

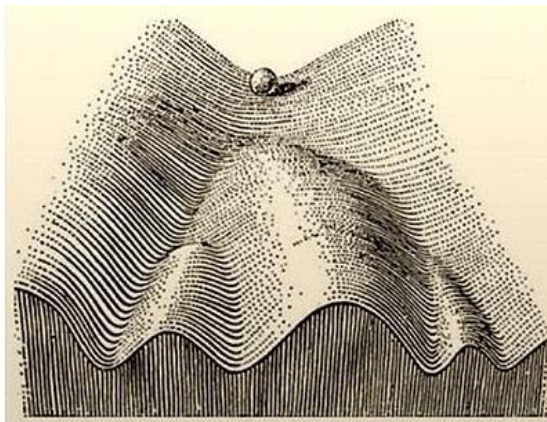
Лекція 6. Епігенетика

Епігенетика - досить молодий напрямок сучасної науки. У перекладі з грецької приставка «епі» означає «над», «вище», «поверх». Якщо генетика вивчає процеси, які ведуть до змін в наших генах, в ДНК, то епігенетика досліджує зміни активності генів, при яких первинна структура ДНК залишається незмінною.

Епігенетика схожа на «командира», який у відповідь на зовнішні стимули (такі, як харчування, емоційні стреси, фізичні навантаження) віддає накази нашим генам посилити або, навпаки, послабити їх активність.

У вузькому сенсі слова епігенетику можна визначити як зміни в транскрипції генів, зумовлені модуляціями хроматину, які не є результатом змін в нуклеотидній послідовності ДНК. Тобто епігенетика - спадкування паттерна експресії генів.

Саме завдяки епігеному, «другому коду», наш організм здатний вибудовувати клітини різних типів - волосся, печінки, мозку, - хоча в них один і той же геном. Епігеном, таким чином, - це вказівки щодо того, як керувати геномом. Саме він відповідає за активацію і дезактивацію певних генів. Розвиток епігенетики як окремого напрямку молекулярної біології почалося в сорокових роках минулого століття. Тоді англійський генетик Конрад Уоддінгтон сформулював концепцію «епігенетичного ландшафту», яка пояснює процес формування організму.



Хроматин не однорідний за своєю структурою, він виступає в різних формах упаковки - від фібрили високонденсованого хроматину (гетерохроматин) до менш компактної форми, де гени в основному експресуються (еухроматин).

В основний полімер хроматину можуть вводитися зміни шляхом: 1) включення незвичайних гістонових білків (**варіанти гістонів**), 2) змінених структур хроматину (**ремоделінг хроматина**) та 3) додавання хімічних «прапорців», міток до самих **гістонових білків** (ковалентні модифікації – **метилування, фосфорилювання, ацетилювання**). Більш того, 4) додавання метильної групи безпосередньо на цитозин в матриці ДНК (**метилування ДНК**) може створювати сайти для приєднання білків, щоб змінити стан хроматину або вплинути на ковалентну модифікацію гістонів. Також є відомості, що 5) **некодуючі РНК** можуть «направляти» перехід спеціалізованих ділянок генома в більш компактний стан.

Епігенетичні механізми впливу на геном не тільки відіграють найважливішу роль в роботі систем організму, але і можуть успадковуватися декількома поколіннями (трансгенеративна епігенетична спадковість). Однак на відміну від генетичної інформації, епігенетичні зміни можуть відтворюватися в 3-4 поколіннях, а при відсутності фактора, що стимулює ці зміни, зникають. Передача епігенетичної інформації відбувається в процесі мейозу (поділ ядра клітини зі зменшенням числа хромосом удвічі) або мітозу (поділу клітин).

У 2003 році американські вчені з Дюкського університету Р. Джіртл і Р. Уотерленд провели експеримент з вагітними трансгенними мишами агуті (yellow agouti (A^{vy}) mouse), які мали жовту шерсть і схильність до ожиріння. Вони додавали в корм мишам фолієву кислоту, вітамін В12, холін і метіонін. В результаті цього з'явилося нормальне потомство без відхилень. Харчові фактори, які виступали донорами метильних груп, шляхом метилування ДНК нейтралізували ген агуті, що викликав відхилення: фенотип їх А^{vy}-потомства змінювався за рахунок метилування CpG-динуклеотидів в локусі А^{vy}. Причому вплив дієти зберігалася і в кількох наступних поколіннях: дитинчата мишей агуті, що народилися нормальними завдяки харчовим добавкам, і самі народжували нормальних мишей. Хоча харчування у них було вже звичайне, що не збагачене метильними групами.

