



УДК 575.113.3

В. М. Запорожан, акад. АМН України, д-р мед. наук, проф.,
Ю. І. Бажора, д-р мед. наук, проф.,
М. М. Чеснокова,
Н. А. Левицька

ЕПІГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ РОБОТИ ГЕНІВ

Одеський державний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 575.113.3

В. Н. Запорожан, Ю. И. Бажора, М. М. Чеснокова, Н. А. Левицкая
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАБОТЫ ГЕНОВ

Одесский государственный медицинский университет, Одесса, Украина

В работе изложены определение эпигенетики как научного направления, а также эпигенетические механизмы регуляции работы генов, такие как гистоновые метки (метилование, ацетилование, убиквитирование), импринтинг генов, РНК-интерференция, хромосомный сайленсинг. Подчеркивается, что в реализации наследственной информации, которая запрограммирована в ДНК, важную роль играет пространственная организация хроматина и взаимодействие всех его компонентов.

Ключевые слова: эпигенетика, нуклеосомы, хроматин, геномный импринтинг.

UDC 575.113.3

V. M. Zaporozhan, Yu. I. Bazhora, M. M. Tchesnokova, N. A. Levitska
EPIGENETIC MECHANISMS OF GENE EXPRESSION REGULATION

The Odesa State Medical University, Odesa, Ukraine

The work expounds the definitions of epigenetics as a scientific direction, as well as epigenetic mechanisms of regulation of gene expression, such as histone marks (methylation, acetylation, ubiquitination), gene imprinting, RNA-interference, chromosomal silencing. The chromatin spatial organization and interaction of its components are pointed out to play an important role in realization of the hereditary information that is programmed in DNA.

Key words: epigenetics, nucleosomes, chromatin, genome imprinting.

За останнє десятиліття увагу дослідників у галузі генетики, біології розвитку та інших напрямків біології привертають результати епігенетичних досліджень. Цікавість до них підсилилася після розкодування геному багатьох організмів, оскільки стало очевидним те, що від знання складу геному до управління фенотипом дуже значна відстань.

Що таке епігенетика? За пропозицією англійського вченого К. Х. Уодінгтона (1947), епігенетикою необхідно вважати галузь біології, яка вивчає причинні взаємодії між генами та їх продуктами, які формують фенотип. У наш час поняття епігенетики значно поширилося та відображає молекулярні, онтогенетичні, фізіологічні, еволюційні аспекти регуляції генної активності. Слід відмітити, що на епігенетичні явища звернув увагу Т. Морган ще в 20-ті роки ХХ ст. Він першим поставив питання: яким чином клітини з однаковим вмістом генів спеціалізуються під час онтогенезу в різних напрямках, формуючи різні органи і тканини? Т. Морган припустив, що в різних частинах організму, який розвивається,

функціонують різні гени і тому формуються різні клітинні фенотипи. Відомий генетик і ембріолог Р. Гольдшмідт вважав, що в усіх регіонах ембріона функціонують однакові гени, а диференціюються їхні продукти, які підпадають там під селективний добір. Обидві гіпотези були висунуті на противагу думки А. Вейсмана про те, що у соматичних клітинах відбувається димінуція хроматину, яка приводить до гетерогенності клітин організму, що розвивається, а в клітинах зародкового шляху набір хромосом залишається незмінним. Подальші дослідження дозволили визначити, що в період ембріонального розвитку організму провідне значення має диференційна активність генів, тобто гени працюють за схемою Т. Моргана. У деяких випадках провідного значення набувають трансляційні та посттрансляційні трансформації білків (схема Р. Гольдшмідта). Не виключена також і схема А. Вейсмана, оскільки димінуція хромосом виникає не тільки в аскарид та інших безхребетних, але певною мірою у багатьох організмів.

Важливу роль в епігенетичних процесах відіграють ядерно-цитоплазматичні взаємовідношення, про які, на прикладі заплідненої яйцеклітини, говорив ще Т. Морган. Експериментально це блискуче довів Дж. Гердон у дослідах із пересадження ядра з клітин зародка різних стадій його розвитку в яйцеклітину, яка знаходиться на різних стадіях її дозрівання. Було доведено, що в усіх випадках ядро репрограмується у співвідношенні з функцією ядра клітини-реципієнта, тобто набуває властивостей, які диктуються цитоплазмою.

Тут належить зупинитися на принципово важливому питанні: існує запис спадкової інформації та її реалізація. Ці поняття потрібно чітко розмежовувати. Спадкова інформація записана в ДНК і ніякі інші біомолекули, структури ядра і цитоплазми не мають до цього відношення. Інша справа — реалізація цієї інформації, експресія генів. Ці процеси підлягають дії багатьох факторів при взаємодії ядра і цитоплазми клітини. Механізми їх впливу на гени і білки будуть розглянуті нижче.

