

КУРС ЛЕКЦИЙ

В. В. Гринев

ГЕНЕТИКА

ЧЕЛОВЕКА



**УДК 575.1/2:599.89(075.8)**  
**ББК 28.704я73**  
**Г85**

*Печатается по решению  
Редакционно-издательского совета  
Белорусского государственного университета*

**Рецензент**  
кандидат биологических наук,  
доцент *Д.Б. Сандаков*

**Гринев В. В.**

**Г85** Генетика человека : курс лекций / В. В. Гринев. –  
Мн. : БГУ, 2006. – 131 с. : ил.  
ISBN 985-485-586-4

В курсе лекций излагаются основы генетики человека.

Адресуется студентам и аспирантам, специализирующимся в области биологии, химии, экологии, биотехнологии, биофизики и других наук.

**УДК 575.1/2:599.89(075.8)**  
**ББК 28.704я73**

ISBN 985-485-586-4

© Гринев В. В., 2006  
© БГУ, 2006

## **ВВЕДЕНИЕ**

---

Генетика человека – раздел общей генетики, который изучает особенности организации и реализации наследственной информации человека, а так же механизмы ее передачи в ряду поколений. В последнее время эта область естествознания активно развивается, что обусловлено, прежде всего, теми надеждами, которые возлагаются на генетику человека как науку. Есть веские основания полагать, что знания, полученные в генетических исследованиях человека, помогут нам не только глубже познать самих себя, познать свою природу, но и позволят разработать эффективные способы лечения многих заболеваний человека, в первую очередь наследственных.

В общей же структуре заболеваний человека наследственная патология занимает лидирующую позицию. Так, даже без учета моногенных и хромосомных заболеваний, больших и малых врожденных пороков развития и посттравматических осложнений, мультифакториальные заболевания, которые контролируются кроме средовых факторов еще и генетическими, составляют 92-93% от всей неинфекционной патологии человека. Молекулярно-генетическая природа и патогенез таких заболеваний остаются слабо изученными. Однако, не смотря на это, в последние годы предпринимаются активные попытки использования уже имеющихся знаний с целью генной терапии таких заболеваний. Согласно прогнозам Ф. Коллинза, руководителя американской части международного проекта "Геном человека", в обозримом будущем усилия по поиску и разработке новых и более эффективных методов генной терапии наследственных заболеваний человека приведут к тому, что подавляющее большинство таких заболеваний будет лечиться именно таким способом. Причем немаловажная роль в таких исследованиях отводится специалистам-биологам.

Быть может потому, что у многих ученых сформировалась твердая убежденность в молекулярно-генетической природе большинства, если не всех, заболеваний человека, в настоящее время наиболее активно развивается именно молекулярная генетика человека. В связи с этим объем наших знаний (а точнее – информации) в данной области стремительно растет. Достаточно сказать, что к 2000-му году геном человека был полностью секвенирован. Теперь нам очень многое известно о структурной организации генома человека, количестве генов, которые входят в его состав, для многих из них установлена

функция, изучено их строение, выяснены особенности организации внегенной ДНК и. т. д. Однако до сих пор мы очень мало знаем о функционировании генома человека как системы, даже не смотря на то, что в последнее время стало много известно о реализации наследственной информации у человека, о механизмах контроля дифференциальной экспрессии генов и их участии в индивидуальном развитии человека.

Следует отметить, что современные генетические исследования человека не сводятся только к изучению патологии и к разработке подходов практического использования полученных знаний. Без сомнения, не меньший интерес вызывает и изучение генетических аспектов нормального состояния человека. Как реализуется наследственная информация в норме? Какие факторы влияют на ее реализацию? Насколько зависим человек в своей жизни от той генетической информации, которую он унаследовал от своих родителей? Как это проявляется? Какие признаки человека зависят от генов в большей, а какие в меньшей степени? На все эти и на многие другие вопросы и пытаются ответить генетики, движимые жадной жаждой знаний, любопытством, а порой, чего уж тут скрывать, и тщеславием и честолюбием (как и все другие люди, ведь все мы, в конце концов, похожи друг на друга и все мы во многом зависим от наших генов, равно так же как от них зависят наши эмоции).

## ГЛАВА 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

---

Геном – полная генетическая система клетки (совокупность всей ДНК клетки), определяющая характер онтогенетического развития организма и наследственную передачу в ряду поколений всех его структурных и функциональных признаков. Этот термин был впервые введен Г. Винклером в 1920 г. В целом, понятия геном и ДНК в значительной степени тождественны, так как основные принципы организации и функционирования генома целиком определяются свойствами ДНК. Однако понятие геном является более общим и может быть применимо к таксономической группе, виду, отдельной особи, отдельной клетке многоклеточного организма, микроорганизму или вирусу. Так, можно говорить о структуре генома про- и эукариот, сравнивать геномы разных видов, изучать особенности строения генома у конкретных индивидуумов или следить за изменениями, происходящими в геноме специфических клеток в процессе их онтогенетической дифференцировки.

Геном человека, равно также как и геном любого другого вида животных, состоит из двух геномов – сложного ядерного генома и менее сложно организованного генома митохондрий (рис. 1). Ядерный геном человека содержит огромный объем генетической информации – около 3000 мегабаз (Мб), – часть из которой кодирует первичную структуру белков, синтезируемых на свободных цитоплазматических или мембраносвязанных рибосомах. Митохондриальный геном имеет относительно небольшой размер – около 16,6 килобаз (Кб), – и кодирует все митохондриальные рибосомальные и транспортные РНК, а так же часть белков, которые необходимы для нормального функционирования митохондрий.

Наиболее общие представления о геноме человека могут быть получены с помощью анализа кинетики реассоциации молекул ДНК. Динамика плавления геномной ДНК обнаруживает присутствие, по крайней мере, трех различающихся по химической сложности фракций. Быстро ренатурирующая фракция ДНК (около 10%) состоит из относительно коротких высокоповторяющихся последовательностей. В промежуточную фракцию (около 30%) входит множество умеренно повторяющихся ДНК – более протяженных, но представленных меньшим числом копий. Наконец медленно ренатурирующая фракция



**Рис. 1.** Организация генома человека.

(около 60%) объединяет в себе уникальные последовательности ДНК, которые встречаются в геноме не более двух раз.

Более детальный анализ геномной ДНК, проведенный с помощью методов генетического и физического картирования, показал, что лишь около 30% ядерного генома организовано в гены и геноподобные последовательности, остальные же 70% составляют внегенную (или экстрагенную) ДНК. В свою очередь последняя примерно на 80% состоит из уникальной и низкоповторяющейся ДНК и на 20% – из умеренно- и высокоповторяющихся последовательностей. Фракция умеренно- и высокоповторяющейся ДНК включает тандемные или кластеризованные повторы и диспергированные генетические элементы. Что касается генов и геноподобной ДНК, то эта фракция лишь на 10% является кодирующей, а остальные 90% состоят из псевдогенов, генных фрагментов, интронов и других геноподобных нетранслируемых последовательностей. Следовательно, из всего объема геномной

ДНК только 3% несет информацию о первичной структуре клеточных белков, рибосомальных, транспортных и других видах РНК, а 97% такой информации не содержит. Закономерно возникает вопрос: зачем клетке такое огромное количество "избыточной" ДНК, не несущей никакой информационной нагрузки? Окончательного ответа на этот вопрос пока не существует, хотя и высказано ряд предположений, которые будут обсуждаться ниже.