Вчені були змушені зробити сенсаційний висновок: **викликані стресом епігенетичні зміни, які не зачепили послідовність нуклеотидів ДНК, можуть закріплюватися і передаватися наступним поколінням!**

Новозеландським вченим П. Глюкману і М. Хансону вдалося сформулювати логічне пояснення взаємозв'язку кількості їжі під час вагітності матері зі здоров'ям дитини. У 2004 році в журналі Science вийшла їх стаття, в якій вони сформулювали «гіпотезу невідповідності» (mismatch hypothesis). Відповідно до неї в організмі, що розвивається на епігенетичному рівні може відбуватися прогностична адаптація до умов проживання, які очікуються після народження. Якщо прогноз підтверджується - це збільшує шанси організму на виживання в світі, де він має жити, якщо ні - адаптація стає дезадаптацією, тобто хворобою. Наприклад, якщо під час внутрішньоутробного розвитку плід отримує недостатню кількість їжі, в ньому відбуваються метаболічні перебудови, спрямовані на запасання харчових ресурсів про запас, «на чорний день». Якщо після народження їжі дійсно мало, це допомагає організму вижити. Якщо ж світ, в який потрапляє людина, виявляється більш благополучним, ніж прогнозувалося, такий «запасливий» характер метаболізму може привести до ожиріння і діабету 2-го типу на пізніх етапах життя. Саме цей варіант ми сьогодні найчастіше і спостерігаємо.

В цілому, можна впевнено сказати, що період вагітності і перших місяців життя є найважливішим в житті всіх ссавців, у тому числі і людини. Всі наявні сьогодні дані говорять, що саме в цей період закладаються всі основи не тільки фізичного, а й психічного здоров'я людини. І вплив цього початкового періоду життя настільки великий, що не зникає до найглибшої старості, формуючи - так чи інакше - долю людини. Як влучно висловився німецький нейробиолог Петер Шпорк, «в похилому віці на наше здоров'я часом набагато сильніше впливає раціон нашої матері в період вагітності, ніж їжа в поточний момент життя» У це важко повірити, але факти прямо говорять про це.

Епігенетика допомогла зробити дуже важливий висновок: від того, що їла мама під час вагітності, в якому психологічному стані вона перебувала і скільки часу приділяла малюкові в перші роки після його народження, буде залежати буквально все подальше життя дитини. В цей час закладаються основи всього .

Також відомо, що недоїдання і стрес в період вагітності змінюють в «гіршу сторону» концентрацію цілого ряду гормонів в організмах матері і плоду: глюкокортикоїдів, катехоламінів, інсуліну, гормону росту і ін. Через це у зародка відбуваються негативні епігенетичні зміни (ремоделювання хроматину) в клітинах гіпоталамуса і гіпофіза. Чим це загрожує? Тим, що малюк з'явиться на світ з перекрученою функцією гіпоталамо-гіпофізарної регуляторної системи. Через це він буде гірше справлятися зі стресом самої різної природи: з інфекціями, фізичними і психічними навантаженнями і т.д. Цілком очевидно, що, погано харчуючись і переживаючи під час виношування, мама робить зі своєї майбутньої дитини вразливого з усіх сторін невдахи.

Дослідивши ДНК щурів, вчені з'ясували, що у дитинчат, яких не вилизували матері, відбулися негативні епігенетичні зміни в області мозку під назвою гіпокамп. У гіпокампі виявилася зменшена кількість рецепторів до стресових гормонів. І саме через це спостерігалася неадекватна реакція нервової системи на зовнішні подразники: гіпофіз подавав команду на надлишкове виробництво стресових гормонів. Іншими словами, ті ситуації, які переносилися спокійно звичайними щурами, у потомства, яке не отримало материнського догляду, викликали неадекватно сильний стрес.

Як виявилось, все вищеописане абсолютно точно підходить і до людського розвитку. Були проведені численні дослідження дітей, які в ранньому дитинстві позбавлялися батьківського піклування або піддавалися якому-небудь насильству. Всі ці діти без винятку виростили потім з тією чи іншою спотвореною функцією нервової системи. І ці спотворення були епігенетично закріплені в клітинах мозку. Всім таким дітям була властива неадекватна реакція навіть на слабкі подразники, які нормально сприймалися благополучними дітьми. Все це формувало в дорослому віці схильність до алкоголізму, наркоманії, суїцидів та інших неадекватних вчинків. Ось чому перші роки після народження є вирішальними у формуванні соціальної поведінки і закладають всі основи характеру. Від того, скільки часу батьки приділяли своєму малюкові в цей період, буде залежати все його майбутнє: чи буде він психологічно стійким, комунікабельним і успішним або ж схильним до депресій і розладів.

Очевидно, що вплив епігеному поширюється і на процеси, пов'язані зі старінням. З віком можна спостерігати загальне зниження метилювання, в тому числі загадкових ділянок геному, які складають майже половину всієї послідовності ДНК, - мобільних генетичних елементів (МГЕ). Вони були відкриті півстоліття тому нобелівським лауреатом Барбарою Мак-Клінток як послідовності, здатні - на відміну від звичайних генів - дивним чином переміщатися по ДНК. Надмірно активізуючись з віком через диметилювання, МГЕ дестабілізують геном, викликаючи небажані хромосомні перебудови. Також з віком стають виразними зміни в метилюванні генів, пов'язаних з віковими захворюваннями: атеросклерозом, гіпертонією, діабетом, хворобою Альцгеймера та ін. Крім цього, був виявлений прямий зв'язок змін епігеному з продукцією активних форм кисню.

