина.
- Эффективная фоторепарация требует ремоделирования хроматина.

4.2. ВЫРЕЗАНИЕ НУКЛЕОТИДОВ

Другим путем репарации фотопроизводных является эксцизия нуклеотидов (NER — nucleotide excision repair). Как и при фоторепарации, происходит изменение структуры хроматина в этом районе. Через несколько минут после облучения наблюдается гиперацетилирование гистона Н3 гистонацетилазой GCN5,

а также повышение общего уровня ацетилирования гистонов H3 и H4.

В зависимости от того, транскрибируется поврежденный участок ДНК или нет, задействуются различные системы обнаружения повреждения, тогда как собственно репарация в обоих случаях осуществляется одними и теми же белками. У *S. cerevisiae* фотопроизводные в транскрибируемых районах опознаются белком Rad26 и субъединицей РНК-полимеразы II Rbp9, а в нетранскрибируемых — белковым комплексом Rad16-Rad7-Abf1. Но, вероятно, первичным сенсором как минимум циклобутановых производных является сама РНК-полимераза II, так как пиримидиновые димеры являются сильным препятствием для продвижения этого фермента. Rad26 относится к семейству SWI2/SNF2 ДНК-зависимых АТФаз и ассоциирован с холоферментом РНК-полимеразы II. Он способствует прохождению полимеразой пиримидиновых димеров, тем самым делая фотопроизводное доступным для репарирующих ферментов.

В нетранскрибируемых районах детекцию фотопроизводных осуществляет комплекс Rad16-Rad7. Как и Rad26, белок Rad16 принадлежит к семейству SWI2/SNF2. В комплексе с белком Rad7 он сканирует ДНК, расходуя при этом энергию АТФ, и при обнаружении фотопроизводного связывается с ним, теряя при этом АТФазную активность. Зафиксированный на ДНК Rad16-Rad7 привлекает других участников репарации, а также содействует вырезанию фрагмента ДНК с фотопроизводным. После фиксации комплекса Rad16-Rad7 к нему привлекается базальный фактор транскрипции ТFIIH, который является хеликазой, и белок RPA, стабилизирующий оцДНК (см. разд. 3.1). Тем самым создается стабильный участок расплетенной ДНК в окрестности фотопроизводного, к которому привлекается еще ряд белков группы Rad, которые и осуществляют удаление содержащего фотопроизводное фрагмента цепи ДНК длиной 25–30 нуклеотидов. Образовавшаяся брешь застраивается ДНК-полимеразами δ и ε.

- Вырезание нуклеотидов происходит по-разному на транскрибируемых и нетранскрибируемых участках генома.
- При репарации путем вырезания нуклеотидов происходит ацетилирование гистонов посредством GCN5, а также ремоделирование хроматина комплексами SWI2/SNF2.

4.3. ВЫРЕЗАНИЕ ОСНОВАНИЙ

Повреждения ДНК, которые не приводят к заметному искажению ее структуры, в основном репарируются посредством вырезания азотистых оснований (BER — base excision repair). В этом случае с поврежденным азотистым основанием связывается специфическая N-гликозилаза, которая расщепляет N-гликозидную связь между основанием и дезоксирибозой. Образовавшийся AP-сайт (AP — apurinic/apyrimidinic) затем расщепляется AP-эндонуклеазой либо AP-лиазой. Образовавшаяся брешь застраивается полимеразой и лигируется. При этом может удаляться либо только поврежденный нуклеотид, либо олигонуклеотидный тракт протяженностью, как правило, 2–6 нуклеотидов. Детали процесса сильно зависят от конкретного повреждения азотистого основания. Каждому ненормальному основанию соответствует специфическая N-гликозилаза, которая и определяет дальнейший путь репарации.

Роль хроматина в данном пути репарации плохо исследована. Показано, однако, что эффективность BER зависит от работы гистонацетилаз, в частности CBP/p300, и комплексов ремоделирования хроматина.

 Эффективное вырезание оснований требует ацетилирования и ремоделирования хроматина.

4.4. РЕПАРАЦИЯ НЕСПАРЕННЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Одной из основных ошибок, возникающих в ДНК, является неспаренная «пара» нуклеотидов (mismatch). Как правило, такие ошибки возникают при репликации за счет неточной работы ДНК-полимераз. Поэтому основная активность по репарации таких ошибок наблюдается в клетке именно в связи с репликацией.

В бактериальных клетках репарация неспаренных нуклеотидов (MMR — mismatch repair) инициируется белками MutS и MutL. Задачей MutS является детекция нарушения дуплекса ДНК, а MutL передает следующим участникам процесса сигнал на запуск репарации.

Ситуация в эукариотических клетках аналогична, но существенно более сложна. Активность, аналогичную таковой MutS, проявляют два гетеродимерных комплекса — MSH2-MSH6 (MSH — MutS homolog) обозначаемый MutSα, и MSH2-MSH3 (MutSβ).

Большая часть клеточного MSH2 — до 90% — сосредоточена в комплексе MutSα. Он распознает неспаренные нуклеотиды и короткие инделы (это общее обозначение для инсерций и делеций) протяженностью 1–2 нуклеотида. Кроме того, комплекс MutSα распознает, хотя и с существенно меньшей эффективностью, инделы длиной 2–10 нуклеотидов. В свою очередь MutSβ с высокой эффективностью распознает такие «длинные» инделы, с меньшей — одно-двунуклеотидные инделы и практически не распознает мисматчи. Как и многие другие белки или белковые комплексы, сканирующие ДНК, комплекс MutSα представляет собой кольцо, «надевающееся» на двойную спираль ДНК. Но до сих пор остается неясным, как именно происходит детекция мисматча или индела. По одной из моделей кольцевой комплекс MutSα связывается с повреждением двойной спирали, после чего происходит гилрос повреждением двойной спирали, после чего происходит гидролиз $AT\Phi$. Благодаря этому $MutS\alpha$ открепляется от повреждения и скользит по двойной спирали, пока не столкнется с комплеки скользит по двойной спирали, пока не столкнется с комплексом MutL. Надо отметить, что, как и в случае с MutS, у эукариот обнаружено несколько гомологов MutL. Так же как и белки семейства MSH, они образуют несколько комплексов, сходных с бактериальным MutL, однако только для MutLα показано участие в процессах репарации. Еще один гомолог MutL — MutLγ — участвует в процессе мейотической рекомбинации, которая во многом напоминает репарацию (см. разд. 5.2). По другой модели, с повреждением ДНК связывается уже комплекс MutSα и MutLα. В любом случае, сразу после обнаружения дефекта или на некотором расстоянии от него комплекс MutSα-MutLα скользит по ДНК, пока не столкнется с препятствием. Здесь надо вспомнить, что репарация неспаренных нуклеотидов и коротких инделов тесно связана с репликацией. А этот процесс не может начаться до тех пор, пока не обеспечена физическая целостность ДНК. В то же время, репликация в эукариотических клетках характеризуется не только наличием фрагментов Оказаки, но и большим количеством независимых репликонов (см. разд. 3.6). Таким образом, там они вносятся по полуметилированным сайтам GATC, и вно-сит их эндонуклеаза MutH. В отличие от MutL и MutS гомологов MutH у эукариот не обнаружено.

На 3'-концах одноцепочечных разрывов, как было показано, находится фактор процессивности ДНК-полимераз белок PCNA в комплексе с RFC (см. разд. 3.1). Пока неясно, каким образом PCNA оказывается на концах разрывов в окрестностях мисматчей. Тем не менее сам факт участия PCNA в репарации неспаренных нуклеотидов был продемонстрирован несколькими группами авторов.

торов.
При столкновении MutSα-MutLα с PCNA-RFC происходит привлечение дополнительных факторов — экзонуклеазы EXO1 и белка RPA, который, как уже упоминалось в разделе 3.1, стабилизирует одноцепочечные участки ДНК. Комплекс MutSα-MutLα-EXO1 разрушает новую цепь ДНК от одноцепочечного разрыва до мисматча. После прохождения мисматча, по-видимому, вновь изменяется конформация MutSα, он диссоциирует, вследствие чего остальные компоненты комплекса также покидают ДНК. Образовавшаяся протяженная брешь достраивается ДНК-полимеразой δ, или, по некоторым данным, полимеразой ε.

или, по некоторым данным, полимеразой є.

Роль хроматина в данном процессе остается малоизученной. Известно, что эффективность MMR в разных частях генома неодинакова, что объясняют влиянием структуры хроматина. Эффективность работы MutSα существенно повышается при связывании с HMGB1 (см. разд. 1.2). Крометого, показано взаимодействие MLH1— универсального компонента эукариотических гомологов MutL— с киназой ATM (см. разд. 4.5). Тем не менее роль хроматина в процессе репарации неспаренных нуклеотидов практически не изучена. Отчасти это можно объяснить тем, что у эукариот этот процесс, возможно, вспомогателен и дополняет репарацию вырезанием оснований при ликвидации окислительных повреждений.

изучена. Отчасти это можно объяснить тем, что у эукариот этот процесс, возможно, вспомогателен и дополняет репарацию вырезанием оснований при ликвидации окислительных повреждений. Отдельно надо упомянуть замену цитозина на тимин. Очевидно, что в норме такая транзиция невозможна. При дезаминировании цитозина образуется урацил, который опознается урацил-ДНК-гликозилазой — одним из ферментов пути вырезания оснований. Однако при метилировании ДНК образуется 5-метилцитозин, который при дезаминировании превращается в тимин (рис. 21). Помимо того, что тимин является нормальным основанием ДНК, «пара» G-T с некоторой вероятностью будет выглядеть как нормальная уотсон-криковская пара благодаря кето-енольной таутомерии тимина (рис. 42), и ее не распознают системы репарации. Следует отметить, что урацил, образующийся при дезаминировании цитозина, переходит в енольную форму гораздо охотнее благодаря отсутствию метильной группы, являющейся донором

Рис. 42. Мутагенный эффект кето-енольной таутомерии урацила

В норме (А) спаривание гуанина и урацила (или тимина) невозможно. Однако урацил способен переходить из нормальной кето-формы в менее распространенную енольную (Б). В енольной форме урацил «имитирует» цитозин и образует нормальную уотсон-криковскую пару с гуанином (В).

G:U

электронной плотности и поэтому стабилизирующей кетогруппу в *орто*-положении. Устойчивая и практически каноническая пара G—U не всегда распознается урацил-ДНК-гликозилазой, что с течением времени может приводить к обогащению геномов парами AT. Тимин же, менее склонный к образованию нормальной пары с гуанином, будет нормально распознаваться системой репарации. Однако в отличие от других возможных повреждений замена ^{5то}С→Т происходит значительно чаще благодаря метилированию ДНК. Это приводит, во-первых, к уже упоминавшемуся в разд. 2.4 обеднению генома динуклеотидами CpG. Во-вторых, стандартная система репарации неспаренных нуклеотидов не может «разобраться», как именно нужно исправлять такое повреждение, и с большой частотой репарация дезаминированного 5-метилцитозина не вернет пару G—C, а заменит ее на А—Т. Поэтому возникла специальная система репарации. Основным ее элементом является метил-ДНК-связывающий белок МВD4 (methyl-DNA binding domain protein 4). Он связывается с районом ^{5′(5то}СрG)^{3′·} _{5′}(ТрG)_{3′} и расщепляет N-гликозидную связь между тимином и дезоксирибозой. Полученный апиримидиновый сайт далее процессируется стандартной системой репарации.