У ядрах клітин еукаріот ДНК практично завжди пов'язана з великою кількістю білків, створюючи з ними комплекс — хроматин. Це не випадкові зв'язки, вони дозволяють упаковувати ДНК у суворому порядку та у певній ієрархічній послідовності. Першою її сходинкою є нуклеосоми, які являють собою білкові глобули. Навколо них ДНК робить $1\frac{3}{4}$ оберти [1]. Кожна глобула складається з білків гістонів п'яти типів: Н1, Н2А, Н2В, Н3 і Н4. Усі вони містять у великій кількості основні амінокислоти, лізин і аргінін. Молекули гістонів утворюють октамер клиноподібної форми, у широкому підґрунті якого знаходяться два димери Н2А–Н2В, а у вузькій частині — тетрамер 2 (Н3–Н4). С-кінцеві частини гістонів згорнуті, а N-кінцеві частини вільно розходяться у різні боки. Молекула гістону Н1 знаходиться на зовнішньому боці октамера. Її середня частина згорнута в глобулу, і С- і N-кінці вільно розходяться у різні боки. Гістон Н1 фіксує молекулу ДНК на нуклеосомі [2; 3].

Нині розкодована амінокислотна послідовність гістонів у багатьох організмів (від найпростіших до людини). Встановлено, що гени цих білків високо консервативні. Так, гістон Н4 у гороха та теляти відрізняється тільки двома амінокислотами. Гістони Н3 і Н4 більш консервативні, ніж Н2А і Н2В.

Виявлено, що в різних клітинах одного організму кожен тип гістонів, крім Н4, не однорідний і представлений цілим сімейством. У сімействі є основний тип і міnorні фракції — «гістонові варіанти». У крайньому разі, частина з них має відношення до певних процесів у клітині, наприклад, транскрипції або інактивації X-хромосоми [4].

Кожен процес у хроматині — послідовність ферментативних реакцій, які пов'язані з певною функцією: захист, передача або реалізація гене-

тичної інформації. Усі ці процеси поділяються на групи за принципом стабільності (гетерохроматиновий стан стабільно підтримується у низці поколінь клітин, що діляться) та періодичності (реплікація ДНК у процесі життєвого циклу клітини суворо періодична).

Для забезпечення запуску процесу у певний час і для координації різних процесів у просторі та часі необхідні спеціальні молекулярні мітки. Крім того, для перебігу процесів у хроматині ДНК має бути у вільному вигляді, а нуклеосомна укладка перешкоджає цьому. Однак, як виявилося, саме нуклеосоми координують роботу хроматину, оскільки гістони — носії молекулярних міток.

Ще до розкодування структури нуклеосом було відомо, що деякі амінокислоти гістонів ацетилюються або метилюються. Ці та деякі інші модифікації гістонів виконують роль молекулярних міток. Останні поділяються на дві групи. Епігенетичні мітки — стійкі, не пов'язані з нуклеотидною послідовністю ДНК. Вони успадковуються з покоління в покоління у клітинах і передають інформацію про процеси, які перебігають у хроматині. Інші мітки не передаються наступному поколінню при поділі й слугують тільки для тимчасового «запам'ятовування» певного стану хроматину.

Модифікації підлягають, в основному, N-хвосту гістонів. Найкраще вивчені ацетилювання лізину, метилування лізину й аргініну, фосфорилювання серину та треоніну, убіквітилювання лізину. Усі ці модифікації є посттрансляційними.

Існують дві робочі гіпотези, які пояснюють механізм впливу модифікації гістонів на організацію та функціонування хроматину. Відповідно до першої з них, додавання ацетильних груп нейтралізує позитивний заряд молекули гістону, а приєднання фосфатних груп збільшує негативний заряд, що призводить до зміни конформації нуклеосоми та змінює доступність ДНК для різних білкових молекул. На думку прихильників другої гіпотези, провідну роль відіграє не загальний заряд молекули гістону, а певна комбінація модифікацій на даній нуклеосомі, яка «кодує» якийсь процес. Допускається, що певні білки пов'язуються з модифікованими молекулами і це призводить до запуску ланцюга реакцій, тобто таким чином зчитується «код».

Для довготривалих процесів, які відбуваються у хроматині, гістонові мітки повинні бути стабільними, а для короткострокових і періодичних — легко встановлюються та легко видаляються.

Тривалий час вважали, що метилування — стабільна модифікація, яка вилучається тільки при заміні усієї молекули гістону. Метилування встановлено для 17 залишків лізину (можуть нести від однієї до трьох метильних груп) і 7 залишків аргініну (несуть одну та дві групи). Ці модифікації відіграють важливу роль у формуванні

гетерохроматину, репарації та регуляції транскрипції. До того ж, різна кількість метильних груп на одній амінокислоті «кодує» різні біологічні функції [5; 6].

Метилування забезпечують лізинові й аргінінові гістон-метилтрансферази (histone methyltransferase — НМТ). Більша частина НМТ додає до свого складу так званій SET-домен, який забезпечує каталітичні властивості [7]. Вилучають метильні групи гістон-деметиلاзи (histone demethylase — НДМ) [8]. Кількість ферментів, які приєднують і вилучають метильні групи, помітно відрізняється. Так, наприклад, у людини передбачається наявність більше 70 НМТ і знайдено близько 10 НДМ. Специфічні для лізину деметилювальні ензими активні тільки по відношенню моно- і диметильованих залишків амінокислот. Дії НДМ не підлягає три-метилування. Очевидно, три-метильні групи є необоротними стабільними мітками. Білки, які «читають» гістоновий код для утворення зв'язків з метильованими амінокислотами, обов'язково повинні мати особливі домени, які формують «кишеню-клітку».