Але є і хороші новини. На відміну від відносно стабільної генетичної інформації, епігенетичні «мітки» за певних умов можуть бути оборотними. І це дозволяє розробити принципово нові стратегії і методи боротьби з найпоширенішими хворобами: методи, націлені на усунення тих епігенетичних модифікацій, які виникли у людини при впливі несприятливих факторів. Не випадково нинішнє століття деякі вчені називають століттям епігенетики. При вивченні історії розвитку природничих наук, біології та генетики зокрема, може скластися враження, що всі попередні роки були великим підготовчим етапом, накопиченням сил перед відкриттями дійсно надважливого значення. І, ймовірно, ми сьогодні стоїмо на порозі цих відкриттів.

Епігенетичні механізми контролю експресії генів.

Не є специфічними, а впливають на експресію багатьох генів. У зв'язку з цим їх можна назвати **глобальними механізмами контролю** або механізмами віддаленого контролю. Крім цієї особливості вони відрізняються і ще однією властивістю - різноманітністю.

1. Класична модель передбачала, що рівень експресії визначається транскрипційними факторами, які зв'язуються з регуляторними областями гена, які ініціюють синтез матричної РНК. Гістонам і негістоновим білкам відводилася роль пасивної пакувальної структури для забезпечення компактного укладання ДНК в ядрі.

У подальших дослідженнях була показана роль гістонів в регуляції трансляції. Був виявлений так званий **гістоновий код**, тобто модифікація гістонів, неоднакова в різних районах геному. Видозмінені гістонові коди можуть призводити до активізації і репресії генів.

Існує велика кількість посттрансляційних модифікацій гістонів, які формують хроматин.

Модифікації гістонів - фосфорилування, метилювання і ацетилювання призводять до зміни структури хроматину, який зумовлює зміну рівнів експресії генів.

Фосфорилування і ацетилювання носять динамічний характер - можуть досить швидко виникати і зникати. Метилювання гістонів носить найбільш статичний характер.

Фосфорилуванню піддаються залишки оксиамінокислот: серину і треоніну. Ацетилювання і метилювання відбуваються в основному з вільної аміногрупи залишків лізину або аргініну.

Як правило, **фосфорилування і ацетилюваний** стан гістонів полегшує доступ регуляторних білків до ДНК і **характерно для транскрипційно активних ділянок хроматину**, тоді як деацетилюваний стан гістонів асоційований з транскрипційно неактивним хроматином. Ефект цих модифікацій пояснюється головним чином тим, що вони зменшують позитивний заряд гістонів, завдяки якому гістони взаємодіють з кислотою ДНК.

Процеси ацетилювання/деацетилювання гістонів здійснюють тимчасову активацію/придушення експресії генів, модифікуючи гістони на локальних ділянках

хроматину, зазвичай відповідаючих промоторним районам гена. За ці процеси відповідають ферменти з групи гістон-ацетилтрансфераз (НАТ) і гістон-деацетилаз (HDAC), рівень активності яких контролюється різними сигналами, включаючи стрес, атаку патогенами, світло у рослин та ін. З гістон-деацетилазами взаємодіє велика кількість білків, що полегшують їх взаємодію з генами-мішенями - таким чином можна говорити про мультисубодиничних гістон-деацетилазних комплексах, втрата функції будь-якого з компонентів у складі яких призводить до порушень морфогенезу.

Особливою групою регуляторів транскрипції генів у еукаріот є **білки корепресори**, які здійснюють взаємодію між транскрипційними факторами і модифікаторами хроматину.

Більш тривале замовкання генів, успадковане при мітотичних і навіть мейотичних поділах клітин, пов'язане з процесом **метилування гістонів** за певними залишками лізину, який забезпечує **придушення транскрипційної активності** протяжних ділянок хроматину. Важливу роль в тривалій репресії унікальних послідовностей ДНК в еухроматину грають **гістон-метилтрансферази Polycomb (PcG) групи**. Білки цієї групи вперше були ідентифіковані у дрозофіли як регулятори активності гомеозисних генів, що грають ключову роль в розвитку. У рослин виявлено аналогічні білки, що утворюють комплекси. Наприклад, комплекси EMBRYONIC FLOWER (EMF), VERNALIZATION (VRN), FERTILISATION INDEPENDENT SEED (FIS). Всі три комплекси виконують різні функції в розвитку рослин. EMF контролює баланс вегетативного і генеративного розвитку шляхом придушення передчасного цвітіння, VRN бере участь в одному з шляхів індукції цвітіння шляхом придушення транскрипції генів-репресорів цвітіння, FIS необхідний для координованого розвитку зародка і ендосперму в насінні.