- Репарация неспаренных нуклеотидов тесно связана с репликацией ДНК.
- Репарация неспаренных нуклеотидов опосредована структурой хроматина.
- Метилирование ДНК обусловливает необходимость специальной подсистемы репарации мисматчей G–T, основанной на белке тимин-ДНК-гликозилазе MBD4.

4.5. РЕПАРАЦИЯ ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ

В первую очередь, необходимо отметить, что данный путь репарации крайне важен для эукариот. Многие повреждения ДНК, которые могут репарироваться перечисленными в предыдущих разделах способами, в целом ряде случаев процессируются до двуцепочечных разрывов, которые уже подвергаются репарации. С такими превращениями связана пострепликативная репарация. Нарушения в структуре ДНК либо ненормальные протекания каких-то процессов (например, блок транскрипции,

приводящей к остановке и фиксации РНК-полимеразы II) во время репликации приводят к возникновению двуцепочечного разрыва в одном из дочерних дуплексов ДНК. Кроме того, двуцепочечные разрывы могут быть следствием нарушения самой репликации, которое выражается в остановке или коллапсе репликативной вилки. Существует и целый ряд других путей возникновения двуцепочечных разрывов ДНК, в частности при воздействии ионизирующего излучения.

репликации, которое выражается в остановке или коллапсе репликативной вилки. Существует и целый ряд других путей возникновения двуцепочечных разрывов ДНК, в частности при воздействии ионизирующего излучения.

Существуют два принципиально разных механизма репарации двуцепочечных разрывов. Пока два дочерних дуплекса сближены, есть возможность репарации двуцепочечного разрыва ДНК одной хроматиды с использованием ДНК сестринской хроматиды в качехроматиды с использованием ДНК сестринской хроматиды в качестве образца. Это происходит при репарации посредством гомологичной рекомбинации. Но такая возможность существует далеко не всегда, и в первую очередь она отсутствует до репликации, т. е. в течение всей G_1 -фазы клеточного цикла и в начале S-фазы. Негомологичное соединение концов (NHEJ — non-homologous end joining) позволяет быстро ликвидировать разрывы, тем самым проведя клетку через контрольную точку, а также избежав цепной реакции хромосомных перестроек. В то же время NHEJ часто приводит к случайной перетасовке фрагментов генома и может тем самым вызвать злокачественное перерождение либо (что более вероятно) гибель клетки. Тем не менее если невозможно провести рекомбинационную репарацию, то негомологичное соединение концов является единственной возможностью ное соединение концов является единственной возможностью ликвидировать возникшую проблему. Следует отметить также, что организация ДНК в хроматин приводит к существенному ограничению свободы перемещения разорванных концов ДНК, в силу чего вероятность корректного восстановления разорванной цепи ДНК путем негомологичного соединения концов достаточно высока, особенно при наличии небольшого числа разрывов. Кроме того, для многоклеточного организма опасность случайного соединения фрагментов генома в некотором смысле менее остра, так как получившиеся мутантные клетки (если разрыв произошел в соматической клетке) не будут унаследованы в ряду поколений.

Для репарации посредством гомологичной рекомбинации необходимо наличие донора гомологии. Понятно, что уже сами размеры геномов высших эукариот — от десятков миллионов до десятков миллиардов пар нуклеотидов — делают практически невозможным нахождение и использование в качестве донора гомологии ДНК гомологичной хромосомы. Репарация с помо-

щью гомологичной рекомбинации возможна, только если райондонор изначально находится рядом. Это требование выполняется после репликации ДНК, когда каждая хромосома состоит из двух связанных когезиновыми сшивками сестринских хроматид. До осуществления репликации ДНК гомологичная рекомбинация может быть эффективна только у тех организмов, у которых гомологичные хромосомы расположены рядом. Подобная ситуация наблюдается у дрожжей или дрозофилы, для которых описано выраженное соматическое спаривание гомологичных хромосом. Для позвоночных животных такого явления не наблюдается, и у них основным путем репарации двуцепочечных разрывов является негомологичное соелинение концов. ляется негомологичное соединение концов.

и у них основным путем репарации двуцепочечных разрывов является негомологичное соединение концов.

При возникновении двуцепочечного разрыва происходит быстрое — в течение нескольких минут — фосфорилирование С-конца гистона Н2А.Х. Так как у млекопитающих фосфорилируется остаток серина-139, отстоящий от С-конца на три позиции, то такую форму называют үН2А.Х. У дрожжей, не имеющих этого минорного варианта, фосфорилируется основной Н2А. Фосфорилирование Н2А.Х осуществляют ферменты, принадлежащие к хорошо изученному семейству фосфатидилинозитол-3 киназоподобных киназ. Гистон Н2А.Х содержит на С-конце консервативную последовательность SQE, являющуюся сайтом узнавания этих киназ. У млекопитающих известно три белка этого семейства, принимающих участие в репарации: АТМ (белок, нарушения которого приводят к тяжелому наследственному заболеванию — атахіа telangiectasia mutated), АТК («похожий на АТ» — АТ-related) и ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK — DNA-dependent protein kinase). У дрожжей гомологом АТМ является Tell, а гомологом АТК — Мес1. Фосфорилирование Н2А.Х осуществляют АТМ и АТК. Функции этих двух киназ сходны, но не идентичны. Так, АТМ (и ее дрожжевой аналог Mec1) — основная киназа, обнаруживающая двуцепочечные разрывы в интерфазе, тогда как АТК отвечает за фосфорилирование H2A.X в районах блокированных репликативных вилок. Следует, однако, понимать, что такое «разделение труда» наблюдается в норме, но вовсе не является строго фиксированным. До некоторого предела АТМ и АТК могут взаимозамещать друг друга, создавая существенный запас прочности.

В норме гистон Н2А.Х составляет примерно 10% всех гистонов Н2А хроматина. Вокруг каждого двуцепочечного разрыва быстро образуется протяженный домен хроматина, содержащего үН2А.Х. Протяженность этого домена составляет несколько т. п. н.

в дрожжевых клетках и несколько килобаз¹ в дрожжевых клетках и несколько мегабаз — в клетках млекопитающих.

Способ, которым АТМ обнаруживает повреждения ДНК, остается пока неясным. Любопытно, что обработка клеток ингибиторами гистондезацетилаз (например, трихостатином А) или другими агентами, вызывающими изменения структуры хроматина (хлорокинами), приводит к активации АТМ даже в отсутствие двуцепочечных разрывов. Возможно, в задачу системы обнаружения повреждений ДНК, одним из основных компонентов которой является АТМ, входит и контроль за пространственной структурой хроматина. С другой стороны, внесение двуцепочечного разрыва также может приводить к локальному нарушению пространственной структуры хроматина.

Фосфорилированные мишени киназ ATM и ATR — в первую очередь, γ H2A.X — узнаются другими белками с помощью BRCT-домена. Этот домен протяженностью 90 аминокислотных остатков впервые был обнаружен в составе белка BRCA1, на его С-конце (BRCA1 C-terminal domain). Он связывается с фосфосерином или фосфотреонином в определенном белковом контексте. Домен BRCT широко распространен среди белков, принимающих участие в репарации ДНК. Взаимодействие этих белков с γ H2A.X стабилизирует репарационные комплексы.

Несмотря на столь важную роль фосфорилирования H2A.X, этот процесс не является абсолютно необходимым для начальных этапов привлечения факторов репарации к месту двуцепочечного разрыва. Тем не менее появление в хроматине γH2A.X значительно повышает скорость и эффективность репарации. Это происходит благодаря более быстрому и активному привлечению белков-участников репарации. За счет взаимодействия γH2A.X и BRCT-содержащих белков образуются «фокусы репарации» — компактные стабильные структуры с большой концентрацией факторов репарации (рис. XIV на цветной вклейке).

Одним из важных участников репарации двуцепочечных разрывов является надмолекулярный комплекс NuA4. В состав этого комплекса в клетках человека входят гистонацетилаза Tip60 (у S. cerevisiae — Esa1), белок с двумя бромодоменами Brd8 (Bdf1), SWI/SNF-подобная ATФаза p400/Domino (Swr1), а также

¹ Килобаза, мегабаза — общепринятые, широко распространенные обозначения для тысячи и миллиона нуклеотидных пар соответственно. Образованы «озвучиванием» письменных английских сокращений kbp и Mbp — «base pair» (англ. «пара оснований», имеются в виду азотистые основания в составе нуклеотидов) с обозначением кратности, т. е. прямых аналогов русскоязычных «т. п. н.» и «млн п. н.».

RUVBL1 и RUVBL2 — гомологи бактериального белка RuvB — хеликазы, ответственной за миграцию цепи в структуре Холлидэя. Особенностью гистонацетилазы Tip60 и ее дрожжевого гомолога является предпочтительная активность на линейных массивах нуклеосом, а не на изогнутых. Дрожжевая гистонацетилаза Esa1 взаимодействует с фосфорилированным H2A, который у *S. cerevisiae* выполняет функции эукариотического γH2A.X.

Функционирование комплекса NuA4 подробно изучено на дрожжевой модели. Здесь надо отметить, что у *S. cerevisiae* в состав комплекса NuA4 не входит фактор ремоделирования Swr1. Сначала NuA4 связывается с окрестностью двущепочечного разрыва за

дрожжевой модели. Здесь надо отметить, что у *S. cerevisiae* в состав комплекса NuA4 не входит фактор ремоделирования Swr1. Сначала NuA4 связывается с окрестностью двуцепочечного разрыва за счет двух механизмов — взаимодействием с линейным массивом нуклеосом и взаимодействием с фосфорилированным H2A, причем взаимодействие с гистонами происходит еще и с участием другой субъединицы этого комплекса — актиноподобного белка Arp4 (actin related protein). Затем связывание усиливается с помощью взаимодействия бромодоменов Bdf1 с уже ацетилированными гистонами. Параллельно этому происходит ацетилирование гистона H4. Далее за счет субъединиц RUVBL1/2 происходит поиск гомологии и миграция цепи в ходе репарации. Кроме того, фосфорилированный H2A привлекает также ремоделирующие комплексы SWR1 и INO80, которые осуществляют замену H2A на H2A.Z, что дополнительно облегчает процесс репарации.