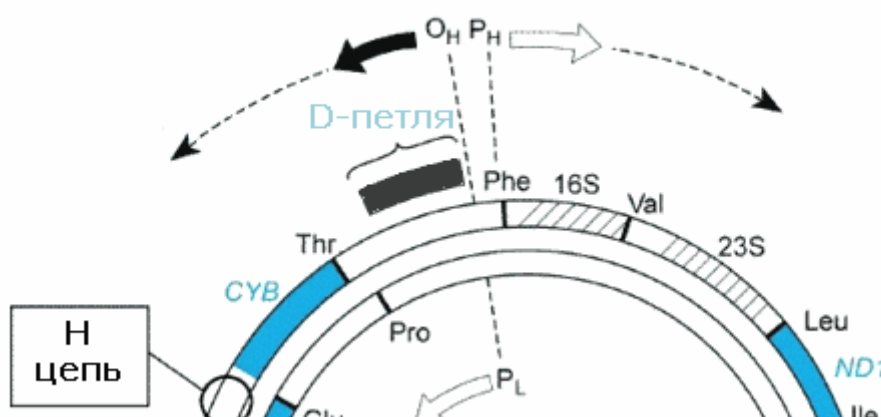
### 1.1. Митохондриальный геном человека

Митохондриальная ДНК человека это кольцевая двухцепочечная молекула размером 16569 пар оснований. Указанный размер митохондриальной ДНК можно выразить и в других единицах, например, в виде молекулярной массы, равной  $10^6$  дальтон, или в виде длины контура молекулы, которая равна 5 мкм. В молекуле ДНК митохондрий принято различать тяжелую *H*-цепь и легкую *L*-цепь. Обе эти цепи на 44% обогащены гуанином и цитозином, причем в *H*-цепи преобладает гуанин, а в *L*-цепи - цитозин. Кроме того, на одном участке к двухцепочечной кольцевой молекуле митохондриальной ДНК комплементарно присоединен небольшой фрагмент ДНК размером 7S (так называемая *D*-петля), благодаря чему она становится трехцепочечной.

В любой ядросодержащей клетке человека имеются тысячи копий молекул митохондриальной ДНК. В связи с этим, не смотря на то, что одна молекула митохондриальной ДНК примерно в 8000 раз легче ДНК любой средней хромосомы ядра, в сумме вся митохондриальная ДНК занимает примерно 0,5% от общего количества ДНК ядросодержащей соматической клетки.

#### 1.1.1. Митохондриальные гены

Первичная структура митохондриальной ДНК человека была полностью определена в 1981 году благодаря работам группы исследователей под руководством Андерсона С., а повторное секвенирование было осуществлено в 2001 г. В отличие от ядерной ДНК в митохондриальной ДНК обе цепи являются смысловыми и содержат 37 генов: 28 генов локализовано в *H*-цепи и 9 генов – в *L*-цепи (рис. 2).



**Условные обозначения:**

$P_H$	– точка начала и направление транскрипции тяжелой цепи;
$P_L$	– точка начала и направление транскрипции легкой цепи;
$O_H$	– точка начала и направление репликации тяжелой цепи;
$O_L$	– точка начала и направление репликации легкой цепи;
$16S - 23S$	– гены рибосомальных РНК (рРНК);
$\downarrow$	– гены транспортных РНК (тРНК);
$\blacksquare$	– гены, кодирующие белки;
$\square$	– некодирующая ДНК;
$ND1 - ND6$	– гены, кодирующие субъединицы 1-6 НАДН-дегидрогеназы;
$CO1 - CO3$	– гены, кодирующие субъединицы 1-3 цитохром <i>c</i> -оксидазы;
$CYB$	– ген, кодирующий цитохром <i>b</i> ;
$ATPase 6$	– ген, кодирующий субъединицу 6 АТФ-азы;
$ATPase 8$	– ген, кодирующий субъединицу 8 АТФ-азы.

**Рис. 2.** Организация митохондриального генома человека.

Тяжелая цепь митохондриальной ДНК кодирует две рибосомальные РНК (16S и 23S), 14 транспортных РНК, шесть субъединиц НАДН-дегидрогеназы (субъединицы 1-4, 4L и 5), три субъединицы цитохром *c*-оксидазы (субъединицы 1-3), субъединицы 6 и 8



АТФ-азного комплекса и одну субъединицу убихинон-цитохром *c*-редуктазы (цитохрома *b*). Легкая цепь содержит гены 8 транспортных РНК и один белок-кодирующий ген – ген субъединицы 6 НАДН-дегидрогеназы. Таким образом, в митохондриальном геноме имеется информация о двух рибосомальных РНК, входящих в состав митохондриальных рибосом, двадцати двух транспортных РНК, принимающих участие в биосинтезе белков на митохондриальных рибосомах, и 13 структурных белках, которые входят в состав четырех (из пяти) дыхательных комплексов. Все остальные белки, необходимые для нормальной работы митохондрий, кодируются исключительно ядерными генами и синтезируются на цитоплазматических рибосомах (табл. 1). В связи с этим функционирование митохондрии происходит при постоянном диалоге между ее геномом и геномом ядра.

**Таблица 1**

Относительная автономность митохондриального генома.

<b>Компоненты митохондриальных систем</b>	<b>Кодируются митохондриальным геномом</b>	<b>Кодируются ядерным геномом</b>
Компоненты системы окислительного фосфорилирования		
НАДН-дегидрогеназа	7 субъединиц	>41 субъединицы
Сукцинат-убихинон-редуктаза	0 субъединиц	4 субъединицы
Убихинон-цитохром <i>c</i> -редуктаза	1 субъединица	10 субъединиц
Цитохром <i>c</i> -оксидаза	3 субъединицы	14 субъединиц
АТФ-синтетаза/АТФ-аза	2 субъединицы	
Компоненты системы биосинтеза белка		
Рибосомальные РНК	2	Нет
Транспортные РНК	22	Нет
Рибосомальные белки	Нет	Все (около 70 белков)
Компоненты других митохондриальных систем		
Другие митохондриальные белки	Нет	Все (например, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, транслоказы и др.)

Одна из отличительных особенностей митохондриального генома – его компактность. Примерно 93% митохондриальной ДНК является кодирующей, что обеспечивает очень высокую плотность генов – примерно 1 ген на 0,45 Кб. Все кодирующие последовательности рас-

положены прямо друг за другом, причем в ряде случаев они могут быть разделены лишь несколькими некодирующими нуклеотидами. Более того, два гена, кодирующих субъединицы 6 и 8 АТФ-азного комплекса, перекрываются (при этом они считываются с одной цепи в отличие от перекрывающихся ядерных генов). Встроенные последовательности, т. е. интроны, в митохондриальных генах отсутствуют.

Уникальным является и порядок расположения генов. Вслед за кодирующей последовательностью почти всегда находится ген транспортной РНК. Например, в тяжелой цепи гены идут в следующем порядке: транспортная РНК фенилаланина – ген 16S рибосомальной РНК – транспортная РНК валина – ген 23S рибосомальной РНК – транспортная РНК лейцина – ген субъединицы 1 НАДН-дегидрогеназы и т. д. Такой порядок расположения генов очень консервативен и характерен не только для митохондрий человека, но и других животных: дрожозилы, быка, птиц, рептилий и т. д.

Полностью некодирующей в митохондриальном геноме является только ДНК *D*-петли. Как уже говорилось, *D*-петля – это небольшой фрагмент ДНК размером 7S, который комплементарно спарен с *H*-цепью. В функциональном отношении ДНК *D*-петли обеспечивает инициацию репликации и транскрипции митохондриального генома. При удвоении митохондриальной ДНК первой начинает реплицироваться тяжелая цепь. Инициация этого процесса происходит в области *D*-петли, а синтез дочерней *H*-цепи идет по *L*-цепи как матрице. Легкая цепь начинает реплицироваться только после того, как тяжелая цепь удвоилась примерно на две трети. Синтез *L*-цепи идет в направлении, обратном синтезу дочерней *H*-цепи, при этом матрицей является исходная тяжелая цепь. При транскрипции считыванию подвергаются обе цепи митохондриальной ДНК, причем этот процесс идет в двух противоположных направлениях. В отличие от ядерных генов, которые считываются независимо друг от друга, информация с митохондриальных генов переписывается на единый мультигенный транскрипт. В последующем зрелые молекулы РНК получают путем разрезания этого мультигенного транскрипта.

### 1.1.2 Митохондриальный генетический код

Митохондриальный генетический код обладает несколькими особенностями, которые отличают его от ядерного. Первая такая особенность была обнаружена в 1979 году, когда было установлено, что в митохондриях нарушается универсальность генетического кода. Так, в митохондриях человека кодон АУА кодирует аминокислоту метионин вместо изолейцина в стандартном коде. Кодоны АГА и АГГ, в стандартном коде кодирующие аргинин, являются стоп-кодонами, а кодон УГА, в стандартном коде являющийся стоп-кодоном, кодирует триптофан. Кроме того, несколько митохондриальных генов (например, ген, кодирующий субъединицу 6 АТФ-азы) вообще не имеют стоп-кодонов, а терминирующий кодон УАА вставляется в соответствующую РНК только на этапе сплайсинга.