Гени груп Polycomb і Trithorax

Гени груп Polycomb і Trithorax є ключовими регуляторами проліферації клітин і клітинної ідентичності у багатоклітинних еукаріот. Групи білків Polycomb і Trithorax функціонують здебільшого антагоністично: родина білків PcG встановлює «мовчазний» стан хроматину (гени цієї групи кодують білки, що модифікують гістони або інші репресивні асоційовані з хроматином фактори, у дрозофіли таких генів 20), а родина білків trxG зазвичай сприяє генній активності (гени кодують транскрипційні фактори або ферменти ремоделінг хроматину, у дрозофіли таких генів 15).

Шаблон, за яким відбуваються модифікації ядерних білків, стали називати **гістоновим кодом**.

Гістонові модифікації принципово відрізняються від метилування ДНК. Метилування ДНК являє собою дуже стабільне епігенетичне втручання, яке частіше закріплюється в більшості випадків. Переважає більшість гістонових модифікацій більш варіативна. Вони впливають на регуляцію експресії генів, підтримку структури хроматину, диференціацію клітин, канцерогенез, розвиток генетичних захворювань, старіння, репарацію ДНК, реплікацію, трансляцію. Якщо гістонові модифікації йдуть на користь клітини, то вони можуть тривати досить довго.

Одним з механізмів взаємодії між цитоплазмою і ядром є фосфорилування та/або дефосфорилування транскрипційних факторів. Гістони були одними з перших білків, фосфорилування які було виявлено. Це здійснюється за допомогою протейніназ.

Під контролем фосфорилуємих транскрипційних факторів знаходяться гени, в тому числі гени, що регулюють проліферацію клітин. При подібних модифікаціях в молекулах хромосомних білків відбуваються структурні зміни, які призводять до функціональних змін хроматину.

Крім описаних вище посттрансляційних модифікацій гістонів є більші білки, такі як убіквітин, SUMO і ін., які можуть приєднуватися за допомогою ковалентного зв'язку до бічних аміногруп білка-мішені, впливаючи на їх активність.

2. Компактизація хроматину

Встановлено, що компактизація хроматину супроводжується припиненням його транскрипційної активності, а декомпактизація гетерохроматину, перехід його в еухроматин, навпаки, призводить до різкого підвищення транскрипційної активності локально розташованих генів. Висока чутливість активно транскрибуємих ділянок хроматину до дії нуклеаз (наприклад, ДНКаза I) так само вказує на те, що вони менш щільно упаковані. Така чутливість до нуклеаз часто поширюється на сегменти довжиною в кілька тисяч пар основ, що фланкують транскрипційну одиницю.

Нуклеосоми, що містять активні гени, характеризуються низьким вмістом асоційованого з ними гістона H1, збагачені ацетильованими та убіквітинвмісними гістонами і пов'язані з так званими HMG-білками, що мають чітко виражені кислотні властивості. Ці модифікації, ймовірно, впливають на зв'язування гістонів з ДНК і сприяють нерегулярному розподілу нуклеосом, внаслідок чого ДНК стає більш чутливою до нуклеазного розщеплення.

3. Ремоделювання хроматину - процес переміщення нуклеосом по ДНК, що приводить до зміни щільності нуклеосом або до розташування їх на певній відстані один від одного. Здійснюється за допомогою спеціальних білкових комплексів, при цьому витрачається АТФ.

Ремоделювання - ключовий процес в ініціації транскрипції, реплікації, зв'язуванні транскрипційних факторів, підтримці статусу хроматину (активний/неактивний). Ремоделювання призводить до активації транскрипції генів при утворенні відкритого хроматину.

4. Регуляторні РНК

Молекули РНК виконують в клітині безліч функцій. Однією з них є регуляція експресії генів. За цю функцію відповідають регуляторні РНК.

Відкриття цілого світу малих РНК (small RNA, sRNA), що регулюють експресію генів, відбулося в 1990-х роках. При вивченні подавлення генної експресії за допомогою антисмислової РНК був виявлений феномен - подавлення експресії можна викликати не тільки введенням в клітини антисмислової РНК, але і за допомогою смислової РНК. Однак

в десятки і сотні разів більше ефективним було введення суміші смислової і антисмислової РНК, іншими словами дволанцюгової РНК.

Надалі з'ясувалося, що сама по собі дволанцюгова РНК інертна і не здатна до спаровування основ. Однак вона може виступати тригером РНК інтерференції завдяки тому, що в клітинах працює потужний і високоспецифічний механізм процесингу дволанцюгових РНК з перетворенням їх в високоактивні короткі одноланцюгові sРНК довжиною 20-24 нуклеотиди. Ці sРНК і є агентами РНК-інтерференції, необхідної як для метилування ДНК і гістонів, так і для стійкої посттранскрипційної репресії генів, що передається при клітинному поділі як метастабільний стан цитоплазми.