Как говорилось выше, основные пути репарации двуцепочечных разрывов — гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов. Механизм гомологичной рекомбинации будет рассмотрен в следующей главе. Существует и третий возможный путь — репарация путем отжига одиночной цепи (SSA — single strand annealing). Такой процесс происходит, если полноценной гомологичной последовательности не оказывается рядом. Тогда осуществляется поиск района ДНК с короткой гомологичной последовательностью. Эффективность такой репарации прямо связана с длиной гомологичной последовательности. Оптимум (у *S. cerevisiae*) достигается при длине гомологичного участка около 200 п. н. Отжиг одиночной цепи также включает в себя этап поиска гомологии, однако происходит без внедрения цепи и поэтому не требует участия Rad51 (см. разд. 5.1). Вообие по механизму не требует участия Rad51 (см. разд. 5.1). Вообие по механизму

200 п. н. Отжиг одиночнои цепи также включает в сеоя этап поис-ка гомологии, однако происходит без внедрения цепи и поэтому не требует участия Rad51 (см. разд. 5.1). Вообще по механизму и набору белков-участников этот путь представляет собой нечто среднее между репарацией путем гомологичной рекомбинации и вырезанием нуклеотидов. Начало процессу дает комплекс MRX, затем подключаются Rad52, Rad59 и Rad27. Требуются также белки группы Rad из другой группы комлементации, которые

участвуют в NER-пути, — последовательно с Rad1 по Rad10. В любом случае репарация путем отжига одиночной цепи неизбежно сопровождается делецией.

- Репарация двуцепочечных разрывов начинается с фосфорилирования гистона H2A.X (H2A) киназами ATM/ATR.
- С фосфолированным H2A.X (H2A) связываются белки с BRCT-доменом, образуя фокусы репарации.
- Фосфорилированный H2A.X (H2A) привлекает гистонацетилазу NuA4; ацетилирование хроматина делает его доступным для факторов репарации.
- При репарации путем отжига одиночной цепи происходит делеция.

4.6. НЕГОМОЛОГИЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ КОНЦОВ ДНК

Ограничения, накладываемые на подвижность хроматиновых фибрилл в эуариотическом ядре, позволяют концам разрыва в течение некоторого времени оставаться сближенными. Пока это условие выполняется, возможно прямое соединение концов разрыва. При этом не происходит никакой проверки гомологичности соединяемых участков. Если двуцепочечных разрывов в ядре немного, то вероятность неверного соединения мала.

Негомологичное соединение концов начинается с присоединения к концам разрыва гетеродимерных белков Ku70/Ku80. Это защищает концы разрыва от деградации. Кроме того, Ku70/Ku80 привлекают на разрыв MRX. Этот комплекс, во-первых, физически соединяет концы разрыва, а во-вторых, за счет своей нуклеазной активности создает однотипные выступающие концы с обеих сторон разрыва, что позволяет им отжечься друг на друга. Также MRX и Ku70/Ku80, как и при репарации путем гомологичной рекомбинации, привлекают ремоделирующий комплекс RSC, облегчающий дальнейший процесс.

Кроме того, гетеродимер Ku70/Ku80 привлекает каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK). Этот белок обеспечивает выравнивание двух концов разрыва и подготавливает их лигирование. Далее к концам разрыва привлекается комплекс ДНК— лигазы IV, которая восстанавливает целостность двойной спирали.

Эффективное негомологичное соединение концов требует дезацетилирования гистона Н4 по остатку лизина в положении 16, которое осуществляет гистондезацетилаза Sin3 (см. также разд. 2.4). Вероятно, дезацетилирование облегчает соединение концов разрыва. Тем не менее любая репарация двуцепочечного разрыва начинается с функционирования гистонацетилазы NuA4. Ацетилирование делает хроматин и ДНК в нем более доступными для факторов репарации. И только затем, неясным пока образом, привлекается Sin3 и происходит дезацетилирование. Более того, дезацетилирование сопровождается фофорилированием гистона Н4 по серину-1, что препятствует работе NuA4 и тем самым предотвращает повторное ацетилирование.

- Негомологичное соединение концов ДНК происходит с участием Ku70/Ku80, MRX и ДНК-лигазы IV.
- Обязательным для NHEJ является дезацетилирование гистона H4 по K16 после первоначального ацетилирования.
- Дезацетилирование Н4 сопровождается его фосфорилированием по \$1, предотвращающим повторное ацетилирование.

4.7. ПОСТРЕПЛИКАТИВНАЯ РЕПАРАЦИЯ

Остановка репликации ДНК по каким-либо причинам может иметь весьма плачевные последствия. Два наиболее вероятных сценария дальнейшего развития событий — разобщение либо собственно репликативной вилки и хеликазного комплекса МСМ, либо лидирующей и отстающей цепей. И в том, и в другом случае образуются протяженные участки оцДНК. Очевидно, что наличие длинных одноцепочечных участков, не участвующих в каком-либо процессе, весьма опасно для целостности генома. Эти участки одеваются белком RPA, а протяженные тракты RPA-нуклеофиламента рекрутируют киназу АТК (Мес1 в случае *S. cerevisiae*). Активированная АТК, в свою очередь, фосфорилирует белок Rad53, запуская тем самым контрольную точку репликации. При этом блокируется переход к следующим стадиям клеточного цикла, ингибируется активация поздних репликонов, активизируется репарация ДНК. Также запуск контрольной точки репликации приводит к стабилизации реплисом и блокированных репликативных вилок,

делая возможным восстановление нормальной репликации после исчезновения стрессовых условий.

Основной причиной блокирования репликации являются нерепарированные нарушения в цепях ДНК. Для репликативных ДНК-полимераз (см. разд. 3.1) такие нарушения, как правило, непреодолимы. Преодоление этих блоков происходит несколькими путями (рис. 43). Во-первых, возможно превращение блока в двуцепочечный разрыв, который затем репарируется путем гомологичной рекомбинации с сестринским дуплексом ДНК. При этом для синтеза цепи ДНК на матрице донора гомологии используются ДНК-полимеразы η и ζ , относящиеся к группе «черезблоковых» нуклеаз. Этот путь, как уже говорилось (см. разд. 4.5), преимущественно используется в поздней S-фазе и в G_2 -фазе, тогда как во время репликации — в ранней и средней S-фазах — рекомбинация подавлена, особенно на блокированных репликативных вилках. Подавление предотвращает нежелательную рекомбинацию, которая может вызываться продуктами блорепликативных вилках. Подавление предотвращает нежелательную рекомбинацию, которая может вызываться продуктами блокированных репликативных вилок (рис. 43). Детали механизма подавления рекомбинации пока не ясны, однако показано, что у дрожжей *S. cerevisiae* фактор процессивности ДНК-полимеразы α PCNA рекрутирует киназу Srs2. При блокировании репликации каким-то образом происходит фосфорилирование Srs2, благодаря чему киназа активируется и обеспечивает разборку Rad51-нуклеофиламента. Тем самым нарушается основная стадия гомологичной разолибимамия. рекомбинации.

рекомбинации.

Другие пути восстановления репликативных вилок включают продолжение синтеза ДНК «черезблоковыми» полимеразами, синтез новой РНК-затравки после блока в цепи ДНК с последующим заполнением бреши опять-таки «черезблоковыми» полимеразами или переключение матрицы — использование в качестве матрицы второй из новосинтезированных цепей ДНК. Эти три механизма обычно объединяют названием пострепликативной репарации. Если у бактерий основным является синтез на матрице второй новосинтезированной цепи, то у эукариот ситуация обратная, и основным среди процессов пострепликативной репарации является репликация «черезблоковыми» полимеразами.

Основными регуляторами пострепликативной репарации у *S. cerevisiae* являются белки Rad6 и Rad18. Эти белки являются убиквитин-конъюгирующими и убиквитин-лигирующими ферментами, и, как предполагается, их участие в процессе репарации заключается в убиквитинилировании различных белковучастников репарационных путей. Убиквитинилирование может

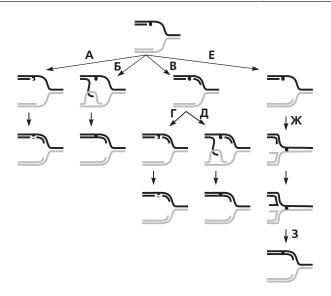


Рис. 43. Способы преодоления блоков репликации

Препятствия на пути репликативной вилки (вверху) могут преодолеваться разными способами. Самый простой из них — прямое прохождение блока с помощью черезблоковых полимераз (А). Альтернативой является смена матрицы (Б), при которой синтез переключается с поврежденной родительской на новосинтезированную дочернюю цепь. После прохождения места повреждения полученный полукатенан раскрывается с помощью топоизомеразы I и восстанавливается нормальная репликативная вилка.

Кроме того, возможно продолжение синтеза с новой затравки, которая будет синтезирована после препятствия (В). Образующаяся в результате брешь может быть заполнена двумя вышеописанными способами — черезблоковым синтезом (Г) или сменой матрицы (Д). Наконец, еще одним способом миновать препятсвие является так называемое «обращение вилки» (Е). При этом синтез по второй, неповрежденной, цепи продолжается, а через некоторое время происходит обратное движение репликативной вилки. В результате новоситезированная цепь вытесняется из восстанавливающегося родительского дуплекса и становится матрицей для продолжения синтеза блокированной цепи (Ж). После синтеза короткого отрезка синтез останавливается и образовавшаяся 4-сторонняя структура «разворачивается» в нормальную репликативную вилку, при этом препятствие на родительской цепи оказывается позади (3).

как активировать белки, так и направлять их на протеасомную деградацию. Белки Rad6 и Rad18 необходимы для любого варианта пострепликативной репарации — как вносящей ошибки, так и безошибочной. Для безошибочной пострепликативной репа-

ращии, помимо Rad6 и Rad18, необходимы также Rad5, Mms2 и PCNA. Rad5 обеспечивает взаимодействие между комплексами Rad6-Rad18 и Ubc13-Mms2 Mms2 также представляет собой убиквитин-конъюгирующий фермент, который в комплексе с Ubc13 способен присоединять к белкам полиубиквитиновые цепи, связанные через лизин-63 убиквитина. Такая модификация специфична для белков, задействованных в репарации ДНК и в отличие от классического полиубиквитинилирования через лизин-48, не приводит к деградации.