Другая необычная черта митохондриального генетического кода – особенность узнавания кодонов транспортными РНК. Для цитоплазматических рибосом необходимо не менее 32 различных транспортных РНК, чтобы распознать все смысловые кодоны. Восемь же митохондриальных тРНК человека способны распознать по семейству из четырех кодонов, которые различаются между собой только по третьему основанию. Остальные четырнадцать митохондриальных тРНК имеют антикодоны, распознающие пары кодонов, которые идентичны между собой по первым двум основаниям, а в качестве третьего имеют либо пурин, либо пиримидин. Таким образом, 22 транспортные РНК митохондрий человека распознают 60 кодонов ( $[8 \times 4] + [14 \times 2]$ ). Оставшиеся четыре кодона (УАГ, УАА, АГА и АГГ) не могут быть распознаны тРНК и функционируют как стоп-кодона.

## **1.2. Структурно-функциональная организация ядерного генома человека**

ДНК ядерного генома составляет примерно 99% от всего количества клеточной ДНК. В каждой диплоидной соматической клетке человека с 46 хромосомами содержится около 6 пг ДНК, а общая длина гаплоидного набора из 23 хромосом составляет по разным оценкам от  $3,2 \times 10^9$  до  $3,5 \times 10^9$  пар нуклеотидов. В среднем на одну хромосому приходится примерно 130 Мб ДНК, но в пределах кариотипа эта величина колеблется от 55 Мб (21-я пара хромосом) до 250 Мб (1-я пара хромосом).

### **1.2.1. Гены и геноподобные последовательности**

### 1.2.1.1. Кодирующая ДНК

Формальная (классическая) генетика определяет ген как структурно-функциональную единицу наследственной информации, которая занимает определенное положение (локус) на хромосоме и мутационные изменения которой приводят к изменению фенотипа. Это определение не лишено недостатков, поскольку не учитывает ряд особенностей структурно-функциональной организации генов. Так, разные мутации одного и того же гена могут приводить не только к одинаковому изменению фенотипа, но и к совершенно разным изменениям, вплоть до комплементарных. Кроме того, установлено, что одна и та же последовательность ДНК благодаря альтернативному сплайсингу может кодировать несколько различных белков, а в крупных интронах ряда генов обнаружены смысловые последовательности других генов, считываемые в противоположном направлении. Более того, транскрипционные единицы генома могут перекрываться за счет наличия разных промоторов. Наконец, благодаря соматической рекомбинации структура транскрибируемых последовательностей некоторых генов может быть различной в разных клонах клеток одного и того же клеточного типа (как, например, в случае с геном антигенспецифического рецептора Т клеток).

Уточненное определение понятия "ген" дает нам молекулярная биология. В молекулярной биологии ген – это ассоциированный с регуляторными последовательностями фрагмент ДНК, соответствующий определенной единице транскрипции. Однако и здесь мы сталкиваемся со сложностями, связанными в первую очередь с регуляторными последовательностями. Так, можно задать вполне закономерный вопрос: "Как далеко от гена могут располагаться эти последовательности, чтобы их можно было включить в структуру гена?"

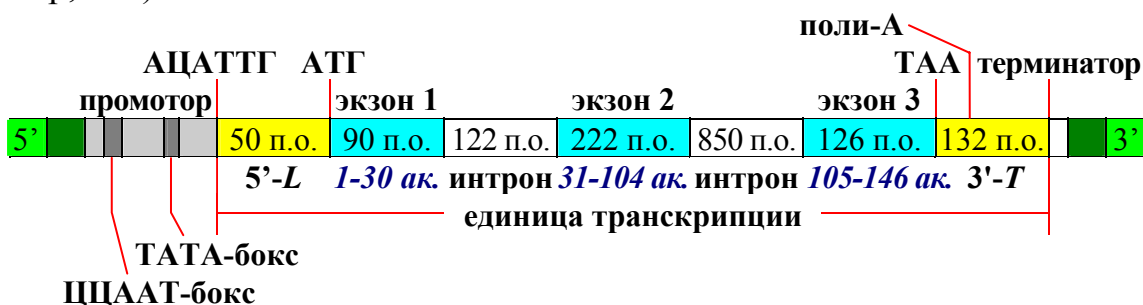
Кроме приведенного выше определения в ряде случаев целесообразно использовать введенное в последнее время молекулярными биологами понятие "считываемый ген". Считываемый ген – это отдельная транскрибируемая единица ДНК или ее часть, которая может транслироваться в одну или несколько взаимосвязанных аминокислотных последовательностей. С учетом этого последовательность, дающую два транскрипта за счет альтернативного сплайсинга и, как следствие, два разных белка, можно принимать за один ген. Однако, если степень гомологии двух генетических продуктов, имеющих общий транскрибируемый участок, невелика, то эти последовательности

следует расценивать как два разных гена. В целом же необходимо признать, что, по-видимому, ни одно из существующих определений понятия "ген" не может быть полностью исчерпывающим и не может быть приемлемым во всех случаях.

### Строение ядерных генов человека.

Как уже говорилось, ген – это совокупность сегментов ДНК, которые вместе составляют считываемую единицу, обуславливающую образование специфического функционального продукта – либо молекулы РНК, либо полипептида. К сегментам ДНК, составляющим ген, относятся: единица транскрипции, промотор, левые и правые регуляторные элементы.

Все перечисленные выше структурные компоненты ядерного гена человека представлены на рисунке 3 (на примере гена, кодирующего белок  $\beta$ -глобин). В соответствии с общепринятым соглашением, по которому транскрипция идет слева направо, начало гена на этом рисунке находится слева (5'-конец), а конец - справа (3'-конец). Положение первого нуклеотида транскрипта обозначают числом +1, а нуклеотидов, расположенных справа от него (т. е. внутри единицы транскрипции), соответствующими положительными цифрами (например, +16). Нуклеотиды, находящиеся слева от +1 (нетранскрибируемые последовательности), обозначаются отрицательными числами (например, -25).



#### Условные обозначения:

- 5'-L – 5'-лидерная область;
- 3'-T – 3'-трейлерная область;
- – левые и правые регуляторные элементы;
- п.о. – пара азотистых оснований;
- ак. – аминокислота.

Рис. 3. Схема строения  $\beta$ -глобинового гена человека.

**Единица транскрипции.** В состав транскрипционной единицы входят 5'-лидерная последовательность, кодирующая последователь-

ность, интроны, 3'-трейлерная последовательность и промежуточные последовательности (спейсеры). Транскрипция гена начинается с 5'-конца, где расположен сайт инициации транскрипции. Определенной гомологии между стартовыми сайтами разных генов не наблюдается, но чаще всего они начинаются с нуклеотида А, окруженного пиримидиновыми основаниями. Так, у взятого в качестве примера  $\beta$ -глобинового гена сайтом начала транскрипции является последовательность АЦАТГГ. Этой последовательностью начинается 5'-лидерная последовательность, которая предшествует кодирующей последовательности большинства белок-кодирующих генов. Функция 5'-лидерной последовательности окончательно не установлена. Известно только, что у генов класса II она подвергается кэпированию, а в некоторых случаях в 5'-лидерную область входят последовательности, обеспечивающие дополнительный контроль транскрипции и трансляции.

Кодирующая область большинства транскрипционных единиц генома человека имеет прерывистое или мозаичное строение: кодирующие последовательности, или экзоны, разделены между собой вставочными некодирующими последовательностями, или интронами. Количество экзонов, приходящихся на один ген, как правило, коррелирует с размером самого гена (табл. 2). Так, ген инсулина, размер которого равен 1,4 Кб, имеет всего три экзона, а ген коллагена VII типа, длина которого 31 Кб, содержит 118 экзонов. Размер же экзонов мало зависит от длины гена и в среднем равен 170 парам оснований. Однако и здесь возможны вариации (см. табл. 2). Например, известны очень длинные экзоны: экзон 11 гена *BRCA1* рака молочной железы имеет длину 3,4 Кб, а экзон 26 гена *apoB* – 7,6 Кб. Почти всегда первый экзон начинается триплетом АТГ (или АТА), который в будущем транскрипте будет сайтом инициации трансляции и соответствует метионину, а последний экзон заканчивается стоп-кодоном трансляции (ТАА, ТАГ или ТГА). На границах между экзонами и интронами имеются консервативные канонические последовательности, играющие существенную роль в обеспечении точности вырезания интронов во время сплайсинга РНК.