Механізм дії різних регуляторних РНК схожий і полягає в придушенні експресії генів, що реалізується шляхом комплементарного приєднання регуляторної РНК до мРНК, з утворенням дволанцюгової молекули (дцРНК). Само по собі утворення дцРНК призводить до порушення зв'язування мРНК з рибосомою або іншими регуляторними факторами, пригнічуючи трансляцію. Також після утворення дуплексу можливий прояв **феномена РНК-інтерференції** - фермент **Dicer**, виявивши в клітині дволанцюгову РНК, «розрізає» її на фрагменти. Один з ланцюгів такого фрагмента (siRNA) зв'язується комплексом білків **RISC** (RNA-induced silencing complex).

В результаті діяльності RISC одноланцюговий фрагмент РНК з'єднується з комплементарної послідовністю молекули мРНК і викликає розривання мРНК білком сімейства **Argonaute**. Дані події призводять до придушення експресії відповідного гена.

Малі РНК діляться на дві великі групи: **МікроРНК** (miRNA) і **малі інтерферуючі РНК** (short interfering RNA, siRNA). Вони значно відрізняються один від одного по своєму генезису і характеру дії.

1. **МікроРНК** закодовані на власних генах і транскрибуються за допомогою РНК-полімерази II в довгі (приблизно з однієї тисячі нуклеотидів) первинні транскрипти, які подібно до тих, що кодують білки мРНК, кеповані і поліаденільовані. У своїй середній частині ці первинні транскрипти мають характерну структуру "шпильки", що складається з "стеблинки" і "голівки". У ядрі відбувається розривання первинного транскрипту: спочатку вирізується шпилька (pre - міРНК), а з її "стеблинки" потім короткий дволанцюговий фрагмент завдовжки 20-22 нуклеотиди. Цей дуплекс переноситься в цитоплазму і вступає у взаємодію з білком AGO₁, що має активність РНКаз. Цей білок гідролізує один з ланцюгів дуплексу і міцно з'єднується з іншим ланцюгом. У комплексі з AGO₁ зріла одноланцюгова міРНК здатна викликати вибіркового гідролізу РНК, а в комплексі з AGO₄ - впливати на метилування хроматину в комплементарних ділянках ДНК.

У арабідопсису майже 70% усіх відомих мікроРНК мають свою мішенню чинники транскрипції. Виявлені мікроРНК, націлені та мРНК ферментів і так далі.

Доведено, що мікроРНК хребетних, у загальному, мають близько 200 транскриптів мішеней. Одна мікроРНК може пригнічувати утворення багатьох білків регулювати сотні генів, і майже 80 % геному людини перебуває під їх регуляцією.

Станом на 2014 р. у клітинах людини відомо близько 800 мікроРНК, передбачається понад 1000 генів мікроРНК у геномі людини, які регулюють ембріональний розвиток, клітинне і тканинне диференціювання, апоптоз, метаболізм, експресію білків, модулюють різні імунні реакції. МікроРНК гальмують активність генів; вони комплементарно приєднуються до ділянок мРНК і пригнічують їх трансляцію. Унікальні мРНК містять потенціальні сайти зв'язування мікроРНК на своїх 3' нетрансльованих ділянках (3'-UTR, від англ. 3'-untranslated regions).

2. Малі інтерферуючі РНК (siРНК) утворюються в результаті активності РНК-залежних РНК-полімераз, спрямованих на одноланцюгові РНК екзогенного і ендогенного походження. Типові мРНК недоступні для РНК-залежних РНК-полімераз завдяки їх кепуванню і поліаденілуванню. Фермент працює і збирає другий ланцюг на одноланцюговій РНК віроїдів, на продуктах транскрипції вірусної ДНК і трансгенів.

Процесинг siРНК схожий з процесингом мікроРНК, і в нім беруть участь ті ж білки або їх гомологи : AGO₁, AGO₄ та ін. Йде розрізання на короткі дволанцюгові фрагменти і комплекс, що утворився, з білками служить агентом РНК-інтерференції. РНК-інтерференція, здійснювана за допомогою малих РНК, викликає вибіркочув репресію генів як на транскрипції (шляхом метилування ДНК і гістонів), так і на посттранскрипційних рівнях: шляхом гідролізу мРНК, які комплементарні малим РНК у рослин і шляхом пригнічення елонгації і термінації трансляції у тварин.

3. піРНК, РНК що взаємодіють з PIWI (англ. *PIWI-interacting RNA*, *piRNA*) — окремий клас малих некодуєчих РНК що взаємодіють з білками PIWI для реалізації механізму спрямованого заглушення активності генів у тварин. Довжина піРНК сягає 21-33 нуклеотиди. Найбільша активність піРНК спостерігається в період ембріонального розвитку організмів і їхньою мішенню є транспозони.