Прямой синтез ДНК через различные повреждения осуществляют уже упомянутые «черезблоковые» полимеразы. Помимо отмеченных ДНК-полимераз η и ζ, к этой группе ферментов относятся также ДНК-полимеразы ι, к и Rev1. Каждая из них способна «проходить» определенные типы повреждений на родительской цепи ДНК. Полимераза η может вести репликацию через циклобутановые димеры тимина. В большинстве таких случаев, невзирая на искажения пространственной структуры ДНК, полимераза η вставляет в новосинтезированную цепь аденины, не внося, таким образом, мутаций. При этом полимераза η практически не способна вести синтез через пиримидин-6-4-пиримидиноновые производные (рис. 42). Полимераза к необходима для преодоления гуанина, модифицированного (например, бензпиреном) по атому №2. Кроме того, она принимает участие в репарации путем вырезания нуклеотидов (см. разд. 4.2), хотя детально ее роль в этом процессе не установлена. Полимераза Rev1, строго говоря, полимеразой не является. Она осуществляет встраивание цитозина напротив участков родительской цепи ДНК с отщеплеными азотистыми основаниями. Также Rev1 необходима для прохождения репликации через пиримидин-6-4-пиримидиноны. Полимераза ζ стоит особняком в группе «черезблоковых» полимераза б и є. Более того, полимераза ζ практически не способна синтезировать ДНК через повреждения родительской цепи. У полимераза у отсутствует корректирующая 3'→5'-экзонуклеазная активность, и основная ее функция — элонтация цепи после действия других «черезблоковых» ДНК-полимераз и замены их «черезблоковых» ДНК-полимера

к разобщению хеликазной и полимеразной частей реплисомы — хеликазы продолжают работать, а полимеразы не способны продолжать синтез ДНК. В результате образуются протяженные участки оцДНК. Связываясь с ними, активируется Rad18, и в комплексе с Rad6 осуществляет моноубиквитинилование PCNA по лизину-163. Эта модификация вызывает переключение полимераз и запуск «черезблокового» синтеза, способного вносить ошибки. Моноубиквитинилированный PCNA затем полиубиквитинилируется комплексом Mms2-Ubc13, запуская другой, пока не охарактеризованный путь безошибочного синтеза через поврежденные основания. По-видимому, таким путем является переключение матрицы (рис. 43) — вариант рекомбинационной репарации, не зависящий от Rad52.

У высших эукариот ситуация несколько отличается. Преимущественной формой модификации PCNA является моноубиквитинилирование, в то время как количество полиубиквитинилированной формы существенно меньше — в 10–20 раз. Некоторые виды, например курица, имеют дополнительную убиквитинлигазу, помимо Rad18. В ряде случаев кроме убиквитинилирования наблюдаются другие, хотя и схожие, модификации PCNA. Так, у шпорцевой лягушки *X. laevis* PCNA может быть сумоилирован. Тем не менее основной принцип реакции на столкновение реплисомы с поврежденной ДНК у всех эукариотических организмов один и тот же — модификация PCNA с последующим переключением на «аварийные» способы репликации.

- При репликации нарушения структуры ДНК могут преодолеваться с помощью «черезблоковых» ДНК-полимераз, способных «прорываться» через препятствия ценой процессивности и точности синтеза.
- Каждая «черезблоковая» ДНК-полимераза лучше всего справляется с каким-то конкретным видом повреждения ДНК.
- Регуляция пострепликативной репарации осуществляется путем убиквитинилирования PCNA.

4.8. РЕПАРАЦИЯ ХРОМАТИНА

После репарации ДНК необходимо восстановить исходную структуру хроматина. Этот процесс обеспечивают CAF-1 и ASF1 (см. разд. 3.8). В обоих путях репарации двуцепочечных разрывов

строго необходим CAF-1, в то время как ASF1 выполняет вспомогательные функции и его отсутствие существенно не сказывается на репарации хроматина.

Помимо восстановления нуклеосом, необходимо также восстановить эпигенетический статус хроматина. И первое, что надо для этого сделать, — ликвидировать фосфорилирование Н2А (Н2А.Х у позвоночных). Один из способов — обменять фосфорилированный Н2А (үН2А.Х) на нормальный Н2А. Обмен гистонов в составе нуклеосомы — стандартная задача функционирования хроматина, и в данном случае она решается стандартными же способами (см. разд. 1.6, 3.8). Как уже упоминалось, у *S. cerevisiae* к фокусам фосфорилированного Н2А привлекается SWR1, который обменивает фосфоН2А на H2A.Z. Кроме того, специфические для повреждения модификации гистонов могут быть сняты с молекул гистонов. У дрожжей *S. cerevisiae* обнаружен комплекс HTP-C (H2A histone phosphatase complex), в состав которого входит собственно фосфатаза Pph3. Этот комплекс специфически дефосфорилирует гистон H2A после его вытеснения из хроматина. Аналогичный комплекс — PP2A — обнаружен и у позвоночных, хотя пока не ясно, действует он на вытесненный из хроматина H2A.Х или же может дефосфорилировать его непосредственно в составе нуклеосом.

- После репарации ДНК необходимо осуществить репарацию хроматина с помощью CAF-1 и ASF1.
- Дефосфорилирование γH2A.X осуществляется после его обмена на другие изоформы H2A и, возможно, в составе нуклеосом.

ХРОМАТИН И РЕКОМБИНАЦИЯ

5.1. ГОМОЛОГИЧНАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Как правило, говоря о рекомбинации, подразумевают запрограммированный обмен фрагментами генетического материала, имеющий адаптивное значение для организма. Однако один и тот же механизм гомологичной рекомбинации обеспечивает, помимо репарации, мейотический кроссинговер, переключение типа спаривания дрожжей, фаговую трансдукцию, распространение самонаводящихся эндонуклеаз (homing endonucleases, также иногда называемые эндонуклеазами генной конверсии) и другие процессы.

Можно заметить, что перечисленные процессы (кроме репарации) имеют одну важную общую черту — все они являются источником генетического разнообразия. Как правило, привносимое с помощью гомологичной рекомбинации разнообразие дает адаптивное преимущество организму или популяции. При этом механизм «адаптивной» рекомбинации мало чем отличается от гомологичной рекомбинации как способа репарации двуцепочечных разрывов. В большинстве случаев отличия сводятся преимущественно к механизму возникновения двуцепочечных разрывов. Если при репарационной рекомбинации происходит обработка разрыва, возникшего случайным (как правило, абиогенным либо вследствие ошибки) путем в случайном месте генома, то при «адаптивной» рекомбинации разрывы вносятся в ДНК специальными клеточными системами, действующими на определенные участки генома. Другое важное отличие заключается в том, что при репарации двуцепочечных разрывов донором гомологии является сестринская хроматида, тогда как при «адаптивной» рекомбинации донором

в принципе может быть гомологичная хромосома или даже эктопический (не аллельный) участок ДНК.

Как мы уже упоминали, гомологичная рекомбинация является основным способом репарации двуцепочечных разрывов в клетках дрожжей. Она поддерживает сохранность и целостность генетической информации. Первым шагом является связывание с разрывом ДНК (маркированным фосфорилированным гистоном H2A у дрожжей или γ H2A.X у многоклеточных животных) ремоделирующего комплекса INO80. Он обеспечивает доступ к прилегающей к разрыву ДНК следующего участника процесса — комплекса Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX), который обладает $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активностью. У позвоночных функциональным аналогом является MRN-комплекс, содержащий вместо Xrs2 белок Nbs1, связывающийся с γ H2A.X посредством BRCT-домена.

Белок Rad50 представляет собой ATФазу ABC типа, на N- и C-концах которой расположены мотивы Walker A и Walker B. Концы полипептидной цепи сближены, формируя активный ATФазный центр. Связывание ATФ приводит к димеризации Rad50 через их каталитические домены, что, в свою очередь, необходимо для связывания с ДНК. Такие димеры способны эффективно связывать Mre11 и Nbs1.

МRX образует 3'-выступающий конец, с которым связывается RPA. При действии MRX с ним связывается комплекс ремоделирования хроматина RSC, который облегчает продвижение MRX по ДНК. Кроме того, RSC способствует погрузке когезина на сестринские хроматиды. Как и при установлении когезии сестринских хроматид, посадка когезина в окрестности двуцепочечного разрыва требует работы комплекса белков-погрузчиков Scc2-Scc4. Однако в районах двуцепочечных разрывов когезин способен устанавливать когезию сестринских хроматид и в G_2 -фазе, а не только во время репликации ДНК. Более того, по последним данным, появление даже небольшого количества двуцепочечных разрывов приводит к включению в когезино когезинов на других хромосомах. Также для погрузки когезина в окрестностях двуцепочечных разрывов требуются другие белки, родственные когезину и конденсину — комплекс SMC5-SMC6.

Помимо RSC, комплекс MRX рекрутирует киназу ATM и способствует ее автофосфорилированию. Таким образом, MRX запускает положительную обратную связь, усиливая клеточный ответ на двуцепочечный разрыв. Установкой когезии сестринских хроматид обеспечивается пространственная близость района-донора гомологии. Затем с одетым RPA 3'-выступающим концом связываются белки Rad52, Rad54 и Rad55-Rad57, обеспечивающие замену RPA на Rad51 — гомолог белка RecA *E. coli*. Гетеродимер Rad55-Rad57 способствует инициации обмена цепей, который осуществляет Rad51. С гомологичным районом при этом связывается SWI/SNF, который позволяет филаменту ДНК-Rad51 взаимодействовать с очищенным от нуклеосом участком ДНК. После обмена цепей на вытесненной из гомологичного дуплекса цепи синтезируется комплементарная цепь, после чего эта структура разрешается, т. е. происходит обратный обмен цепей, и лигируется, ликвидируя тем самым разрыв в исходном дуплексе.

- Процесс гомологичной рекомбинации начинается комплексом Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX).
- Данный процесс требует обязательного участия комплексов ремоделирования хроматина INO80, RSC, SWI/SNF.
- В гомологичной рекомбинации принимают участие когезин и родственный комплекс SMC5-SMC6.

5.2. ОСОБЕННОСТИ РЕКОМБИНАЦИИ В МЕЙОЗЕ

Основной задачей мейоза является обеспечение нормального расхождения гомологов по гаплоидным половым клеткам, а также привнесение генетического разнообразия путем перетасовки родительских генотипов гомологичной рекомбинацией. Нормальное расхождение гомологов обеспечивается спариванием гомологичных хромосом и образованием хиазм. Спаривание гомологов, в свою очередь, инициируется гомологичной рекомбинацией, начинающейся с внесения двуцепочечных разрывов белком Spo11 (sporulation). Этот белок был впервые обнаружен у дрожжей, и мутации в кодирующем его гене приводят к дефектам споруляции. Любопытно, что белки Spo11 гомологичны топоизомеразам типа IIB, которые встречаются только у архей, однако Spo11 не способны лигировать разрыв. Разрывы, вносимые Spo11, распределены по геному не случайным образом, а собраны в «горячие точки» протяженностью 70–250 п. н. Никаких специальных мотивов нуклеотидной последовательности в «горячих точках»

мейотической рекомбинации не наблюдается. Любопытно, что положения этих «горячих точек» не консервативны и различаются даже у близкородственных видов.

«Горячие точки» делятся на три класса — α, β и γ — в зависимости от механизма своей активности. Точки класса α представляют собой транскрипционно-активные районы, преимущественно окрестности промоторов, класса β — характеризуются наличием последовательностей, препятствующих посадке нуклеосом, а «горячие точки» класса γ расположены в GC-богатых районах, где велика вероятность «застревания» репликативных вилок. Транскрипционная активность и репарация «застрявших» вилок сопровождаются модификациями гистонов (см. разд. 2.2 и 4.8), приводящими к образованию открытого хроматина. Тот же эффект оказывают и последовательности, препятствующие посадке нуклеосом.