Таблица 2

Количество и размер экзонов и интронов в некоторых генах человека.

Генный продукт	Размер гена (Кб)	Количество экзонов	Средний размер экзонов (Кб)	Количество интронов	Средний размер интронов (Кб)
тРНК <sup>Тир</sup>	0,1	2	0,05	1	0,02
Инсулин	1,4	3	0,155	2	0,48
β-Глобин	1,6	3	0,15	2	0,49
Сывороточный альбумин	18	14	0,137	13	1,1
Коллаген VII типа	31	118	0,077	117	0,19
Комплемент С3	41	29	0,122	28	0,9
Фенилаланин гидроксилаза	90	26	0,096	25	3,5
Фактор VIII	186	26	0,375	25	7,1
Дистрофин	2400	79	0,18	78	30,0

Вопреки существующему ранее мнению, согласно которому транскрипция гена прекращается сразу же после считывания стоп-кодона, в последнее время было установлено, что за терминирующим трансляцию триплетом находится еще довольно протяженный фрагмент считываемой ДНК. Этот нетранслируемый фрагмент транскрипционной единицы был назван 3'-трейлерной последовательностью. Ее протяженность может быть, по-видимому, различной, но в любом случае она завершается небольшой высококонсервативной последовательностью, терминирующей транскрипцию. Так, при синтезе про-рРНК человека сигналом терминации транскрипции служит последовательность 5'-ГГГТТГАЦЦА-3'. Кроме терминатора транскрипции в состав 3'-трейлера многих генов класса II входит сайт полиаденилирования - поли(А)-сигнальная последовательность (ААТААА), участвующая в процессе модификации первичного РНК-транскрипта и ответственная за альтернативный сплайсинг матричной РНК (мРНК).

Наконец, в состав транскрипционной единицы могут входить спейсеры – промежуточные последовательности ДНК, которые удаляются в ходе процессинга первичных транскриптов генов. Функциональное значение таких фрагментов ДНК остается неизвестным.

**Промотор.** Промотор – это специальная регуляторная последовательность гена размером около 75 пар оснований, которая локализована, как правило, в его 5'-фланкирующей области и обеспечивает точное взаимодействие РНК-полимеразы с молекулой ДНК перед на-

чалом транскрипции. Промоторные области различных генов довольно разнообразны по своему нуклеотидному составу. Однако почти для всех промоторов характерно наличие консервативной последовательности из 7 оснований на расстоянии 19-27 нуклеотидов от сайта инициации транскрипции. Это так называемый ТАТА-бокс (блок Хогнеса), обеспечивающий корректное расположение РНК-полимеразы по отношению к стартовому сайту. На расстоянии 70-80 пар оснований в направлении 5'-конца от начала транскрипции часто расположена другая консервативная последовательность из 9 нуклеотидов – ЦЦААТ-бокс, контролирующий начальное связывание РНК-полимеразы. Помимо ТАТА- и ЦЦААТ-боксов в состав промоторов может входить еще целый ряд регуляторных элементов. К таковым относятся консервативная октамерная последовательность 5'-АТГСАААТ-3' (октамер), каноническая гептамерная последовательность 5'-ЦТЦАТГА-3' (гептамер) и описываемые ниже ЦГ-островки.

***Левые и правые регуляторные элементы.*** Промотор не является единственной последовательностью, регулирующей работу гена. К дополнительным элементам, контролирующим экспрессию генов, относятся энхансеры, сайленсеры и аттенюаторы. Энхансер, или усилитель, - это группа коротких (200-300 пар оснований) последовательностей, которые, взаимодействуя с регуляторными белками (убиквитиновыми и/или тканеспецифическими транскрипционными факторами), способны повышать эффективность работы промотора или РНК-полимеразы, и, тем самым, увеличивать транскрипционную активность гена. В отличие от промотора, функционирование энхансера не зависит от его ориентации и удаления по отношению к точке начала транскрипции. Так, у некоторых генов обнаружены энхансеры, которые находятся на значительном расстоянии (до 1000 пар нуклеотидов) от промотора или транскрипционной единицы, при этом они могут располагаться как с 5'- так и с 3'-конца гена. Сайленсеры – это негативные регуляторные элементы, подавляющие транскрипционную активность гена. Сайленсеры располагаются, как правило, перед промотором или после него, а так же внутри интронов. К сожалению, механизм работы этих регуляторных элементов не достаточно изучен. То же самое можно сказать и о третьем дополнительном элементе контроля экспрессии генов – аттенюаторе. Аттенюатор, или ослабитель, – это последовательность, лежащая между сайтом инициации транскрипции и кодирующей областью гена. Она способна блокировать



продвижение РНК-полимеразы, обеспечивая тем самым снижение транскрипционной активности гена.

#### **Количество ядерных генов у человека.**

Считается, что средний размер гена человека равен  $1-3 \times 10^4$  пар оснований. Однако эта величина может колебаться от нескольких десятков до миллионов пар нуклеотидов. Например, согласно последним данным, самый маленький из известных генов человека – МСС-7, – имеет размер всего в 21 пару оснований, а самый большой – ген дистрофина, – 2,2 миллиона пар оснований. Тем не менее, исходя из среднего размера одного гена ( $1-3 \times 10^4$  пар оснований) и размера ядерного генома ( $3,2-3,5 \times 10^9$  пар оснований), общее число ядерных генов у человека должно быть от 107-117 тысяч до 320-350 тысяч. Полученная с помощью таких простых теоретических расчетов величина общего числа генов оказывается несколько выше того значения, которое может быть установлено другими методами (табл. 3). Так, путем экстраполяции данных по секвенированию отдельных крупных хромосомных регионов можно предположить, что ядерный геном человека содержит около 70 тысяч генов. Это предположение основано на том, что плотность генов в так называемых ген-обогащенных хромосомных регионах (например, в коротком плече 6-й хромосомы, содержащем гены главного комплекса гистосовместимости человека) достигает одного гена на 20 Кб в отличие от бедных генами регионов, где эта величина на порядок ниже. При этом допускается, что соотношение богатых и бедных генами хромосомных регионов примерно равно единице.

**Таблица 3**

Количество ядерных генов у человека.

<b>Метод оценки количества генов</b>	<b>Примерное количество генов</b>
Теоретический расчет	От 107-117 до 320-350 тысяч
Секвенирование генома	Примерно 70-71 тысяча
Реассоциация РНК	От 20 до 97 тысяч
Транскрибируемый геном	Примерно 20 тысяч
ЦГ-островки	От 67 до 80 тысяч
EST-анализ	Примерно 64-65 тысяч

Методом анализа кинетики реассоциации РНК в культуре клеток число генов оценивается между 20 и 40 тысячами, хотя в некоторых клетках, например, в клетках мозга, количество различных мРНК мо-

жет достигать 97 тысяч. Подсчет же генов по доле транскрибируемой части генома, которая равна примерно 12%, дает и вовсе маленькую величину – порядка 20 тысяч генов.

Однако наиболее точно число ядерных генов человека можно установить с помощью подсчета числа ЦГ-островков и маркерных экспрессирующихся последовательностей. ЦГ-островок – это кластер неметилированных ЦГ-динуклеотидов и Г/Ц-боксов размером от 500 до 2000 пар оснований, который, как правило, располагается в области начала транскрипции гена. Подсчитать общее количество таких островков можно с помощью эндонуклеазы *HpaII*, которая специфически распознает неметилированную последовательность 5'-ЦЦГГ-3'. Согласно последним данным, общее количество ЦГ-островков в геноме человека равно примерно 45 тысячам. Если учесть, что с ЦГ-островками ассоциированы не все гены, а порядка 50%, то общее число ядерных генов должно быть от 67 до 80 тысяч.

Несколько меньшую величину числа генов дает метод учета маркерных экспрессирующихся последовательностей (*EST*-анализ, от англ. expressed sequence tags analysis). Под маркерной экспрессирующейся последовательностью подразумевается короткий секвенированный фрагмент ДНК, изолированный из библиотеки комплементарной ДНК (кДНК) генов. По данным *EST*-анализа в ядерном геноме человека насчитывается около 64-65 тысяч генов.