піРНК на відміну від мікроРНК та міРНК не так сильно вивчені. Вперше піРНК були показані у плодової мухи *Drosophila melanogaster*. При вивченні того, як в гаметах самців заглушується гени *Stellate*, було встановлено що з ділянки повторювальних елементів *Su(Ste)* зчитується РНК в обох напрямках: прямому та зворотному (сенси та антисенсу), і така двоспіральна коротка РНК приводить до деградації транскриптів *Stellate*. Пізніше було показано в тканинах сім'яників та у раннього ембріона *D. melanogaster* наявність великої кількості РНК завдовжки у 23-29 нуклеотидів, що були названі rasiRNA (англ. *repeat associated small interfering RNA*, малі інтерферуючі РНК, що асоційовані з повторами). У 2006 році було встановлено, що Piwi (англ. *P-element-induced wimpy testis*), білок родини Аргонавт, що у *D. melanogaster* відповідає за заглушення ретротранспозонів, взаємодіє саме з rasiRNA.

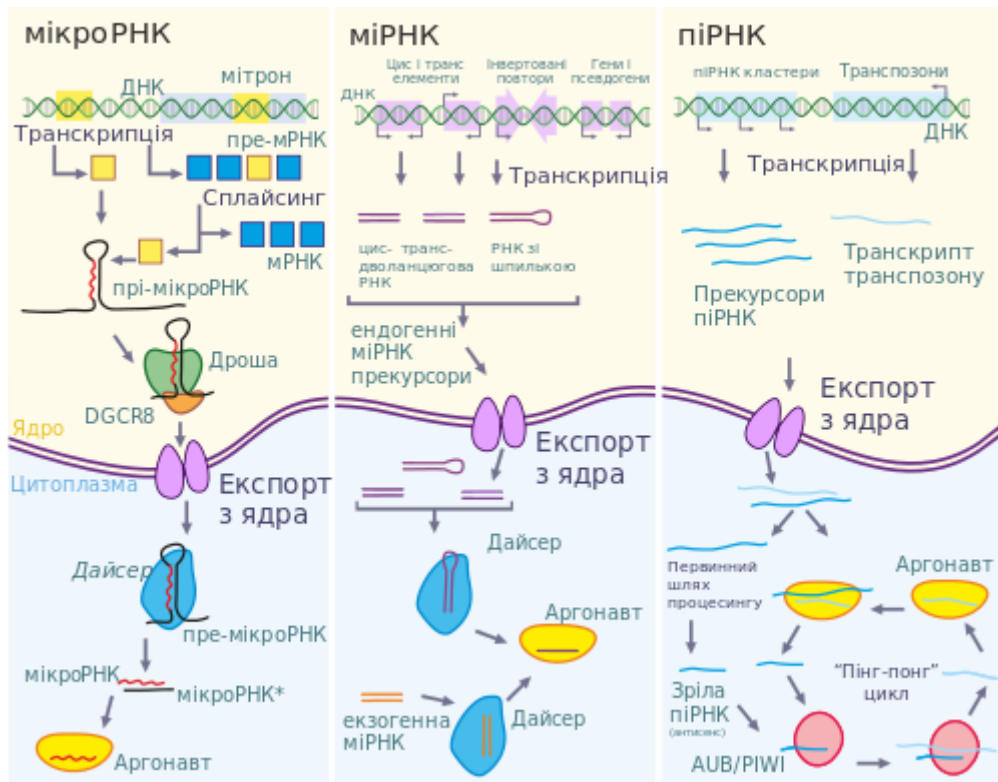
Первинна піРНК зчитується з піРНК-кластерів (ДНК різних транспозонів) у ядрі. Вже в цитоплазмі первинний шлях генерує антисенсові піРНК. У ядро попадає лише комплекс піРНК-PIWI.

З одного піРНК кластеру може зчитуватися (транскрибуватися) РНК у прямому чи зворотному напрямках (сенси/антисенсу). Результатом транскрипції є довга одноланцюгова молекула РНК, первинна піРНК чи піРНК прекурсор. В цитоплазмі поки що не до кінця з'ясований механізм приводить до дозрівання (процесингу) первинної піРНК до антисенсової піРНК довжиною 23-29 нуклеотидів, 5' кінцева ділянка яких дуже багата на уридин (U). Далі білки сімейства Аргонавт (*aubergine* (AUB) та PIWI) зв'язуються з такою одноланцюговою антисенсовою піРНК і формують комплекс, що здатен призводити до нуклеазного розрізання мРНК активних транспозонів. Розщеплення мРНК активного транспозону призводить до утворення змістовної піРНК з сильною комплементарністю до аденіну. Цей механізм називається «пінг-понг цикл».