Ядерна ДНК у клітинах еукаріот підлягає метилуванню під дією ферментів з утворенням залишків 5-метилцитозину в основному в CG- і CNG-послідовностях. І у рослин, і у тварин метилування ДНК видо- і тканиноспецифічне і з віком зменшується. Метилування ДНК регулюється гормонами і, навпаки, метилування ДНК контролює гормональні сигнали. Численні ДНК-метилтрансферази з різною сайт-специфічністю здійснюють реплікативне і постреплікативне метилування ДНК [9].

Метилування ДНК бере участь у контролі багатьох процесів життєдіяльності клітини (реплікація, транскрипція, репарація ДНК, рекомбінація, транспозиція генів), а також є одним з ключових механізмів клітинного диференціювання. Під час блокування метилування ДНК у тварин зупиняється ембріогенез, вмикається апоптоз і все це закінчується летальністю. Встановлено, що при порушенні метилування ДНК відбувається ракова трансформація клітин. Злоякісна клітина характеризується іншою структурою метилування ДНК та певним набором активних ДНК-метилтрансфераз.

Таким чином, метилування ДНК за участі ДНК-метилтрансфераз є важливим компонентом складного епігенетичного контролю багатьох генетичних процесів у клітині. У цій реакції беруть участь три складові компоненти: ДНК, ДНК-метилтрансферази та S-аденозилметіонін як донор метильних груп. Контроль здійснюється над кожним із цих складових. Крім того, важливу роль у цьому процесі здійснюють і ДНК-деметилази.

Такий складний ферментативний процес може здійснюватися тільки при досяжності субстрату (ДНК) у хроматині. Досяжність ДНК регулюється не тільки функціонуванням гістонів, але й ба-

гатьох інших білків, у тому числі білків гормон-рецепторних комплексів. Передбачається також, що для вибору мішені метилування вирішальну роль відіграє сама послідовність ДНК.

У ссавців у ранньому ембріональному розвитку ступінь метилування різко знижується, а потім відновлюється *de novo*. Метилування певних генів у процесі розвитку організму приводить до їх стабільного сайленсингу. Воно забезпечує й інактивацію однієї з X-хромосом самок. Метилування ДНК тісно пов'язане з цими процесами і є не причиною їх, а наслідком. Передбачається, що під час метилування розпізнаються «мовчазні» гени, а метилування їх промоторів забезпечує необоротне інактивування у соматичних клітинах з цього етапу розвитку. Метилування запобігає зв'язуванню факторів транскрипції у промоторних ділянках і дає сигнал для зв'язування білків, які забезпечують репресію генів.

Виявлення переважної ролі метилування ДНК у регуляції генетичних процесів стало важливим обґрунтуванням епігенетики й епігеноміки.

Ацетильна група на залишку лізину може бути тільки одна. Ця молекулярна мітка дуже мобільна. Її забезпечують численні гістон-ацетилтрансферази (НАТ) та гістон-деацетилази (HDAC). Ацетилювання гістонів має важливе значення в регуляції, клітинному циклі та формуванні нуклеосом. Усі НАТ мають гомологічний каталітичний домен. Ферменти групи HDAC проявляють каталітичну активність тільки у складі комплексів з кофакторами [10; 11].

Мобільною модифікацією, притаманною усім гістонам, є фосфорилювання. Ця модифікація має відношення до двох протилежних процесів: деконденсації хроматину при активації транскрипції та конденсації хромосом у процесі поділу клітини або апоптозу. Приєднання фосфатних груп забезпечують кінази, а відокремлення — фосфатази.

Гістонам H2A і H2B властива також модифікація, яка характеризується приєднанням убіквітину. Цей процес регулюється убіквітин-лігазами та протеазами [12].

Вказані вище модифікації беруть активну участь в активації та припиненні транскрипції спадкової інформації. Епігенетичне пригнічення транскрипції — процеси, які дістали назву “silencing” (англ. — тиша) і містять у собі формування прицентромерного гетерохроматину, дозову компенсацію у ссавців, інактивацію у дріжджах *S. cerevisiae*, регуляцію гомеозисних генів дрозофіли. Вказані процеси характеризуються відсутністю мобільних модифікацій (ацетилювання) та наявністю стабільних міток (метилування гістонових лізинів і метилування ДНК). Кожен тип «мовчазних» ділянок має свою комбінацію епігенетичних міток.

Транскрипція — багатостадійний процес, який складається з ініціації, елонгації, термінації. Дані

етапи контролюються різними білковими комплексами. Складність процесу полягає ще і в тому, що гени розрізняються за характером своєї роботи. Так, гени «домашнього господарства» постійно активні в усіх тканинах організму; гени білків теплового шоку можуть ніколи не працювати та лише потенційно активні, долучаючись до роботи тільки під впливом факторів зовнішнього середовища; гени, які знаходяться у гетерохроматині, мають особливу систему регуляції, яка відрізняється від такої в еухроматині. Тому такий складний процес потребує і складної системи міток, яка містить у собі ацетилювання, метилювання, фосфорилювання й убіквітування.

У процесі транскрипції відбувається активна зміна модифікацій і в кожному наступному поколінні клітин ініціюється знову, тому такі мітки не можна вважати епігенетичними.