Также стоит отметить, что некоторые «горячие точки» мейотической рекомбинации совпадают с S/MAR-элементами. Общее количество «горячих точек» и S/MAR в геноме также приблизительно совпадает. Более того, одной из черт S/MAR-элементов является их повышенная легкоплавкость. Все эти свойства позволяют предположить, что, как и в случае с другими генетическими процессами, мейотическая рекомбинация также происходит на ядерном матриксе. Строгих подтверждений этой гипотезы, однако, нет.

После внесения разрыва образуется нуклеофиламент из одной цепи ДНК и белка Dmc1 в отличие от соматической рекомбинации, когда нуклеофиламент образуется с участием белка Rad51 (см. разл. 5.1). Рекомбинация в мейотической рекомбинации, когда нуклеофиламент образуется с участием белка Rad51 (см. разл. 5.1). Рекомбинация в мейотической рекомбинации, когда нуклеофиламент образуется с участием белка Rad51

цепи ДНК и белка Dmc1 в отличие от соматической рекомбинации, когда нуклеофиламент образуется с участием белка Rad51 (см. разд. 5.1). Рекомбинация в мейотических клетках индуцирует образование синаптонемального комплекса (СНК) — белковой системы, непосредственно осуществляющей спаривание гомологичных хромосом. Важно отметить, что такая последовательность событий не универсальна: если у *S. cerevisiae*, растений и позвоночных все происходит именно так, то у многих беспозвоночных, включая *D. melanogatser* и *Caenorhabditis elegans*, спаривание с рекомбинацией непосредственно не связано.

комбинацией непосредственно не связано.

Возможны различные варианты обеспечения спаривания, не связанного с рекомбинацией. Так, у *C. elegans* и ряда других организмов обнаружены так называемые центры спаривания (pairing centres, PC) — локусы, с которыми взаимодействует белок Him8. Комплекс PC-Him8 связывается с ядерной оболочкой, и с этого места спаривание распространяется по хромосоме. У дрожжей *S. pombe* хромосомы образуют «букет» — конфигурацию, при которой теломеры гомологичных хромосом соединены друг с другом и с ядерной оболочкой. Эту связь осуществляет белок Ndj1. Дрож-

жи *S. cerevisiae*, помимо синаптонемального комплекса, характеризуются также конъюгацией центромер в начале мейоза. Она обеспечивается белком Zip1, который, помимо этого, является также компонентом СНК. Однако центромерное «спаривание» наблюдается еще до рекомбинации, индуцированной Spo11. Более того, центромерное спаривание возможно и между негомологичными хромосомами. Далее происходит перераспределение партнеров в пользу гомологов, причем этот процесс уже Spo11-зависим. Для внесения мейотических двуцепочечных разрывов, помимо Spo11, необходим еще ряд белков. К ним относятся, в частности, компоненты уже рассматривавшегося комплекса MRX (см. разд. 4.6). Белки Mre11 и Xrs2 взаимодействуют с Mer2 и Rec104, которые, в свою очередь, взаимодействуют с Rec102. При этом необходима ДНК-связывающая активность Mre11, в то время как Xrs2 играет, скорее всего, структурную роль, являясь частью основы надмолекулярного комплекса. Роль белка Rad50, который также необходим для внесения мейотических разрывов, пока еще не ясна. Показано, что в мейозе необходима «верхушка» суперспирального домена Rad50. Этот участок может обеспечивать димеризацию Rad50. Возможно, димеризация вносящих разрывы комплексов через Rad50 обеспечивает необходимую конфигурацию сестринских хроматид или гомологичных хромосом.

Кроме того, начало мейотической рекомбинации возможно только в определенном хроматиновом контексте. Еще до активации Spo11 горячие точки становятся сверхчувствительными к ДНКазе, т. е. там формируется район с открытой конформацией хроматина. Нормальная активность Spo11 возможна только в хромосомных регионах с убиквитинилированным по лизину-123 гистоном H2B. Такую модификацию вносит комплекс белков Rad6-Bre1. Также важно ацетилирование гистонов Н3 и Н4 гистонацетилазой GCN5. Существенно, что при вступлении в мейоз происходит замена большей части гистона Н2A на изоформу H2A.X.

Мейотические двуцепочечные разрывы вносятся по-разному у *S. cerevisiae* и высших уукариот. У последних комплекс MRN не требуется для внесения разрыва и присоед

плексу днк-Spott.
В отличие от спонтанно происходящих двуцепочечных разрывов мейотические разрывы своими 5'-концами ковалентно присоединены к Spott. Перед «репарацией» мейотических разрывов молекулы белка должны быть удалены с концов ДНК. Происходит это путем эндонуклеазного расщепления цепи ДНК в нескольких нуклеотидах от ДНК-белковой сшивки. Такое расщепление осу-

ществляет Mre11 при посредничестве Rad50 и другого белка — Sae2, функция которого пока неизвестна. Образовавшаяся при этом брешь затем расширяется экзонуклеазой EXO1, образуя длинные одноцепочечные участки с выступающим 3'-концом протяженностью примерно 600 нуклеотидов. Далее разрывы репарируются по пути, в общих чертах сходному с рекомбинационной репарацией в соматических клетках.

- Мейотическая рекомбинация начинается с внесения двуцепочечных разрывов белком Spo11.
- Индуцированные Spo11 разрывы распределены по геному не случайным образом.
- Индуцированные Spo11 разрывы происходят в районах с открытой конформацией хроматина и убиквитинилированным по лизину-123 гистоном H2B.
- При вступлении в мейоз происходит замена мажорного H2A на H2A.X.

5.3. СИНАПТОНЕМАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС

Как уже говорилось выше, рекомбинация является первым шагом спаривания гомологичных хромосом. Весь цикл сборки, функционирования и разборки СНК укладывается в профазу І мейоза. Более того, именно стадии «жизненного цикла» СНК являются определяющими для разделения профазы І на подфазы: лептотена характеризуется формированием осевых элементов между сестринскими хроматидами (осевые элементы синаптонемального комплекса не имеют никакого отношения к ядерному матриксу и хромосомному остову (chromosomal scaffold)); на стадии зиготены начинают формироваться поперечные филаменты, соединяющие осевые структуры двух гомологичных хромосом; полное формирование СНК знаменует переход к пахитене, а разборка СНК — от пахитены к диплотене. Именно на стадии диплотены хиазмы можно увидеть с помощью классической микроскопии, хотя образуются они существенно раньше.

Первые двуцепочечные разрывы вносятся в ДНК уже на ста-

Первые двуцепочечные разрывы вносятся в ДНК уже на стадии лептотены. Важно отметить, что далеко не все мейотические двуцепочечные разрывы приводят к кроссинговеру. Некоторые разрывы дают обмен генетической информацией между гомоло-

гичными хромосомами на очень небольшом протяжении. Заметная часть разрывов «репарируется» на матрице не гомологичной хромосомы, а сестринской хроматиды. Однако такие разрывы не представляют интереса при рассмотрении СНК, потому что никак не участвуют в установлении и поддержании спаривания гомологов. Также здесь стоит упомянуть о примечательной особенности мейотической рекомбинации. В каждой паре гомологичных хромейотической рекомбинации. В каждой паре гомологичных хромосом должна образоваться как минимум одна хиазма. При этом у большинства организмов число хиазм на одной паре гомологов редко превышает две или три (рис. XV на цветной вклейке). Кроссинговер в каком-то районе существенно снижает вероятность второго кроссинговера в этом же районе. Такое явление называют положительной интерференцией кроссинговера. Пока что совершенно не ясно, каким образом регулируется количество и распределение событий кроссинговера.

Основными компонентами синаптонемального комплекса яв-

и распределение событий кроссинговера.
Основными компонентами синаптонемального комплекса являются белки группы ZMM (Zip-Msh-Mer — по основным белкам CHK S. cerevisiae), а также белки SCP2 и SCP3. Под сокращением ZMM объединяют белки Zip1/Zip2/Zip3/Zip4, Msh4/Msh5 и Mer3. Помимо дрожжей, гомологи этих белков обнаружены у животных и растений. Меr3 представляет собой хеликазу; Msh4 и Msh5 являются гомологами бактериального белка MutS (см. разд. 4.4) и функционируют в виде гетеродимера; белки Zip2, Zip3 и Zip4 участвуют в убиквитинилировании и сумоилировании других белков.

Хеликаза Меr3 и гетеродимер Msh4/5 необходимы для внедрения нуклеофиламента ДНК-Dmc1 в двойную спираль ДНК в районе-доноре гомологии. Меr3 вытесняет из исходного дуплекса одну цепь на протяжении примерно 600 пар нуклеотидов. С образовавшейся структурой взаимодействует Msh4/5. Эти гомологи MutS, в отличие от других предпочтительно связываются с одиночной (но не двойной) структурой Холлидэя, а не с мисматчами (рис. 44). С меньшей эффективностью Msh4/5 связываются с предшественником структуры Холлидея — комплексом из выступающего 3'-конца и дуплекса с «глазком». Таким образом, связывание Msh4/5, по-видимому, способствует образованию структуры Холлидэя и стабилизирует ее.

Параллельно с формированием хиазмы происходит сборка собственно синаптонемального комплекса. Белки Zip2/3/4 обычно колокализуются с Mer3 и Msh4/5 и, учитывая их роль в убиквитинилировании и сумоилировании, вероятно, осуществляют локальную модификацию белков хроматина. Как правило, для сборки CHK

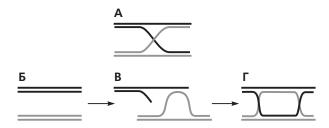


Рис. 44. Структура Холлидэя

Классическая структура Холлидэя (A) является продуктом обмена цепей между двумя двуцепочечными молекулами ДНК. Как правило, в ходе рекомбинации, репарации и других процессов с участием двух молекул ДНК или двух районов генома (Б) через промежуточные состояния (В) образуется двойная структура Холлидэя (Γ).

необходимо наличие двуцепочечных разрывов в ДНК. При этом процессинг двуцепочечных разрывов после их внесения Spo11, и внедрение цепи обычно, напротив, не критичны. По-видимому, сначала происходит погрузка Zip3, а затем — кооперативное связывание Zip1 и Zip2. Дальнейшие события пока остаются не изученными, но показано, что сумоилирование Zip1 направляет его в собирающийся СНК. Возможно, именно активное сумоилирование белками Zip2/3/4 — ключ к сборке СНК.