Основна роль піРНК — заглушення транспозонів, мобільних генетичних елементів в гаметах різних організмів (мухи, риби, ссавці). Ця роль достатньо консервативна, тобто залишається присутньою в несильно зміненому стані у багатьох тварин впродовж еволюціонування. Транспозони можуть негативно впливати на організм господаря, тому що такі генетичні елементи здатні до копіювання або вирізання та вставлення себе з одного

місця ядерної ДНК на інше. Тому контроль активності транспозонів був важливим механізмом, який виробився в організмах. В дорослої тварини заглушення транспозонів відбувається також шляхом активності ендегенних інтерферуючих РНК, тоді як в гаметах таку функцію виконують саме піРНК.

Механізм РНК індукованого заглушення (англ. *RNA silencing*) виконує специфічне «вимкнення» генів-мішеней в організмах шляхом комплементарного розпізнавання мРНК відповідною малою некодуючою РНК (піРНК, мікроРНК чи міРНК). З такої нкРНК та білку сімейства Аргонавт формується RISC, РНК-індукований комплекс заглушення (англ. *RNA induced silencing complex*).



РНК-інтерференція, здійснювана за допомогою малих РНК, викликає вибіркoву репресію генів як на транскрипційному (шляхом направлення ділянок метилування ДНК і гістонів), так і на посттранскрипційному рівнях (шляхом гідролізу мРНК, що мають комплементарні малим РНК послідовностям - у рослин і шляхом подавлення елонгації і термінації трансляції у тварин).

5. Метилування ДНК

Експресія генів корелює зі ступенем метилування специфічних залишків цитозину всередині регуляторних областей генів і навколо них.

Відомо, що активно функціонуючі гени тварин відносяться до ДНК з неметильованими CCGG-послідовностями. Субстратом метилування ДНК у тварин є цитозин (приєднується до п'ятого атому кільця з утворенням 5-метилцитозину) в складі динуклеотидів CG. Взагалі, в 70-80% динуклеотидних контактів CG обидва цитозини є метильованими в еукаріотичних геномах. Зони, де підтримується деметильований стан CG (CG-острівці), часто розташовані в промоторах генів домашнього господарства, які є

активними незалежно від спеціалізації клітин. Для рослин характерне метилювання цитозину в контексті CG, CNG, CNN (N- відмінний від гуаніну нуклеотид).

За винятком декількох випадків, при наявності метилюваних груп (гіперметилювання) ефективність генної експресії зменшується, а частіше експресія взагалі припиняється. Активний стан генів зазвичай поєднується з відсутністю метилювання або зниженням ступеня метилювання (гіпометилювання) на тих же самих сайтах. При цьому сайти метилювання, пов'язані з інактивацією, локалізовані в основному в області промоторів, але можливий і вибір більш далеких регуляторних послідовностей. Передбачається, що гальмування транскрипції може відбуватися в результаті порушення зв'язування факторів транскрипції з відповідними регуляторними областями генів (посадки ТФ) при наявності метилюваних груп в цих областях. Метилювання ДНК в промоторній ділянці гена і супутні зміни структури хроматину можуть створювати перешкоди для і, як наслідок, знижувати активність відповідного гена.

У еукаріот, метилюванню піддається цитозин, причому тільки в складі динуклеотидів 5'-ЦГ-3'. В результаті у людини в метилюваному стані перебуває від 50 до 90% залишків цитозину в динуклеотидах ЦГ. Слід зазначити, що ступінь метилювання різних генів виявляється неоднаковим для різних стадій розвитку людини, різних тканин і різних ділянок ДНК.

Профіль метилювання - активування або пригнічення - змінюється в залежності від факторів середовища.

Патерн (зразок, шаблон) тканинспецифічної метилюваної ДНК є результатом двох процесів: підтримки метилюваного статусу після реплікації і метилювання de novo. Підтримуюча ДНК-метилтрансфераза (DNA methyltransferase, Dnmt) спрацьовує протягом 1-2 хвилини після реплікації: дві дочірні молекули ДНК містять батьківський ланцюг ДНК (з 5mC в складі CG) і синтезований ланцюг, де С не метилюваний. Dnmt впізнає такі напівметилювані динуклеотидні контакти і відновлює симетрію щодо метилювання. В якості донора метильної групи ферменти використовують S-аденозилметіонін.

Інші ДНК-метилтрансферази здійснюють метилювання ДНК de novo. Особливо важливим цей процес є на ранніх стадіях ембріонального розвитку, коли ДНК є тотально деметилюваною. У процесі диференціації здійснюється масове метилювання ДНК, що визначає специфічне вимкнення певних груп генів в спеціалізованих клітинах. Крім того, деметилювання можливо і в диференційованих клітинах, де Dnmt використовуються для відновлення метилюваного статусу.