Підбиваючи підсумок вищезазначеного, можна зробити висновок. Дослідження, проведені в організмів із різних систематичних груп, вказують на те, що модифікації гістонів є універсальною системою регулювання роботи хроматину. Механізми гістонового коду, у принципі, універсальні для усіх організмів. Гомологічні ферменти модифікують однакові залишки. Тим же часом кожен організм має свої особливості. Численні дослідження вказують на складність гістонового коду. Різні модифікації, взаємодіючи між собою, формують ієрархічну систему (“cross-folk”). При цьому присутність однієї хімічної групи може корелювати з наявністю іншої або різні модифікації знаходяться в антагонізмі. Отже, процесами, які відбуваються в хроматині, керують комбінації модифікацій.

У молекулах ДНК зберігається спадкова інформація. Але самостійно вони не можуть відтворюватися, передавати інформацію наступному поколінню клітин і експресувати функцію генів. Ці процеси відбуваються за допомогою ферментів. Крім того, важливою умовою збереження і функціонування ДНК еукаріот є її локалізація у хромосомах — спеціалізованих структурах клітинних ядер. У хромосомах ДНК утворює складний комплекс з білками — хроматин.

У хромосомах розрізняють еухроматинові та гетерохроматинові ділянки. Гетерохроматин локалізується біля центромер та теломер і знаходиться у конденсованому стані протягом усього клітинного циклу. Встановлено, що у гетерохроматинових ділянках гени перебувають у неактивному стані. Доказом цьому є ефект сайленсингу активних в еухроматині генів, що були перенесені в гетерохроматин (ефект положення, який був знайдений у дрозофіли). Вважається, що гетерохроматин чинить репресивну дію на експресію генів. Можливо, у процесі еволюції природа створила такий тип упаковки спадкової інформації для того, щоб мінімізувати активність упродовженних у ДНК вірусів і мобільних елементів. У

гетерохроматинових ділянках міститься велика кількість послідовностей ДНК, які повторюються. Однак у них знайдені й активні гени. Так, у прицентромерному гетерохроматині у дрозофіли виявлено близько 450 генів. У гетерохроматині нуклеосом розташовані регулярно одна від іншої. А в еухроматині нуклеосомна упаковка нерегулярна, між ними знаходяться вільні від нуклеосом спейсери, де локалізуються активні гени [13; 14].

У клітинах еукаріот на певному етапі часу активна незначна кількість генів, а основна їх частина знаходиться в неактивному стані. Очевидно, досягнення такого стану було одним із важливих завдань еволюції. До нашого часу встановлено, що клітини еукаріот підтримують або «пам'ятають» їх програми експресії генів шляхом спадкових модифікацій у структурі хромосом.

Молекулярний зв'язок між «мовчанням» генів онтогенезу і гетерохроматином був виявлений у зв'язку з ідентифікацією у дрозофіли двох білків: специфічного білка гетерохроматину (HP1) і Polycomb-білків (Pc): HP1 — бере участь у створенні гетерохроматину, а Pc — у стабільній інактивації гомеозисних генів у процесі розвитку. Вони також беруть участь у різних клітинних подіях, але мають гомологічні ділянки — хромодомени. На підставі цього припущено, що в утворення хроматину та стабільну інактивацію генів можуть бути залучені однакові молекулярні механізми, зроблено визначення сайленсингу і те, чим він відрізняється від специфічної генної репресії. Останню здійснюють спеціальні ділянки ДНК, наприклад промотори, і вона спрямована на певну регуляторну або кодуючу послідовність ДНК. Сайленсинг діє у певній ділянці хроматину, в результаті чого утворюються протяжні ділянки ДНК, недосяжні для білків, які пов'язані з нею [15].

Важливою властивістю «мовчазного» хроматину є те, що він (ДНК і пов'язані з ним білки) реплікується у процесі подвоєння хромосоми та передається наступному поколінню клітин. Зазвичай цей тип спадковості називають «епігенетичною спадковістю». Він характеризує спадкові коливання генної активності, які відбуваються без змін у послідовності ДНК. Вважається, що такий тип спадковості лежить в основі клітинних механізмів пам'яті, які підтримують в еукаріот клітинну ідентичність і стабільні патерни генної експресії у кількох поколіннях.

Епігенетичні ефекти можуть бути зумовлені й іншими молекулярними механізмами. Їх основу становить пізнання гомологій у послідовностях нуклеїнових кислот на рівні ДНК і РНК, що приводить до транскрипційного і посттранскрипційного сайленсингу генів. Так, гени рослин і тварин, які були введені у дріжджі, інтегруються у вигляді численних копій. При цьому збільшення чисельності копій трансгену не приво-

дить до збільшення кількості його продукту. Навпаки, викликається сайленсинг генів. Встановлено, що один із таких механізмів базується на транскрипційній або посттранскрипційній регуляції, яка опосередкована РНК або РНК-інтерференцією. Факт залучення РНК-інтерференції у гетерохроматиновий сайленсинг вельми цікавий, оскільки загально визнано, що «мовчазний» гетерохроматин не транскрибується [16].