Таким образом, обобщая все выше сказанное, можно сделать вывод, что в геноме человека содержится, в среднем, около 70-80 тысяч генов. В общей сложности, учитывая размер генома, средний размер генов, их общее число, а также средний размер экзонов и их среднее количество на ген, кодирующей является всего лишь 3% ядерной ДНК.

#### **Классификация ядерных генов человека.**

В зависимости от того, какой принцип положен в основу той или иной классификации, все ядерные гены человека могут быть классифицированы несколькими способами (табл. 4). Во-первых, по функциональному назначению гены можно разделить на три класса. К классу I относятся гены 5,8S-, 18S- и 28S-рРНК, которые транскрибируются РНК-полимеразой I. Ко второму классу относятся все белок-кодирующие гены, а так же все U-РНК (за исключением U6-РНК), входящие в состав малых ядерных рибонуклеопротеинов. Гены класса II транскрибируются с помощью РНК-полимеразы II. Наконец, к третьему функциональному классу относятся гены, кодирующие низкомолекулярные РНК, которые участвуют в синтезе белков (тРНК и

5S-рРНК), их внутриклеточном транспорте (7SL-РНК) и в посттранскрипционном процессинге (U6-РНК). Эти гены транскрибируются с помощью РНК-полимеразы III. Во-вторых, по характеру экспрессии

Таблица 4

Классификация ядерных генов человека.

Принцип, положенный в основу классификации	Класс генов	Примеры
Функция	Класс I	Гены, кодирующие 5,8S-, 18S- и 28S-рРНК
	Класс II	Все белок-кодирующие гены, все U-РНК (за исключением U6-РНК)
	Класс III	Все тРНК, 5S-рРНК, 7SL-РНК и U6-РНК
Характер экспрессии	Гены "домашнего хозяйства"	Все гены, обеспечивающие нормальное функционирование любого типа клеток
	Тканеспецифические гены	Все гены, функционально активные только в определенных типах клеток (тканей) и только на определенных стадиях онтогенеза

ядерные гены человека могут быть разделены на две группы. К первой группе относятся гены "домашнего хозяйства" (от англ. housekeeping genes), продукты которых необходимы для обеспечения жизнедеятельности любого типа клеток. Ко второй группе относятся тканеспецифические гены (гены "роскоши"), обеспечивающие специализированные функции клеток, т. е. гены, функционально активные только в определенных типах клеток (тканей) и только на определенных стадиях онтогенеза, так называемые гены терминальной дифференцировки.

#### **Геномная организация ядерных генов человека.**

К сожалению, единой системы геномной организации ядерных генов человека до их пор не разработано. Однако установлено, что существует, по крайней мере, четыре способов организации генов в хромосомах: частичное перекрытие нескольких генов, расположение одних генов внутри других и организация гомологичных неаллельных генов в мульти- и супергенные семейства.

**Частично перекрывающиеся гены.** В отличие от геномов сложно организованных многоклеточных организмов геномы микроорганизмов характеризуются высокой средней плотностью распределения ге-

нов. Так, например, у *E. coli*, *S. cerevisiae* и *C. elegans* один ген приходится на 1, 2 и 5 Кб генома, соответственно. Такая высокая плотность генов достигается не только благодаря практически полному отсутствию спейсерных межгенных фрагментов ДНК, но и за счет частичного перекрывания некоторых генов. При этом частично перекрывающиеся гены у таких организмов транскрибируются с одной и той же смысловой цепочки ДНК, но имеют разные рамки считывания. Аналогичный пример частично перекрывающихся генов у человека уже рассматривался ранее, когда речь шла о митохондриальных генах, кодирующих субъединицы 6 и 8 АТФ-азы. Что касается ядерного генома, то на сегодняшний момент известно относительно немного таких частично перекрывающихся генов у человека. Классический пример – некоторые гены, входящие в состав так называемого *HLA*-региона (более подробно см. "*Мультигенные семейства*"). В отличие от перекрывающихся митохондриальных генов человека и генов микроорганизмов, частично перекрывающиеся гены *HLA*-региона считываются с разных цепей ДНК в противоположных направлениях. Такой механизм перекрывания является общим для всех частично перекрывающихся ядерных генов человека. В завершение следует отметить, что вероятность перекрывания ядерных генов у человека возрастает при увеличении средней плотности генов, наблюдаемом в некоторых хромосомных регионах.

**Гены внутри других генов.** Как известно, гены такого сложного генома как ядерный геном человека содержат интроны, причем часто очень протяженные. Недавно было обнаружено, что в некоторых случаях такого рода большие интроны могут включать целиком небольшие гены. Так, интрон 26 гена *NF1* (ген нейрофиброматоза I типа) имеет протяженность около 40 Кб и содержит три небольших гена: *OGMP* (ген миелинового гликопротеина олигодендроцитов), *EVI2A* и *EVI2B* (человеческие гомологи мышечных генов, участвующих в лейкогенезе). Каждый из этих генов имеет по два экзона и по одному интрону, причем считываются они с антисмысловой по отношению к гену *NF1* цепи ДНК (рис. 4).

Ген *F8* (ген VIII фактора свертывания крови) также является примером нахождения одних генов внутри другого. Аналогично интрону 26 гена *NF1* интрон 22 гена *F8* содержит два внутренних гена: ген *F8A* и ген *F8B*. Эти гены считываются в направлении, противоположном направлению транскрипции гена *F8*.

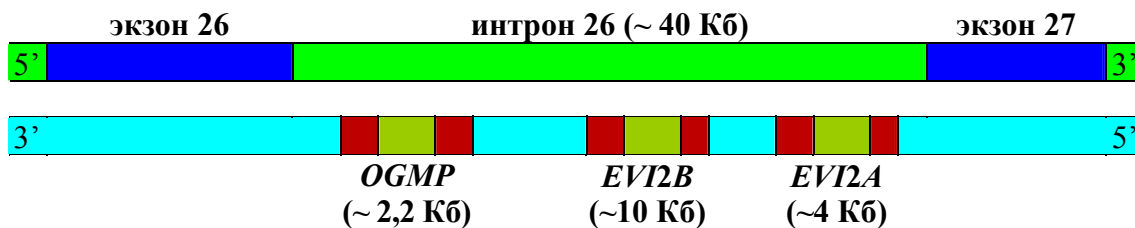


Рис. 4. Гены внутри гена *NF1*.

**Мультигенные семейства.** Мультигенное семейство – это совокупность неаллельных генов, псевдогенов, усеченных генов и генных фрагментов, которые имеют высокую степень гомологии между собой и общее эволюционное происхождение. Принадлежность вновь идентифицированного генетического локуса к тому или иному мультигенному семейству может определяться по сходству либо его полной нуклеотидной последовательности с уже известными последовательностями, либо нуклеотидных последовательностей отдельных регионов этого локуса с регионами других локусов, либо по функциональному сходству белковых продуктов. Первый подход является классическим и наиболее простым, однако, в ряде случаев он не позволяет идентифицировать нового члена мультигенного семейства не смотря на его принадлежность к этому семейству. Действительно, члены некоторых мультигенных семейств схожи между собой только по строго специфичным высококонсервативным регионам, в то время как гомологии по всей длине может и не быть. Как правило, это семейства генов, которые кодируют белки с высококонсервативными функциональными доменами. Классическим примером такого мультигенного семейства является семейство *PAX* генов (семейство генов, кодирующих транскрипционные факторы со спаренным блоком ДНК-связывающих последовательностей). Кроме того, известны семейства генов, члены которых между собой не гомологичны на уровне ДНК, но кодируют функционально схожие белковые продукты. Причем такие белки содержат очень короткие высококонсервативные последовательности, которые критичны для выполнения белком его функциональной нагрузки. В качестве примера такого мультигенного семейства можно взять семейство генов, содержащих *DEAD*-блок. В состав этого семейства входят разные гены, однако, все они кодируют РНК-хеликазы. Отличительной особенностью РНК-хеликаз является наличие у них восьми высококонсервативных аминокислотных последовательностей, включая и *DEAD*-блок (последовательность Асп-Глу-Ала-Асп).