Найбільш густому метилюванню піддаються часті повтори, причому рівень їх метилювання корелює зі ступенем їх репресії. Замоквання транскрипції також пов'язано з їх густим метилюванням по цитозину. Вплив метилювання ДНК на структуру хроматину має велике значення для розвитку і функціонування здорового організму, щоб подавляти значну частину генома чужорідного походження, тобто репліковані елементи, що переміщуються, вірусні та інші повторювані послідовності.

Рестриктаза HpaII розрізає послідовності CCGG за умови, що другий атом С в цій послідовності неметилюваний, тобто знаходиться в складі активних генів. Тому, щоб

виявити активні гени, можна провести скринінг ДНК на неметильовані «CG -острівці» за допомогою HpaII.

Крім того, активні гени (місця, де відсутні нуклеосоми) набагато чутливіші до DNКаза 1.

6. Геномний імпринтинг

Геномної імпринтинг - це диференційна модифікація материнського і батьківського генетичного матеріалу, що входить в зиготу, яка опосередковує диференціальну експресію батьківських алелей в процесі розвитку організму. Швидше за все, що імпринтингу піддається обмежена кількість генів людини або невеликі ділянки хромосом. Наприклад, більшість генів 11-ї пари хромосом експресується на обох хромосомах, проте ген H19 експресується тільки на материнській хромосомі, а ген IGF2 - тільки на батьківській хромосомі.

До кінця не встановлений і механізм геномного імпринтингу. Цікаво відзначити, що вміст метильованих сайтів в ДНК сперматозоїдів і ДНК яйцеклітини різний. Це наводить на думку, що статеві відмінності в ступені метилювання ДНК, які проявляються при гаметогенезі, можуть вносити свій внесок в процес імпринтингу. Мабуть, імпринтинг встановлюється під час гаметогенезу або до нього і стабільно зберігається при поділі соматичних клітин у багатьох поколіннях. Він зникає в лінії зародкових клітин, щоб знову диференціальним чином відновитися в сперматозоїді і яйцеклітині.

Геном яйцеклітини в значній мірі гіпометильований, геном сперматозоїда відповідно гіперметильований. Під час передімплантаційного стану зародка обидва цих набори хромосом частково деметилуються, потім, в процесі розвитку плоду, батьківські хромосоми інтенсивно, але диференційно метилуються. Можливо, це і є ключ до розуміння механізму імпринтингу.

Залишається не менше загадкової і функціональна роль геномного імпринтингу. Найбільш популярною, хоча експериментальною і поки не обґрунтованою, є теорія імпринтингу як результату еволюційного конфлікту між двома егоїстичними геномами - материнським і батьківським. Відповідно до цієї теорії, батьківський геном є агресивним по відношенню до організму матері, тому материнський геном спрямований на придушення його прояву з метою захисту організму. Тому не дивно, що батьківський геном експресується переважно в клітинах трофобласта і неембріональних тканин, а материнський - переважно в клітинах самого ембріона.

7. Інактивація X-хромосоми

У людини інактивація однієї з двох X-хромосом в соматичних клітинах жіночого організму компенсує "брак" однієї X-хромосоми в соматичних клітинах чоловіків. Інактивація X-хромосоми здійснюється в три етапи на ранніх стадіях ембріогенезу. Спочатку з двох X-хромосом вибирається одна, призначена для інактивації. Потім інактивація поширюється на всю хромосому. Нарешті, змінений стан стабілізується, так що обрана хромосома залишається неактивною в наступних поколіннях клітин. Інактивація хромосоми відбувається не у всіх ембріональних клітинах. Приблизно на четвертий день

після імплантації зародка X-хромосома, отримана від батька, вибірково інактивується в клітинах, що беруть участь у формуванні неембріональних тканин. Через шість днів внутрішньматкового розвитку одна з двох X-хромосом, обрана випадковим чином, інактивується у всіх клітинах, призначених для плода. Таким чином, плід жіночої статі розвивається як мозаїчний організм, в клітинах якого експресуються або батьківські, або материнські X-хромосоми. Неактивна X-хромосома в інтерфазних ядрах має вигляд висококонденсованої гетерохроматинової структури (так зване тільце Барра). На відміну від активної гомологічної хромосоми, неактивна X-хромосома реплікується тільки в кінці S-фази. Майже всі гени, які кодуються неактивною X-хромосомою, втрачають здатність до експресії. Неактивний стан дуже стабільний, і лише в рідкісних випадках відбувається реактивація окремих областей. При нормальному розвитку реактивація здійснюється тільки в зародкових клітинах безпосередньо перед мейозом.

На жаль, як і у випадку з геномним імпрінтінгом, механізм вибору, інактивації і підтримки інактивованого стану X-хромосоми не встановлено. Відомо тільки, що в цьому процесі бере участь X-зчеплений ген **XIST**, з двох алелей якого активна тільки та, яка знаходиться якраз таки на X- хромосомі, яка інактивується. Крім того, вважається, що в інактивації X-хромосоми не менш важливе значення має метилювання ДНК.