РНК-інтерференція є одним із важливих механізмів спадкового сайленсингу генів, який не пов'язаний зі зміною тексту ДНК. Його робота починається зі створення РНК-РНК дуплексів (dsРНК). Дуплекси нарізаються на невеликі фрагменти ендорибонуклеазою — Dicer. Це короткі фрагменти завдовжки 21–23 нуклеотиди з 5'-фосфорилюванням і 3'-ОН двонуклеотидними виступами. Їх називають малими інтерферентними РНК (small interfering RNA-siRNA). Переносяться siРНК на комплекс білків — RISC. Один з його білків — Аргонавт-2 (Ago-2), використовуючи енергію АТФ, розкручує siРНК. Після цього у комплексі RISC залишається тільки одна низка siРНК, яка утримується Ago-2. До складу RISC входить ще одна ендорибонуклеаза, яка розщеплює майбутню «мішень» siРНК — «навідника». Розщеплення «мішені» відбувається по краях двонуклеотидних виступів і продукти її деградації також будуть мати довжину 21–23 нуклеотиди. У результаті розщеплення виникає сайленсинг її гена [17]. Таким чином, одна з основних властивостей нуклеїнових кислот — комплементарність — використовується також у специфічності РНК-інтерференції, яка регулює активність генів.

Виявлені ефекти сайленсингу генів і цілих доменів хромосом, можливо, не залежать від послідовностей ДНК. Виникає підозра, що ці молекули не є єдиною структурою, яка кодує і передає спадкову інформацію. З розвитком епігенетики висуваються пропозиції, що й інші молекули можуть бути «генетичним матеріалом» (білки хроматину, малі інтерферуючі РНК). Проте слід пам'ятати, що самі епігенетичні маркери виникають і стираються у результаті роботи генів. Послідовність нуклеотидів у цих генах не змінюється. Більш того, функція окремих генів пов'язана з епігенетичними процесами.

Згідно з гіпотезою гістонового коду, такі посттрансляційні модифікації гістонів, як ацетилювання, метилювання, фосфофилування, утворюють специфічні сайти зв'язку для регуляторних білків хроматину, що підтверджується низкою досліджень. Ще належить з'ясувати місце знаходження інформації для запуску процесу, який долучає у гістонові модифікації та наступні механізми формування «мовчазного» хроматину. За останні роки встановлено, що у механізмі посттранскрипційного сайленсингу беруть участь РНКі. Здійснюється він ефекторними комплексами, які містять siРНК.

Важливими ділянками хромосом є центромери і теломери. У всіх клітинах еукаріот ці хромосомні структури виконують однакові функції. Центромери забезпечують правильне розходження хромосом при мітозі та мейозі, а теломери — цілісність і збереженість хромосом. Вважалося, що консервативна функція центромер визначається центромерною ДНК. Тому повинна бути специфічна універсальна для них послідовність. Підтвердити це було досить складно через високу концентрацію повторюваних послідовностей ДНК і неможливість проводити пряме секвенування. З розробкою нових методів проблему було розв'язано, при цьому визначили первинну структуру ДНК центромер хромосом людини, мухи дрозофіли та рослини *Arabidopsis thaliana*. Виявилось, що у Y-хромосомі людини центромерна активність пов'язана з тандемно повторюваними мономерами (171 п. н.), які утворюють блок; вони дістали назву *a*-сателітної ДНК [18]. Центромери хромосом людини та *Arabidopsis* подібні за будовою, але послідовність ДНК у них абсолютно різна. У дрозофіли центромера X-хромосоми має іншу будову. До того ж, у центромері кожної хромосоми не було однакових послідовностей ДНК. Це наводить на думку про те, що центромерних послідовностей ДНК недостатньо для формування центромер. Реорганізовані хромосоми людини втрачали ділянку звичайної локалізації і центромерна активність проявлялася у новій ділянці. «Неоцентромера» була наділена усіма функціями центромери: формувала первинну перетяжку хромосоми і кінетохор. Однак у центромері та «неоцентромері» не було подібних послідовностей ДНК. Ці дані, а також стабільна структура хроматину «неоцентромер», яка підтримується протягом клітинного циклу, дозволили передбачити епігенетичний рівень регулювання функцій центромери незалежно від послідовності ДНК [19].

У хроматині центромерних районів еукаріот знайдено видоспецифічний варіант гістону H3 (у людини — CENP-A; у рослин — CENH3). Припускається, що ці білки, взаємодіючи з іншими гістонами (H2A, H2B, H4), формують і визначають специфічний тип нуклеосом, характерних тільки для функціонуючих центромер. Вважають, що ці нуклеосоми є «кітвою» для утворення кінетохора [20; 21].

Механізми, які управляють функцією центромер, у наш час інтенсивно вивчаються. Встановлено, що і властивості первинної структури ДНК, і її вторинна структура, і навіть структура більш високого порядку можуть бути визначальними у розташуванні центромери у хромосомі та її функції. Можливо, механізм, який відповідає за організацію центромерного хроматину, опосередковується РНК, а саме взаємодією РНКі та хроматину.

Важливе значення у структурі та функціонуванні хромосом мають їх теломерні ділянки.