Белок Zip1 содержит выраженный суперспиральный домен и два глобулярных домена. — на N- и C-концах. Он является основным компонентом поперечных филаментов СНК (рис. 45). Гомологов Zip1 в строгом смысле слова не обнаружено ни у одного организма, помимо *S. cerevisiae*, однако выявлен целый ряд белков, сходных с Zip1 по структуре и локализации. Так, аналог Zip1 у млекопитающих называется SCP1 (synaptonemal complex protein). Такие белки обнаружены практически у всех модельных организмов — млекопитающих, покрытосемянных (Arabidopsis thaliana), беспозвоночных (С. elegans и D. melanogatser). Молекулы Zip1 образуют параллельные димеры, взаимодействуя своими суперспиральными доменами. Глобулярные С-концевые домены взаимодействуют с боковыми элементами СНК, а N-концевые — с N-концевыми частями суперспиральных доменов другого димера Zip1. Таким образом формируется центральный элемент СНК, состоящий из поперечно расположенных димеров Zip1, взаимодействующих друг с другом «голова к голове с перехлестом».

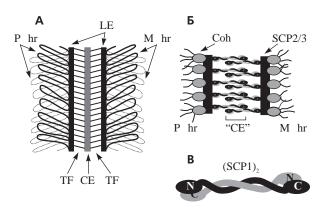


Рис. 45. Синаптонемальный комплекс

Полностью формированный СНК (А) объединяет обе гомологичные хромосомы — отцовскую (PChr, paternal chromosome) и материнскую (MChr, maternal chromosome). Хроматин обеих хроматид каждой хромосомы закреплен на боковых элементах СНК (LE, lateral elements), которые, в свою очередь, поперечными филаментами (TF, transversal filaments) соединены с центральным элементом (CE, central element). На молекулярном уровне (Б) латеральные элементы состоят из белков SCP2 и SCP3 (подробная структура неизвестна). Как предполагается, в состав боковых элементов входят также когезиновые комплексы, удерживающие вместе каждую пару хроматид. Поперечные филаменты состоят из белка SCP1, а центральный элемент не имеет собственных структурных компонентов и представляет собой область перехлеста поперечных филаментов. Каждый поперечный филамент (В) является антипараллельным гомодимером белка SCP1 с выраженным суперспиральным трактом и глобулярными N- и C-концевыми доменами. Перехлест образуется благодаря взаимодействию головок одного димера с суперспиральным трактом другого.

Формирование центрального элемента СНК начинается с районов, где произошли события кроссинговера. В этих местах начинается сборка поперечных филаментов Zip1, которая постепенно распространяется в обе стороны вдоль по хромосоме.

Осевые элементы, а позже — боковые, или латеральные, состоят из белков SCP2 и SCP3. Структура этих частей СНК практически не изучена.

Спаривание гомологов и формирование синаптонемального комплекса тесно связаны со структурой хроматина. Переход от зиготены к пахитене характеризуется полной потерей γH2A.X, однако что в данном случае является причиной, а что — следстви-

ем, пока не установлено. Также есть данные, что на сборку СНК оказывает влияние убиквитинилирование гистона Н2А.
Помимо синаптонемального комплекса, для нормального протекания мейоза (как и митоза) необходимо удержание сестринских хроматид когезином. При этом в мейотических клетках когезин хроматид когезином. При этом в мейотических клетках когезин отличается от такового в соматических: в этом комплексе субъединица Scc1 заменена на Rec8, а Scc3 — на Stag3. У позвоночных, кроме того, происходит замена митотического варианта SMC1 (SMC1α) на специфическую для мейоза изоформу SMC1β. Нередко наблюдаются также химерные когезиновые комплексы, одни компоненты которых представлены митотическими вариантами, а другие — мейотическими. До первого деления мейоза когезия поддерживается на всем протяжении хроматид. Благодаря тому что гомологичные хромосомы спарены с помощью хиазм, обеспечивается правильное взаиморасположение всех четырех хроматид. При переходе от метафазы I к анафазе I когезин высвобождается со всех участков хромосом, кроме центромер. Когезия центромер необходима для корректного расхождения сестринских хроматид во втором делении мейоза. во втором делении мейоза.

во втором делении мейоза.

В диплотене происходит разборка синаптонемального комплекса. Как и когезин, СНК дольше всего остается в центромерном районе хромосом. Разборка СНК, как и сборка, опосредована модификациями гистонов. У *D. melanogatser* для нормального протекания диплотены гистон Н2А должен быть фосфорилирован по треонину-119. Кроме того, наблюдается четкая временная корреляция между разборкой СНК и ацетилированием гистона Н3 по лизину-14 и Н4 — по лизину-5. Стоит отметить, что нарушение фосфорилирования Н2А по 119 положению также приводит к нарушению погрузки конденсина. Такое сочетание взаимосвязей на настоящий момент не позволяет следать четкого заключения на настоящий момент не позволяет сделать четкого заключения о причинно-следственных связях; тем не менее ясно, что модификация хроматина, разборка СНК и погрузка конденсина тесно связаны между собой.

Необходимо особо отметить, что описанная для *D. melanogatser* последовательность событий не универсальна для других организмов. У дрожжей *S. pombe* погрузка конденсина также необходима, но не для разборки, а уже для сборки СНК. Нематода *C. elegans*, напротив, характеризуется нормальным функционированием синаптонемального комплекса при поврежденном конденсине. Однако компактизация хромосом и фаза диакинеза у таких нематод нарушены. По-видимому, несмотря на все различия, конденсин

выполняет какую-то глубоко консервативную функцию в создании и поддержании архитектуры мейотических хромосом.

В пахитене и диплотене наблюдается характерное для митоза (см. разд. 3.9) фосфорилирование гистона НЗ по серину-10. Именно на этих стадиях профазы І происходит собственно конденсация хромосом, что является косвенным доказательством необходимости такой модификации хроматина для этого процесса. Фосфорилирование НЗ по положению 10 осуществляет Aurora В, компонент уже упоминавшегося комплекса СРС.

Описанные выше события — это нормальная ситуация. Но в мейозе, как и в пробом другом процессе, возможны ощибки

Описанные выше сооытия — это нормальная ситуация. Но в мейозе, как и в любом другом процессе, возможны ошибки. Одним из характерных нарушений мейоза является отсутствие спаривания гомологичных хромосом по какой-либо причине. Неспаренные хромосомы или неспаренные фрагменты хромосом подвергаются полной транскрипционной инактивации, что обеспечивается киназой ATR и белком BRCA1. Исходно во время обеспечивается киназой ATR и белком BRCA1. Исходно во время мейоза они локализуются на латеральных элементах синаптонемального комплекса. Если спаривание не устанавливается, т. е. не образуется центральный элемент CHK, то эти белки перемещаются в тела петельных доменов хроматина, где ATR фосфорилирует H2A.X. Вскоре после этого происходит еще целый ряд модификаций гистонов, в том числе убиквитинилирование H2A, деацетилирование H3 и H4, диметилирование лизина в девятом положении H3. Эти модификации обеспечивают поддержание инактивации неспаренных участков хромосом и сохраняются в течение практически всего мейоза и последующего спермио- или оогенеза, тогда как γH2A.X дефосфорилируется относительно скоро после установления инактивации. Кроме того, поддержание мейотической инактивации обеспечивается включением в нуклеосомы специальных вариантов обеспечивается включением в нуклеосомы специальных вариантов гистонов тастоН2А и Н2А. Z.

гистонов macroH2A и H2A.Z.

Частным случаем такой инактивации является мейотическая инактивация половых хромосом у самцов (или у самок в случае X0 или ZW систем определения пола). Половые хромосомы могут спариваться только на части своей длины (так называемый псевдоаутосомный регион, или PAR — pseudoautosomal region), поэтому и в норме большая их часть остается неспаренной, а значит, подвергается инактивации.

Биологический смысл мейотической инактивации неспаренных хромосом пока непонятен. Наиболее привлекательным кажется следующее объяснение. Необходимым условием для спаривания гомологов является образование существенного числа двуцепочечных разрывов, причем как минимум часть этих разрывов репари-

руется на матрице гомологичной хромосомы. Если спаривания не произошло, то и матрицы для репарации нет. Разрывы останутся нерепарированными, что представляет особенно серьезную угрозу, так как это разрывы в половых клетках, и они могут передаться зиготе, что снижает фертильность. Такая гипотеза удовлетворительно объясняет и то, почему мейотическая инактивация инициируется компонентами системы репарации двуцепочечных разрывов — BRCA1 и ATR. Тем не менее следует учитывать, что пока это только гипотеза, и прямых ее доказательств нет.

- Для нормального протекания мейоза необходимо спаривание гомологичных хромосом, которое обеспечивается гомологичной рекомбинацией и формированием синаптонемального комплекса.
- Сборка синаптонемального комплекса начинается в местах кроссинговера и оттуда распространяется по хромосоме. Этот процесс обеспечивается белками ZMM.
- Разборка синаптонемального комплекса связана с фосфорилированием H2A по T119, ацетилированием H3 по K14 и H4 по K5.
- Неспаренные хромосомы или их районы, в том числе половые хромосомы, подвергаются инактивации с участием ATR и BRCA1. Инактивация достигается фосфорилированием H2A.X и поддерживается убиквитинилированием H2A, деацетилированием H3 и H4, диметилированием H3 по K9 и включением в нуклеосомы macroH2A и H2A.Z.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕПЛИКАТИВНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ ЭУКАРИОТ

ДНК-полимеразы	α	γ	δ	ε		
Субъединицы (кДа):						
Каталитическая	165	140	125	261		
	68		66	59		
Ассоциированные	55	55	50	17		
	48		12	12		
Дрожжевой аналог	POL1	MIP1	POL3	POL2		
Локализация в клетке	ядро	мито- хондрии	ядро	ядро		
Дополнительная активность:						
3′→5′-экзонуклеаза	_	+	+	+		
Праймаза	+	_	_	_		
Процессивность:						
Собственная	средняя	высокая	низкая	высокая		
В комплексе с PCNA	_	_	высокая	высокая		
Точность	высокая	высокая	высокая	высокая		

ОДНОБУКВЕННЫЙ ШИФР НУКЛЕОТИДОВ ДНК

Классические однобуквенные обозначения нуклеотидов являются азами молекулярной биологии:

- A adenine
- C cytosine
- **G g**uanine
- T thymine

В дополнение к ним для записи вырожденных последовательностей нуклеотидов был придуман однобуквенный шифр, основанный на простых мнемонических правилах:

- **S** С или G (strong нуклеотидная пара $G \cdot C$ удерживается тремя водородными связями...)
- W A или T (weak ...а нуклеотидная пара $A \cdot T$ только двумя)
- R A или G (purine)
- Y С или Т (pyrimidine)
- M A или C (amino молекулы этих оснований содержат аминогруппу...)
- K G или T (keto ...a этих κ етоновую)
- ${\bf B} {\bf C}$, ${\bf G}$ или ${\bf T}$ (не ${\bf A} {\it буква}\ {\it B}\ {\it следует}\ {\it за}\ {\it A}$)
- **D** A, G или T (не C)
- **H** A, C или T (не G)
- V A, C или G (не T HOU уже занята урацилом)