Сравнительный анализ известных мультигенных семейств человека показал, что они могут различаться по количеству членов семейства, степени гомологии отдельных его членов между собой, локализации семейства на хромосоме (-ах), функциональной активности и эволюционному происхождению. Количество членов, входящих в состав того или иного мультигенного семейства, действительно варьирует в очень широких пределах: от 3 в случае кластера генов рРНК до 100 членов в случае генов белков-гистонов (табл. 5). В широких пределах может варьировать и степень гомологии между отдельными членами семейства. Как правило, между активно работающими генами одного и того же мультигенного семейства наблюдается более высокая степень гомологии, чем между слабо- или неактивными членами. Так, очень высокая степень гомологии отмечена для гистоновых генов и генов рибосомальных РНК, в то время как нефункциональные псевдогены могут накапливать мутации и быстро дивергировать с другими членами семейства.

По характеру расположения отдельных своих членов на хромосомах все мультигенные семейства делятся на два больших класса: диспергированные (рассеянные) и сцепленные (кластеризованные) мультигенные семейства (см. табл. 5). Диспергированные мультигенные семейства представлены генами и геноподобными последовательностями, которые, как правило, не организованы в кластеры, а рассеяны по всему геному. Установлено, что в состав таких мультигенных семейств входит очень много белок-кодирующих генов, включая гены регуляторных белков, ферментов, структурных белков и т. д. В некоторых случаях диспергированные мультигенные семейства представлены только несколькими членами, большинство (или все) из которых активны и кодируют функционально схожие продукты (например, семейство генов *PAX*). Однако в большинстве своем рассеянные мультигенные семейства включают всего один или несколько работающих генов и множество процессированных псевдогенов (например, семейство генов актина). Кроме того, известны примеры диспергированных мультигенных семейств, куда входят наряду с нормально функционирующими мозаичными генами одна или более копий процессированных генов, которые лишены интронов, но остаются транскрипционно активными. При этом в ряде случаев остается не понятным эволюционное (селективное) преимущество существования множества дополнительных копий функционально активного гена.

Таблица 5

Некоторые мультигенные семейства человека.

Мультигенное семейство	Количество членов	Особенности организации	Локализация на хромосоме
1	2	3	4
Диспергированные мультигенные семейства			
Альдолаза	5	Семейство состоит из 3 функционирующих генов и 2 псевдогенов, локализованных на 5 разных хромосомах	Нет данных
<i>PAX</i>	9	Семейство содержит 9 генов, 8 из которых функционируют	Нет данных
Тяжелая цепь ферритина	>15	Семейство включает много процессированных псевдогенов. Функционально активным является 1 ген, локализованный на 11 хромосоме	11q
Глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа	>18	Семейство содержит один функционирующий ген и много процессированных псевдогенов	12p
Актин	>20	Семейство содержит 4 функционирующих гена и много процессированных псевдогенов	1p, 15q
Сцепленные мультигенные семейства			
Кластер генов гормона роста	5	Кластер содержит 1 непроцессированный псевдоген. Общая длина кластера ~67 Кб	17q22-24
$\alpha$ -Глобиновый кластер генов	7	Кластер содержит 3 непроцессированных псевдогена и 4 работающих гена, функция одного из которых не известна. Общая длина кластера ~50 Кб	16p13.3
$\beta$ -Глобиновый кластер генов	6	Кластер содержит 5 работающих генов и 1 непроцессированный псевдоген. Общая длина кластера ~60 Кб	11p
Гены рРНК	3	Единицы транскрипции рДНК образуют кластеры из длинных tandemных повторов. Общее число таких кластеров равно примерно 150-200 копиям на гаплоидный геном.	13, 14, 15, 21, 22

Таблица 5 (продолжение)

1	2	3	4
Гены <i>HLA</i> класса I	17	Гены организованы в кластер, общая длина которого равна 2,2 Мб. Кластер содержит 4 непроцессированных псевдогена, 6 работающих генов и 7 генных фрагментов.	6p21.3
Гены <i>HLA</i> класса II	22	Гены собраны в кластер размером 2 Мб. В состав этого кластера входит 18 функционирующих генов и 4 псевдогена.	6p21.2
Гены <i>HLA</i> класса III	21	Гены организованы в кластер, общая протяженность которого равна примерно 2 Мб. В кластере обнаружено более 20 локусов. По меньшей мере, половина этих локусов активно функционирует.	6p21.3
Гены <i>HOX</i>	38	Семейство организовано в 4 кластера	2p, 7, 12, 17
Гены гистонов	100	Семейство организовано в несколько кластеров, которые находятся на 3-х разных хромосомах	1p21, 6, 12q

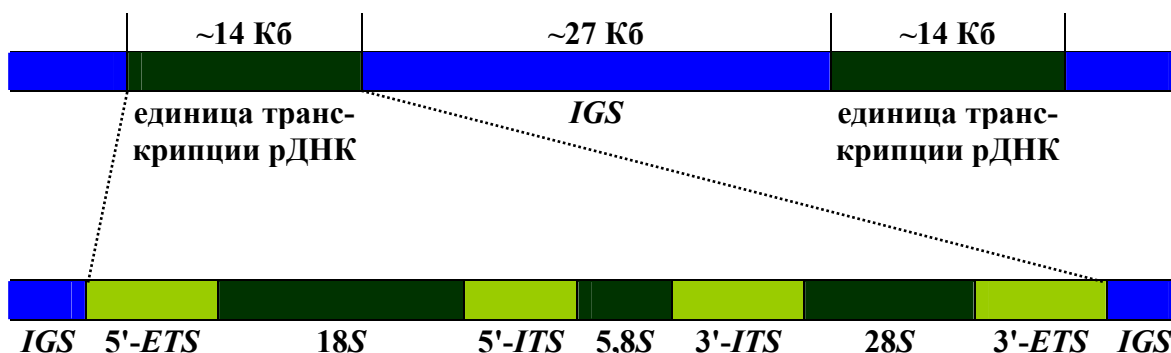
К сожалению, не ясен и вопрос происхождения рассеянных мультигенных семейств. Рассматривается, по меньшей мере, два вероятных механизма эволюции таких структур. Согласно одной из гипотез диспергированные мультигенные семейства могли возникать путем простой дупликации исходного гена. Согласно же другой точке зрения множество функциональных и неработающих копий исходного гена могло возникнуть вследствие ретротранспозиции. Такое предположение имеет несколько подтверждений. Во-первых, как уже говорилось, в составе многих рассеянных мультигенных семейств обнаружены процессированные псевдогены и даже активно работающие процессированные гены. Во-вторых, большинство работающих процессированных генов из таких семейств принадлежит к классу III, т. е. классу генов, которые транскрибируются с помощью РНК-полимеразы III. Отметим, что транскрипты РНК-полимеразы III в отличие от транскриптов РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы II часто содержат внутренние промоторы. Следовательно, после ретротранспозиции такие фрагменты ДНК будут функционально активны. Наконец, в третьих, некоторые процессированные псевдогены по-



мимо фрагмента кодирующей части гена на одном из своих концов имеют олиго-А/олиго-Т-последовательность. Это также является подтверждением РНК-опосредованной транспозиции данного участка ДНК.

Сцепленные мультигенные семейства включают от одного и более кластеров генов, которые локализованы в специфических регионах одной или нескольких хромосом. Чаще всего такие кластеры возникают путем последовательной дупликации одного и того же исходного гена и, как правило, содержат нефункциональные псевдогены. Более подробно особенности строения и функционирования сцепленных мультигенных семейств целесообразно рассмотреть на нескольких конкретных примерах – на примерах организации рибосомальных генов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов и генов *HLA*.

*Организация рибосомальных генов человека.* У человека известно четыре вида рибосомальной РНК: 5S, 5,8S, 18S и 28S рРНК. В ядерном геноме единицы транскрипции рибосомальной ДНК (рДНК) образуют кластеры из длинных tandemных повторов (рис. 5). Эти кластеры локализованы в области так называемого ядрышкового организатора на коротком плече каждой из пяти акроцентрических хромосом человека: 13, 14, 15, 21 и 22. Общее число таких кластеров равно примерно 150-200 копиям на гаплоидный геном.