ДНК-теломер має тандемну організацію коротких мономерів консенсусної послідовності теломерного повтору (a [T/A] 1-4 a G 1-8) · n у найрізноманітніших організмів (найпростіші, гриби, рослини, комахи, ссавці), що відповідає універсальній функції теломери. Крім того, консервативною властивістю теломерної ДНК є наявність відносно короткого одноланцюжкового «хвоста», який складається з G-залишків з орієнтацією 5'-3'-ланцюга до кінця хромосоми. Вважається, що такий «хвіст» зв'язується з теломер-специфічними білками, які утворюють «ковпак» для захисту кінцевої ділянки хромосоми. Короткі повтори та G-хвост синтезуються спеціальним ферментом — теломеразою. Вона функціонує як зворотна транскриптаза, використовуючи РНК як матрицю. Теломераза забезпечує сталість розміру хромосоми. Однак розміри G-хвоста значно розрізняються у різних видів, і G-виступи взагалі можуть бути відсутні (*Arabidopsis thaliana*). Ділянка дволанцюжкової ДНК теломерного повтору також, значною мірою, варіює між видами. Розмір теломери змінюється під час онтогенезу, стає коротшим при старінні організму та злоякісному переродженні клітин. Припускають, що перші еукаріоти стабілізували кінці хромосом T-петлями, які утворюються під час упродовження G-хвоста у дволанцюжкову ДНК теломерного повтору. T-петлі знайдені у багатьох видів (людина, миша та ін.) [22; 23].

Теломерний хроматин також проявляє певну специфіку у рослин і тварин, у тому числі й ссавців, зокрема, більш короткою відстанню між нуклеосомами. Нуклеосомна організація теломерного хроматину виникла у процесі еволюції у вищих еукаріот.

Поки що немає відомостей щодо гістонового набору, який входить до складу теломерного хроматину. Кеп- і теломер-асоційована ділянка відрізняється від класичного гетерохроматину набором білків.

Таким чином, дослідження складних молекулярних комплексів певних структурних ділянок хромосом дозволило отримати докази існування шляхів реалізації однієї й тієї ж самої складної біологічної функції. Різні послідовності ДНК разом з іншими компонентами забезпечують ці функції. Так, наприклад, у теломері перехрещуються компоненти (гени і білки) та шляхи, які підтримують розміри хромосом, репарацію хромосомних розривів, передачу сигналів про ці розриви. Навіть у одного виду не всі хромосоми мають однакову структуру ДНК у теломерних ділянках. Виходячи з цього, належить з'ясувати питання: чи тільки ДНК є основою епігенетичних шляхів реалізації складних функцій різних ділянок хромосом або вона є одним із багатьох важливих компонентів, що забезпечують реалізацію цих шляхів.

До епігенетики належать різні процеси, що приводять до зміни активності генів шляхом

відносно стабільних у кількох клітинних поколіннях модифікацій, які не стосуються первинної послідовності ДНК.

Епігенетичні механізми притаманні й геномному імпринтингу, який контролює багато процесів нормального та патологічного розвитку людини і тварин. Геномний імпринтинг (англ. imprint — відбиток) — механізм зворотної вибіркової модифікації алелей генів залежно від батьківського походження, який приводить до їх диференційної експресії у процесі розвитку організму. У геномі ссавців імпринтованими називають ті гени, один з батьківських алелей яких репресований, а інший — транскрибується. У геномі людини та миші відкрито близько 100 таких генів. Вважається, що геномний імпринтинг характерний також для сумчастих ссавців, риб, комах, рослин.

Імпринтування окремих алелей пов'язано з метилуванням цитозинових основ у CpG-динуклеотидах ключових регуляторних елементів гена. Практично всі імпринтовані гени мають CpG-насичені диференційно метильовані регіони (DMRs). Метилування DMRs, як правило, пов'язано з репресією гена, хоча в деяких генах метилування DMRs є і в активних алелях. Багато імпринтованих генів розміщено вздовж хромосоми кластерами (імпринтовані домени) [24; 25].

Імпринтовані гени відіграють важливу роль у процесах росту та розвитку тварин, їх життєздатності й поведінки, хоча фенотипові прояви багатьох із них досі невідомі. У більшості випадків експресія імпринтованих генів має тканинний і стадіоспецифічний характер. Це означає, що диференційна експресія одного з батьківських алелей відбувається тільки на певній стадії розвитку та у певній системі клітин. На інших стадіях розвитку та в інших клітинних системах проявляється біалельна експресія. Більш того, моноалельна експресія імпринтованого гена не є абсолютною. Можливий широкий спектр відносної експресії цих генів.

Ефекти геномного імпринтингу проявляються у соматичних клітинах. У клітинах зародкового шляху епігенетичні розбіжності між батьківськими алелями повністю стираються у процесі мейозу, а потім знову встановлюються. І все ж таки деякі гени з покоління в покоління розпізнаються як імпринтовані, що розглядається як приклад епігенетичної спадковості. Таким чином, для епігенетичної спадковості необхідні такі умови: епігенетичні модифікації виникають у клітинах зародкового шляху і вони відновлюються після їх стирання у гаметогенезі.

Як при геномному імпринтингу, так і при епігенетичній спадковості раніше існуючі патерни епігенетичних маркерів відновлюються *de novo* після їх знищення при гаметогенезі. У процесі розвитку у соматичних клітинах відбувається репрограмування встановлених імпринтів. У кліти-

нах зародкового шляху ці імпринти зберігаються, але у процесі гаметогенезу стираються та відновлюються під час дозрівання гамет *de novo*. Механізм розпізнання DMRs імпринтованих генів невідомий. Припускається, що на модифікацію алеля можуть впливати ДНК-метилтрансферази, а також різні форми та кількісне співвідношення гістонових білків і, нарешті, імпринти, встановлені шляхом метилування, знищуються не повністю (залишкове метилування) у чоловічому зародковому шляху [26]. Вважають, що геномний імпринтинг — одна з форм біологічного захисту від ретровірусних інфекцій. Геном захищається від нового алеля шляхом його метилування.