Вместе с универсальным

N — nucleotide (другой вариант — any)

они образуют «азбуку» молекулярной биологии:

A

 $\mathbf{B} - \mathbf{C} / \mathbf{G} / \mathbf{T}$

 \mathbf{C}

 $\mathbf{D} - \mathbf{A} / \mathbf{G} / \mathbf{T}$

 \mathbf{G}

H - A/C/T

K - G/T

M - A/C

N - A/C/G/T

R - A/G

S - C/G

T

U

V - A/C/G

W - A / T

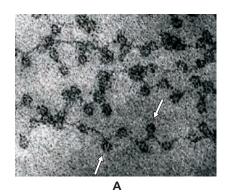
Y - C/T

СОДЕРЖАНИЕ

1. Струк	тура хроматина
1.1.	Гистоны
1.2.	Негистоновые белки9
1.3.	Нуклеосомы
	Нуклеосомная фибрилла 30-нм
1.5.	Расположение нуклеосом на молекуле ДНК
1.6.	Комплексы ремоделирования хроматина
1.7.	Высшие уровни упаковки ДНК
1.8.	Хромосомные территории
2. Хрома	тин и транскрипция
2.1.	Транскрипционно-активный хроматин
	Транскрипция ДНК, организованной в нуклеосомы 49
	Доменная организация эукариотического генома: активные
2.5.	домены
2.4.	Доменная организация эукариотического генома:
	неактивные домены
2.5.	Пограничные элементы доменов
	Геномные домены открытого типа (домены с размытыми
	границами)
2.7.	Динамика нуклеосом и нуклеосомных фибрилл 83
	Регуляция транскрипции у эукариот
2.9.	Пространственная организация транскрипционных
	комплексов в клеточном ядре96
3. Хрома	тин и репликация
_	Репликация ДНК
	Инициация репликации ДНК у эукариот
	Автономно реплицирующиеся элементы (ARS)
3.3.	дрожжей <i>S. cerevisiae</i>
	дромания от сеготыме

Оглавление 172

3.4	. Участки начала репликации ДНК высших эукариот	109
	. Инициация репликации ДНК у высших эукариот	
	. Репликоны и кластеры репликонов	
	. Ранние и поздние репликоны	
	. Репликация хроматина	
	. Конденсация и расхождение хромосом в митозе	
4. Хром	атин и репарация	136
	. Фоторепарация	
	Вырезание нуклеотидов	
	. Вырезание оснований	
	. Репарация неспаренных нуклеотидов	
	. Репарация двуцепочечных разрывов	
	. Негомологичное соединение концов ДНК	
	. Пострепликативная репарация	
	. Репарация хроматина	
5. Хром	атин и рекомбинация	156
5.1	. Гомологичная рекомбинация	156
	. Особенности рекомбинации в мейозе	
	Синаптонемальный комплекс	
Прилож	кение	168



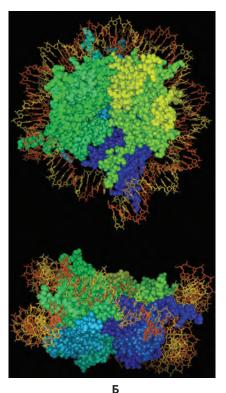


Рис. І. Нуклеосома

На рисунке приведены электронная микрофотография нескольких соседних нуклеосом (А; отдельные нуклеосомы указаны стрелками) и модель одной нуклеосомы с ДНК, но без гистона Н1 (Б). Разными цветами обозначены молекула ДНК и разные молекулы гистонов (подробнее структуру нуклеосомы см. на рис. II на цветной вклейке).

А: фотография любезно предоставлена д-ром Адой Олинс, Боудин Колледж (Брансвик, шт. Мэн)

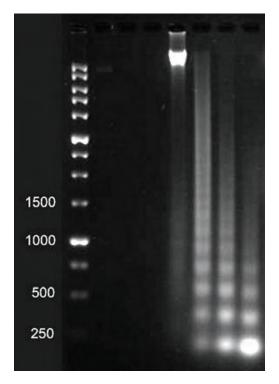


Рис. II. Нуклеосомная организация хроматина

Показан результат электрофореза препаратов хроматина, обработанных последовательно увеличивающимися слева направо концентрациями микрококковой нуклеазы. Слева — маркеры молекулярных весов (размеры маркеров указаны в парах нуклеотидов). Видно, что расщепление приводит к преимущественному образованию фрагментов длиной, кратной примерно 200 п. н., и что по мере усиления нуклеазного расщепления средняя длина фрагмента уменьшается.

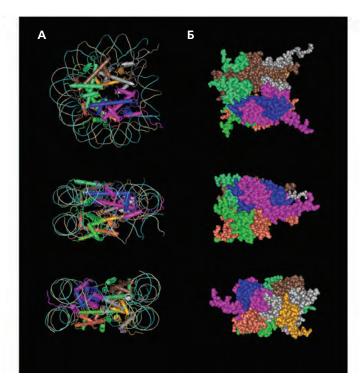


Рис. III. Модель октамера гистонов

На рисунке представлена молекулярная модель нуклеосомы (A) и октамера гистонов (Б) в трех разных ракурсах. Разные молекулы гистонов обозначены следующими цветами: H2A — красный и коричневый, H2B — изумрудный и зеленый, H3 — розовый и серый, H4 — синий и оранжевый. «Хвосты» молекул гистонов показаны не полностью.

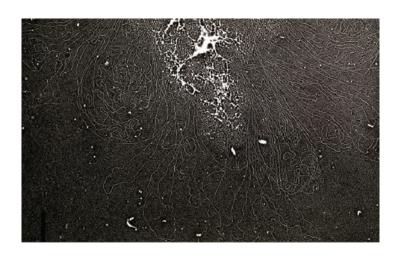


Рис. IV. Петельные домены Электронная микрофотография фрагмента интерфазного ядра после экстракции 2 M NaCl. Виден белковый «скелет» и окружающие его протяженные петли ДНК.

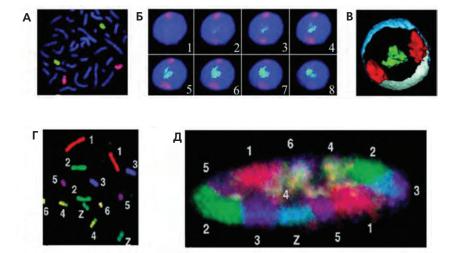


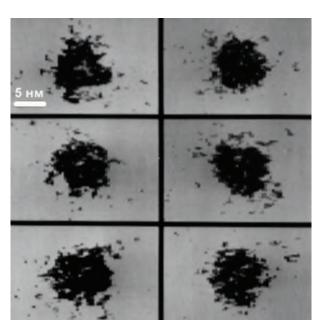
Рис. V. Хромосомные территории

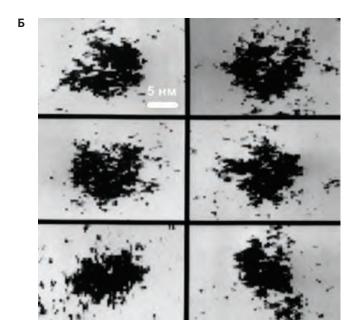
Хромосомы 18 и 19 человека окрашены специфическими пробами (условно представленными красным и зеленым цветами соответственно). Приведены микрофотографии метафазной пластинки (A) и серия оптических срезов интерфазного ядра (Б), полученных с помощью конфокального микроскопа. Каждый оптический срез соответствует строго определенному расстоянию до изображения. В обоих случаях тотальная ДНК окрашена DAPI. Компьютерная обработка серии оптических срезов позволяет получить трехмерную реконструкцию (В). Видно, что обе хромосомы 19 расположены вплотную друг к другу в центре ядра, тогда как хромосомы 18 — порознь и на периферии. Таким же образом можно окрасить разными «цветами» все хромосомы одновременно. Показан пример такого окрашивания хромосом курицы в метафазной пластинке (Г) и интерфазном ядре фибробласта (Д).

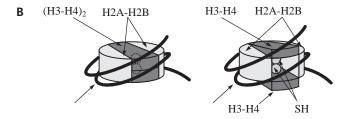
A-B: © из Tanabe H. et al. "Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates." PNAS (2002) 99:4424 с любезного разрешения авторов и National Academy of Sciences, U.S.A.

 Γ , Д: из Habermann F. A. et al. "Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells" Chromosome Research (2001) 9:569 с любезного разрешения авторов и Springer Science+Business Media.









2 3 6

Рис. VI. Нуклеосомы активного хроматина

Нуклеосомы, выделенные из активно делящихся культивируемых клеток, были нанесены на хроматографическую колонку, содержащую ртуть (II), — утвердившийся способ выделения транскрипционно-активного хроматина. Затем были получены электронные микрофотографиии несвязавшихся (A) и элюированных связавшихся с колонкой (Б) нуклеосом. Можно видеть, что несвязавшиеся нуклеосомы, представляющие транскрипционно неактивный хроматин, имеют правильную компактную форму, тогда как нуклеосомы транскрипционно-активного хроматина обладают ярко выраженной асимметрией, будучи частично развернуты. Благодаря развертыванию октамера гистонов происходит экспонирование SH-групп гистона H3 (а именно, цистеина-111), которые и обеспечивают связывание с ионами ртути (B).

По результатам экспериментов представлены обобщенные трехмерные модели транскрипционно-активных хромосом (Γ).

A, Б, Г: из Bazett-Jones D. P. et al. "Visualization and analysis of unfolded nucleosomes associated with transcribing chromatin" Nucleic Acids Research (1996) 24:321 с любезного разрешения авторов и Oxford University Press.

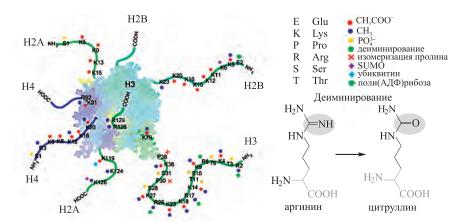


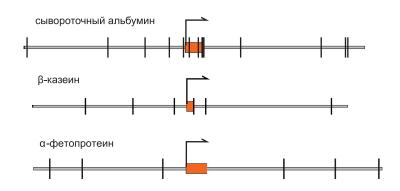
Рис. VII. Модификации гистонов

На рисунке отображено расположение различных посттрансляционных модификаций в «хвостах» гистонов нуклеосомного ядра. Расположение «хвостов» показано схематично и не отражает их действительных размеров и положения в пространстве, но соотношение размеров хвостовых доменов соблюдено. На врезке схематично изображена реакция деиминирования аргинина, наблюдаемая в N-концевом домене гистона Н3. Остаток лизина-79 в том же гистоне, хотя и расположен в глобулярной части белка, однако экспонирован на поверхности нуклеосомы и доступен для модифицирующих систем. Многие аминокислотные остатки могут подвергаться различным модификациям, но не одновременно (либо одна модификация, либо другая).