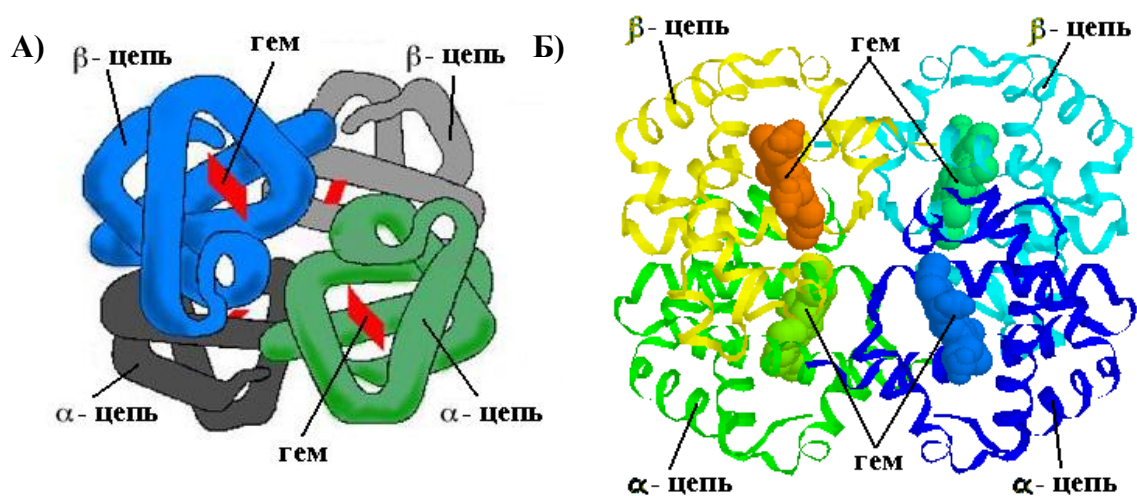
**Рис. 5.** Организация рибосомальных генов человека

Каждая единица транскрипции рибосомальной ДНК размером ~14 Кб содержит информацию о 28S, 5,8S и 18S рРНК (см. рис. 5). Три рРНК-кодирующие последовательности фланкируются и разграничиваются промежуточными транскрибируемыми сегментами. Они называются соответственно внешними (5'- и 3'-ETS, от англ. external transcribed spacer) и внутренними (5'- и 3'-ITS, от англ. internal transcribed spacer) транскрибируемыми спейсерами. Область между

тандемно повторяющимися единицами транскрипции протяженностью примерно 27 Кб называется межгенным спейсером (*IGS*, от англ. intergenic spacer). После завершения транскрипции эндонуклеазы расщепляют про-рРНК сначала на 5'-конце 5,8S-рРНК, а затем на 5'-конце 18S-рРНК и 3'-конце 28S-рРНК. В результате последовательных расщеплений под действием эндонуклеаз образуются три зрелые рРНК. Сегменты РНК, соответствующие транскрибируемому спейсеру, быстро разрушаются и не накапливаются в клетке. Расщепление, вероятно, происходит с очень высокой специфичностью, поскольку отсутствуют какие-либо указания на то, что для образования 5'- и 3'-концов зрелых рРНК требуются экзонуклеазы.

Четвертый тип рРНК, 5S рРНК, кодируется очень большим сцепленным мультигенным семейством, которое находится на длинном плече 1 хромосомы. Это семейство включает примерно 2000 копий гена 5S рРНК на гаплоидный геном. В общей сложности все гены рибосомальных РНК вместе со спейсерными участками занимают примерно 0,4% общего количества ДНК генома человека.

*Организация  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов человека.* Молекула гемоглобина человека состоит из двух пар глобиновых цепей, к каждой из которых в специфическом участке присоединяется молекула небелковой природы - гемогруппа, или гем (рис. 6). На сегодняшний день у человека обнаружено не менее 8-и видов нормальных глобиновых молекул ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma^A$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^{TA}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\zeta$ ), которые в той или иной степени различаются между собой по аминокислотному составу. Объединяясь попарно, они образуют несколько форм гемоглобина, взаимозаменяющих друг друга во время онтогенеза (табл. 6).



**Рис. 6.** Строение гемоглобина *A* человека. А) Схема. Б) Компьютерная модель.

Таблица 6

Гемоглобины человека.

Стадия развития	Тип гемоглобина	Структура
Эмбрион	<i>Gower I</i>	$\zeta_2\varepsilon_2$
	<i>Gower II</i>	$\alpha_2\varepsilon_2$
	<i>Portland I</i>	$\zeta_2\gamma_2$
Плод	<i>F</i>	$\alpha_2^G\gamma_2$
		$\alpha_2^A\gamma_2$
		$\alpha_2^{TA}\gamma_2$
Взрослый человек	<i>A</i>	$\alpha_2\beta_2$
	<i>A<sub>2</sub></i>	$\alpha_2\delta_2$

На протяжении первых 8-10 недель внутриутробного развития, когда эритропоэз идет в желточном мешке, эритроциты эмбриона содержат последовательно сменяющие друг друга три формы эмбрионального гемоглобина (рис. 7): гемоглобины *Gower I* и *Gower II* со структурой  $\zeta_2\varepsilon_2$  и  $\alpha_2\varepsilon_2$ , соответственно, и гемоглобин *Portland I*, структура которого отвечает формуле  $\zeta_2\gamma_2$ . Затем преобладающим становится fetalный гемоглобин, или гемоглобин *F*, который присутствует в эритроцитах плода вплоть до рождения ребенка. Время появления fetalного гемоглобина совпадает с периодом смены места эритропоэза: у плода эритроциты формируются не в желточном мешке, как у эмбриона, а в селезенке и печени. Отличительная особенность гемоглобина *F* – присутствие в его молекуле двух  $\alpha$ - и двух  $\gamma$ -глобиновых цепей. Следует отметить, что  $\gamma$ -цепи fetalного гемоглобина могут быть трех типов: с аланином ( $^A\gamma$ ) или глицином ( $^G\gamma$ ) в 136-м положении или треонином вместо изолейцина ( $^{TA}\gamma$ ) в 75-м положении. Гемоглобин *F* в небольшом количестве (менее 1%) присутствует и у новорожденных, но он очень быстро заменяется на гемоглобин *A*, или гемоглобин взрослых, который является преобладающим типом гемоглобина у детей и взрослых (см. рис. 7). В своем составе он имеет по две  $\alpha$ - и две  $\beta$ -глобиновые цепи. Кроме того, у всех взрослых есть небольшое количество (2-3%) гемоглобина *A<sub>2</sub>*, который вместо  $\beta$ -глобиновой цепи содержит  $\delta$ -цепь. И гемоглобин *A*, и гемоглобин *A<sub>2</sub>* синтезируются в эритроцитах, развитие которых преимущественно происходит уже в костном мозге, а не в селезенке или печени.