Особливістю оогенезу у ссавців є утворення тільки однієї функціонально повноцінної яйцеклітини. Ця асиметрія оогенезу приводить до не випадкової сегрегації алелей та порушення менделівського рівноважного співвідношення у спадковості алелей. Такий неоднаковий розподіл алелей дістав назву «невипадкова сегрегація». Остання є наслідком епігенетичного механізму, який називають мейотичним драйвом, тобто порушенням здатності гетерозиготи виробляти два типи гамет з однаковою частотою. Мейотичний драйв, який спостерігається під час гаметогенезу, необхідно відрізнити від порушення менделівського співвідношення алелей у популяції через загибель гамет, ембріонів, вибіркового запліднення. Невипадкова сегрегація алеля може відбуватися як у першому, так і у другому мейотичному поділі. Вважається, що основна функція геномного імпринтингу — забезпечення парності гомологічних хромосом у клітинах, які вступають до мейозу. Отже, необхідною умовою сегрегації алелей у мейозі має бути наявність функціональної гетерозиготності у локусі, який впливає на прикріплення хромосоми до веретена поділу.

Як було зазначено вище, імпринтованих генів у геномі ссавців незначна кількість, але вони відіграють важливу роль в ембріогенезі, беручи участь у формуванні вісцеральних структур і нервової системи. Порушення геномного імпринтингу супроводжується різними аномаліями і розвитком синдромів у людини та тварин. Зміна експресії імпринтованих генів може бути як наслідком мутації, так і результатом стабільних епігенетичних модифікацій у соматичних клітинах. Сьогодні ретельно вивчаються ці аномалії розвитку на моделях у мишей, а також синдроми, які виникають у людини. Прикладом може бути синдром «великих нащадків» у корів. Часто у новонароджених телят, які були отримані шляхом клонування, відстежується посилений ембріональний ріст і підвищена маса під час народження (до 50 %, а іноді у кілька разів), часта смертність плода під час вагітності, у народжених телят — різні аномалії розвитку. З порушенням геномного імпринтингу пов'язаний розвиток

хвороб і синдромів у людини (синдром Беквіта — Відеманна, пухлина Вільмса, гепатобластома, синдром Ангельмана, синдром Прадера — Віллі та ін.). Порушення геномного імпринтингу часто виникає під час використання різних репродуктивних технологій, пов'язаних із гаметами та ранніми ембріонами. Втрата імпринтів і біалельна експресія генів може призводити до утворення злоякісних пухлин. Розвиток нового напрямку у медицині — терапевтичного клонування — підсилює інтерес до вивчення епігенетичних механізмів регуляції генної активності у соматичних ядрах, які використовуються для клонування [27–29].

Таким чином, епігенетичний статус клітини передається дочірньому поколінню клітин при її поділі. При цьому не йдеться про успадкування набутих ознак. Про це можна говорити лише у тому разі, коли набуті властивості, що виникли у соматичних клітинах, переходять у геном статевих клітин, закріплюються там і передаються наступному поколінню. Досі немає жодного факту, який би підтверджував це припущення. Спадкова інформація записана у ДНК — матеріальному носії спадковості. При трансфекції певного гена у геном клітини дослідник вводить чисту ДНК. Білки такої клітини починають взаємодію з цим геном, регулюючи його експресію, але при цьому вони не порушують послідовність нуклеотидів у ній, не змінюють спадкову інформацію.

Епігенетичні механізми вмикаються з самого початку індивідуального розвитку. Свого часу Т. Морган звернув увагу, що онтогенез починається ще з моменту дозрівання ооциту і провідну роль тут відіграє материнський геном. Відомі гени, які беруть участь у формуванні переднього та заднього полюсів майбутнього зародка. Поступово формується епігенетичний патерн, що визначає функціональний стан генів, який передається в наступне покоління клітин у процесі ембріонального розвитку. Тому епігенетику можна визначити як розділ генетики, який вивчає формування та спадкову передачу специфічного функціонального стану геному (Л. І. Корочкін) [30].

Усі вказані вище епігенетичні події (метилування, ацетилювання, сайленсинг та інші явища) і структури, які беруть участь у них (хромативні та інші білки, різні РНК, ферменти тощо), врешті-решт спрямовані на самозбереження, самомодифікацію та самореплікацію ДНК.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Structure of nucleosome core particles of chromatin* / J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes [et al.] // *Nature*. — 1977. — Vol. 269. — P. 29-36.
2. *The nucleosomal core histone octamer at 3.1. Å resolution: a tripartite protein assembly and left-handed superhelix* / G. Arents, R. W. Burlingame, B. Wang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1991. — Vol. 88. — P. 10148-10152.