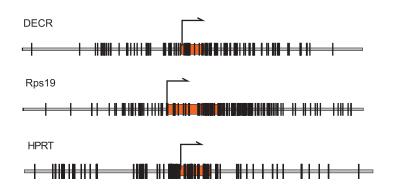
Рис. VIII. СрG-островки

•

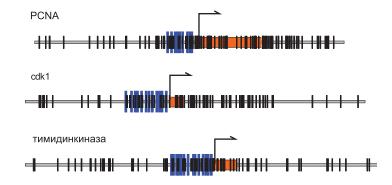
На рисунке показаны карты промоторов некоторых генов и их окрестностей. Промоторы обозначены стрелкой, показывающей направление транскрипции, оранжевым прямоугольником — первый экзон. Вертикальными штрихами отмечены динуклеотиды СрG. Промоторы тканеспецифичных генов часто расположены вне СрG-островков (А), в то время как промоторы генов «домашнего хозяйства» обычно расположены в СрG-островках (Б; DECR — митохондриальный фермент диеноил-КоА-редуктаза, Rps19 — рибосомальный белок S19, HPRT — гипокстантин : гуанин фосфорибозилтрансфераза). В секции (Б) хорошо видны характерные размеры СрG-островков и степень их обогащения динуклеотидами СрG. В промоторах, ассоциированных с СрG-островками, все сайты сязывания транскрипционных факторов локализованы в границах СрG-островков (В; cdk1 — циклин-зависимая киназа 1, PCNA — фактор процессивности ДНК-полимераз). Сайты связывания существенных для работы промотора транскрипционных факторов обозначены синими штрихами.

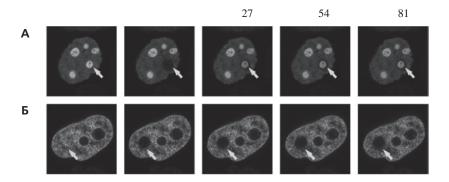


Б



В





Puc. IX. Анализ скорости восстановления флуоресценции после обесцвечивания (FRAP)

Живые клетки, в которых какой-то белок (в примере A — высокомобильный белок ядрышка, B — малоподвижный белок ядра) помечен флуоресцентной меткой, облучают лазерным лучом, область действия которого ограничена частью клетки. В данной области (которая может быть квадратной, круглой или прямоугольной в зависимости от конструкции и настроек микроскопа) лазерный луч «выжигает» флуорохром. Затем наблюдают за судьбой «выжженного» участка. В первом случае выжигают одно из нескольких ядрышек (A), но высокомобильный белок быстро мигрирует в облученную область, и «шрам» исчезает уже через считанные секунды. Во втором случае выжигают область в ядре (Б), которая из-за низкой мобильности ядерного белка хорошо различима и спустя несколько десятков секунд. При этом в данном конкретном случае выжженная область выглядит очень сходно с ядрышками, куда исследуемый ядерный белок не попадает. Место облучения в обоих случаях показано белой стрелкой.

Фотографии любезно предоставлены Е. В. Шевалем, МГУ имени М.В. Ломоносова

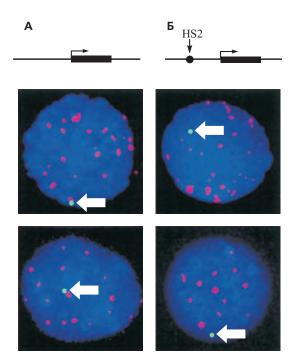


Рис. Х. Активность локуса и его внутриядерная локализация

На рисунке показаны результаты визуализации интегрированной в геном трансгенной конструкции в ядрах эритроидных клеток. Для гибридизации с трансгеном использовался зонд, меченный зеленым красителем; красным красителем помечен зонд, позволяющий визуализировать все центромеры (этот зонд гибридизуется с центромерами всех хромосом). Синяя флуоресценция — краситель DAPI, неспецифически окрашивающий тотальную ДНК. Позиции трансгенов отмечены белыми стрелками. Конструкция, в состав которой входит только ген β-глобина (A), локализуется преимущественно возле центромер. Так как центромеры содержат гетерохроматин, то и трансген оказывается гетерохроматинизирован и репрессирован. Включение же в конструкцию энхансера HS2 из области контроля локуса β-глобинового домена (Б) приводит к тому, что такой трансген локализуется преимущественно в эухроматических областях ядра. Никакой гетерохроматинизации не происходит и трансген активно экспрессируется.

Важно, что во всех рассмотренных клетках трансгенные конструкции интегрированы в одно и то же место генома. Таким образом, разница в локализации обусловлена только свойствами самой конструкции (т. е. присутствием либо отсутствием в ее составе мощного энхансера).

Из Francastel C. et al. "A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centrometric heterochromatin" Cell (1999) 99:259 с любезного разрешения авторов и Elsevier.



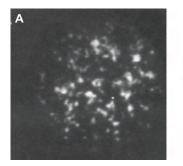
Рис. XI. Кластеры репликонов

Показаны результаты визуализации репликонов методами радиоавтографии (А) и иммунофлуоресцентного окрашивания (Б). В первом случае культуру клеток инкубируют сначала в среде с высокой концентрацией радиоактивно меченого нуклеотида (например, 3Н-тимидина), затем — в среде с низкой концентрацией. В результате ранореплицировавшиеся участки ДНК оказываются высокоактивными и дают толстые треки на автографе, а позднореплицировавшиеся — низкоактивными, давая утонченные треки. Хорошо видно пять не полностью реплицированных (видны перерывы в треках) рекликонов практически одинаковой протяженности. При использовании иммунофлуоресцентного окрашивания (Б) вместо радиоактивно-меченных нуклеотидов используются химические модификации — в данном случае «ранней» меткой послужил аналог цитозина 5-бромодезоксиуридин, а «поздней» — 5-иододезоксиуридин. Включенные в состав новосинтезированной ЛНК предшественники выявлены с помощью антител, конъюгированных с зеленым (для выявления 5-бромодезоксиуридина) либо красным (для выявления 5-иододезоксиуридина) флуорохромами. Видно три репликона, два из которых (справа) полностью реплицированы (цветные «треки» слились), а третий — еще не полностью.

Мерные линейки на обеих панелях соответствуют 10 мкм.

A: из Huberman J. A. et al. "On the Mechanism of DNA Replication in Mammalian Chromosomes" Journal of Molecular Biology (1968) 32:327 с любезного разрешения авторов и Elsevier.

Б: из Jackson D. A. et al. "Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells" Journal of Cell Biology (1998) 140: 1285-1295 с любезного разрешения авторов и Rockfeller University Press.



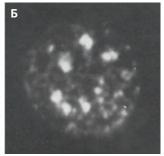
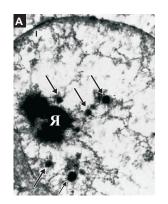


Рис. XII. Динамика репликативных компартментов по ходу S-фазы

Показаны результаты иммунофлуоресцентного окрашивания ядер фибробластов. Синхронизированные клетки инкубировали с бромодезоксиуридином 30 мин (А) и 120 мин (Б) с момента начала S-фазы. Хорошо видно, что по ходу S-фазы количество репликативных фокусов становится существенно меньше, а сами они значительно увеличиваются в размерах.

Из Nakayasu H. et al. "Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus" Journal of Cell Biology (1989) 108:11 с любезного разрешения авторов и Rockfeller University Press.



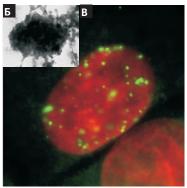


Рис. XIII. Репликативные фабрики

(А) Электронная микрофотография фрагмента клеточного ядра после обработки нуклеазами и экстракции 90% хроматина. Хорошо видны ламина (сверху), остаточное ядрышко (я) и сеть остатков хроматина. Вокруг ядрышка отчетливо различимы несколько репликативных фабрик (стрелки), в которых выявляется 5-бромодезоксиуридин (окрашивается антителами, конъюгированными с наночастицами золота, которые при таком увеличении не видны). Линейка — 500 нм. (Б) Одна из репликативных фабрик крупным планом. Видна неоднородная структура комплекса. Линейка — 100 нм. (В) Распределение репликативных фабрик в ядре. Иммунофлуоресцентное окрашивание 5-бромодезоксиуридина (зеленый) на фоне тотального окрашивания гистонов (красный).

А, Б: фотография любезно предоставлена проф. Peter R. Cook, Oxford. Впервые опубликована в Hozak P. et al. "Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle" J Cell Sci (1994) 107:2191 с любезного разрешения авторов и Сотрану of Biologists. В: фотография любезно предоставлена С. А. Голышевым, МГУ имени М. В. Ломоносова.

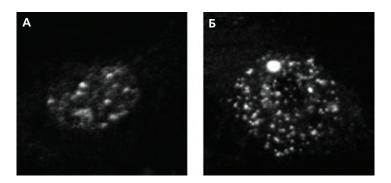


Рис. XIV. Фокусы γ H2A.X

Показаны результаты иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к гистону γ H2A. X ядер клеток, обработанных малым (A) и большим (Б) количеством вещества, индуцирующего двуцепочечные разрывы в ДНК. Отчетливо видны фокусы окрашивания, количество которых пропорционально количеству повреждений геномной ДНК.

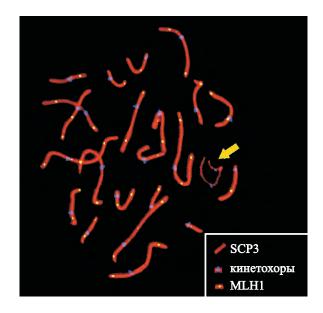


Рис. XV. Синаптонемальный комплекс в пахитене

Препарат человеческих сперматоцитов окрашен антителами к белку СНК SCP1 (красный), антителами к белку MLH1 (желтый) и аутоиммунной сывороткой CREST к эпитопу в кинетохоре (синий). Стрелкой указаны частично спаренные половые хромосомы (сверху — более короткая Y, внизу — длинная X). Landes Bioscience, иллюстрация любезно предоставлена проф. Рене Мартеном, Университет Калгари, Канада.

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программы Adobe Reader версии не ниже 11-й для платформ Windows, Mac OS, Android, iOS, Windows Phone и BlackBerry; экран 10"

Учебное электронное издание

Разин Сергей Владимирович **Быстрицкий** Андрей Александрович

ХРОМАТИН: УПАКОВАННЫЙ ГЕНОМ

Ведущий редактор канд. биол. наук *Т. Е. Толстихина* Художник *С. Инфантэ* Технический редактор *Е. В. Денюкова* Корректор *Е. Н. Клитина* Компьютерная верстка: *Т. В. Андреева*

Подписано к использованию 19.03.15. Формат $125 \times 200 \,\mathrm{mm}$

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний» 125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3 Телефон: (499) 157-5272 e-mail: info@pilotLZ.ru, http://www.pilotLZ.ru