3. *Thoma F.* Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin / F. Thoma, T. H. Koller, A. Klug // *J. Cell. Biol.* — 1979. — Vol. 83. — P. 403-427.
4. *Pusarla R.* Histones in functional diversification. Core histone variants / R. Pusarla, P. Bhargava // *FEBS J.* — 2005. — Vol. 272. — P. 5149-5168.
5. *Stallcup M. R.* Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation / M. R. Stallcup // *Oncogene.* — 2001. — Vol. 20. — P. 3014-3020.
6. *Bannister A. J.* Reversing histone methylation / A. J. Bannister, T. Konzarides // *Nature.* — 2005. — Vol. 436. — P. 1103-1106.
7. *Alvares-Venegasa R.* SET-domain proteins of the Su(var) 3-9, E (z) and Trithorax families / R. Alvares-Venegasa, Z. Avramova // *Gene.* — 2002. — Vol. 285. — P. 25-37.
8. *Histone* demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 / Y. Shi, F. Lan, C. Matson [et al.] // *Cell.* — 2004. — Vol. 119. — P. 941-953.
9. *Ванюшин Б. Ф.* Метилирование ДНК и эпигенетика / Б. Ф. Ванюшин // *Генетика.* — 2006. — Т. 42. — С. 1186-1199.
10. *Turner B. M.* Histone acetylation and an epigenetic code / B. M. Turner // *Bioessays.* — 2000. — Vol. 22. — P. 836-845.
11. *Histone* deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family / A. J. M. de Ruijter, A. N. van Gennip, H. N. Caron [et al.] // *Biochem. J.* — 2003. — Vol. 370. — P. 737-749.
12. *Hershko A.* The ubiquitin system / A. Hershko, A. Ciechanover // *Annu. Rev. Biochem.* — 1998. — Vol. 67. — P. 425-479.
13. *Birchler J. A.* Making noise about silence: Repression of repeated genes in animals / J. A. Birchler, M. P. Bhadra, U. Bhadra // *Curr. Opin. Genet. Dev.* — 2000. — Vol. 10. — P. 211-216.
14. *The paradox* of functional heterochromatin / P. Dimitri, N. Corradini, F. Rossi, F. Verni // *Bioessays.* — 2005. — Vol. 27. — P. 29-41.
15. *Paro R.* The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin — associated protein of *Drosophila* / R. Paro, D. S. Hogness // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1991. — Vol. 88. — P. 263-267.
16. *RNAi* — mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex / A. Verdel, S. Jia, S. Gerber [et al.] // *Science.* — 2004. — Vol. 303. — P. 672-676.
17. *Grewal S. I. S.* Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs / S. I. S. Grewal, J. C. Rice // *Curr. Opin. Cell. Biol.* — 2004. — Vol. 16. — P. 230-238.
18. *Minichromosomes* derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage / R. Heller, K. E. Brown, C. Burgtorf, W. R. Brown // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93. — P. 7125-7130.
19. *Sequence* analysis of a functional *Drosophila* centromere / X. Sun, H. D. Le, J. M. Wahlstrom, G. H. Karpen // *Genome Res.* — 2003. — Vol. 13. — P. 182-194.
20. *Centromeric* retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3 / C. X. Zhong, J. B. Marshall, C. Topp [et al.] // *Plant Cell.* — 2002. — Vol. 14. — P. 2825-2836.
21. *A novel* chromatin immunoprecipitation and array (CIA) analysis identifies a 44kb CENP-A-binding neocentromere DNA / A. W. Lo, D. J. Magliano, M. C. Sibson [et al.] // *Genome Res.* — 2001. — Vol. 11. — P. 448-457.
22. *Makarov V. L.* Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening / V. L. Makarov, Y. Hirose, J. P. Langmore // *Cell.* — 1997. — Vol. 88. — P. 657-666.
23. *Disruption* of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA / M. S. Fitzgerald, K. Riha, F. Gao [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96. — P. 14813-14818.
24. *Bird A. P.* Methylation — induced repression — belts, braces and chromatin / A. P. Bird, A. P. Wolffe // *Cell.* — 1999. — Vol. 99. — P. 451-454.
25. *Reik W.* Evolution of imprinting mechanisms: The battle of sexes begins in the zygote / W. Reik, J. Walter // *Nature Genetics.* — 2001. — Vol. 27. — P. 255-256.
26. *DNA* methyltransferases Dnmt 3a and Dnmt 3b and are essential for de novo methylation and mammalian development / M. Okano, D. W. Bell, D. A. Harber [et al.] // *Cell.* — 1999. — Vol. 99. — P. 247-257.
27. *Вспомогательная* репродукция человека и болезни генетического импринтинга / Д. А. Исаев, В. В. Заева, А. И. Болт, О. Ю. Володина // *Проблемы репродукции.* — 2005. — № 2. — С. 14-18.
28. *Murphy S. K.* Imprinted genes as potential genetic and epigenetic toxicologic targets / S. K. Murphy, R. L. Jirtle // *Environ. Health Perspect.* — 2000. — Vol. 108, Suppl. 1. — P. 5-11.
29. *Postnatal* characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning / F. B. Gary, R. Adams, J. P. McCann, R. G. Odde // *Theriogenology.* — 1996. — Vol. 45. — P. 141-152.
30. *Корочкин Л. И.* Что такое эпигенетика / Л. И. Корочкин // *Генетика.* — 2006. — Т. 42. — С. 1156-1164.