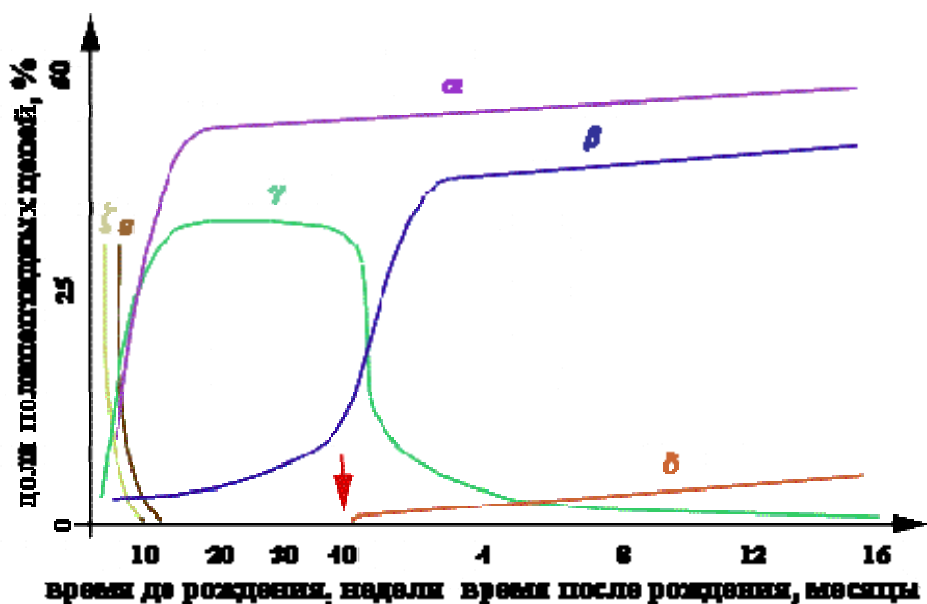
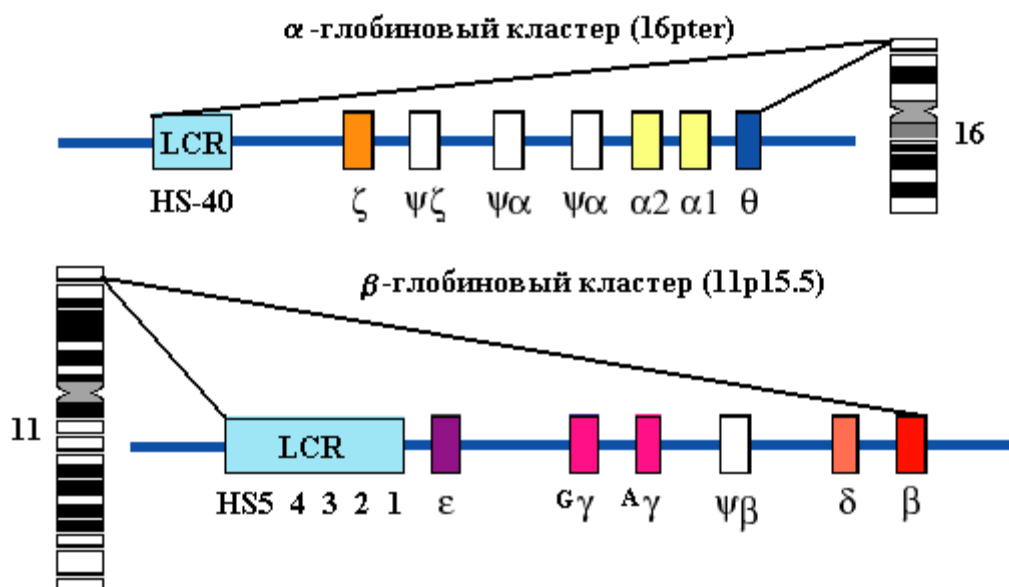


Рис. 7. Онтогенез цепей гемоглобина человека. Стрелкой отмечен момент рождения человека.

Аминокислотная последовательность каждой глобиновой цепи кодируется своим собственным геном. Все эти гены организованы в два кластера —  $\alpha$ - и  $\beta$ -кластеры (рис. 8).  $\alpha$ -Глобиновый кластер расположен на коротком плече 16-й хромосомы человека, занимает примерно 50 Кб и включает 4 работающих гена (ген  $\zeta$ -цепи, две идентичные копии гена  $\alpha$ -цепи и ген  $\theta$  с неизвестной функцией) и три нетранслируемых псевдогена ( $\psi_{\zeta}$ ,  $\psi_{\alpha 2}$  и  $\psi_{\alpha 1}$ ).  $\beta$ -Глобиновый кластер расположен на коротком плече 11-й хромосомы на участке длиной примерно 60 Кб. В состав  $\beta$ -кластера входит ген эмбриональной  $\epsilon$ -цепи, два гена фетальных  $\gamma$ -цепей ( $^A\gamma$  и  $^G\gamma$ ), псевдоген  $\beta$ -цепи, ген  $\delta$ -цепи и ген  $\beta$ -цепи.

Расположение генов в  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых кластерах соответствует тому порядку, в котором они экспрессируются во время развития организма. Координируют экспрессию индивидуальных генов того или иного кластера так называемые локус-контролирующие регионы, или *LCRs* (от англ. locus control regions) (см. рис. 8). *LCR*  $\alpha$ -глобинового кластера располагается на расстоянии примерно в 60 Кб перед  $\alpha$ -глобиновыми генами и содержит один сайт *HS-40*, гиперчувствительный к ДНК-азе I. *LCR*  $\beta$ -глобинового кластера содержит пять сайтов, гиперчувствительных к ДНК-азе I (*HS2*, *HS3*, *HS4* и *HS5*), которые образуют кластер размером 15 Кб на расстоянии примерно в 50-60 Кб перед  $\beta$ -глобиновыми генами. Любой из перечисленных сай-

тов имеет последовательности протяженностью 200-300 пар оснований, распознаваемые эритроид-специфическими транскрипционными факторами, и является эффективным энхансером.



**Условные обозначения:**

- HSs* – сайты, гиперчувствительные к ДНК-азе I;
- LCRs* – локус-контролирующие регионы;
- α, β, Aγ, Gγ, δ, ε, ζ, θ – гены соответствующих глобиновых цепей;
- ψα, ψβ, ψζ – псевдогены.

**Рис. 8.** Организация α- и β-кластеров глобиновых генов человека.

Кроме *LCRs* гиперчувствительные к ДНК-азе I сайты присутствуют и в промоторных областях глобиновых генов. Однако в отличие от таковых сайтов *LCRs*, активность которых постоянна, гиперчувствительные к ДНК-азе I сайты самих глобиновых генов обладают стадией-специфической активностью. Например, во время эритропоэза, протекающего в печени плода, промоторы двух γ-генов, а также β- и δ-генов, очень чувствительны к ДНК-азе I. Напротив, во время эритропоэза, протекающего в костном мозге, промоторы γ-генов становятся не чувствительными к ДНК-азе I и гены прекращают работу.

К сожалению, до сих пор окончательно не расшифрован механизм переключения экспрессии глобиновых генов в зависимости от стадии развития организма. Предполагается, что после взаимодействия эритроид-специфических транскрипционных факторов с ДНК-аза I-гиперчувствительными сайтами кластер-специфического

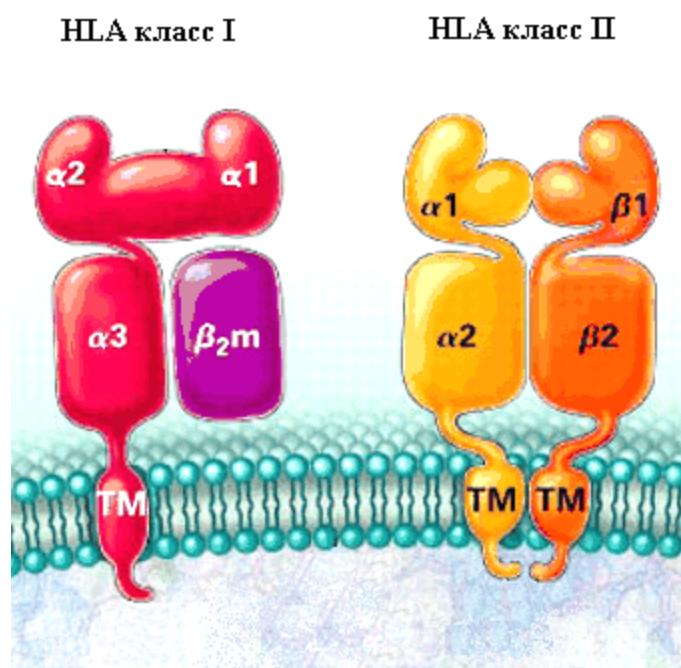
*LCR* конформационные изменения последнего передаются на область хроматина, соответствующую глобиновым генам, и переводят его в состояние активного хроматинового домена. Открытая конформация транскрипционно активного хроматинового домена становится при этом доступной для действия ДНК-азы I. Однако активироваться будут только те гены, промоторы которых находились в состоянии повышенной чувствительности к указанной нуклеазе (на что, по-видимому, может влиять характер метилирования соответствующих сайтов промоторов). С учетом действия сайленсеров правомочным будет предположение, что стадиоспецифическое переключение экспрессии глобиновых генов может обеспечиваться благодаря конкуренции между глобиновыми генами за взаимодействие с соответствующими *LCRs* и стадиоспецифической активацией ген-специфических сайленсерных элементов.

*Организация генов HLA.* Гены главного комплекса гистосовместимости человека (*HLA*, от англ. human leukocyte antigens) кодируют белки трех классов: два класса (класс I и класс II) антигенов гистосовместимости и один класс (класс III) белков, участвующих в различных иммунологических реакциях.

Антигены *HLA* класса I являются гетеродимерными белками, которые экспрессируются на всех клетках человеческого организма (за исключением эритроцитов и клеток хориотрофобласта). Основная функция этих молекул – презентация эндогенных пептидов  $CD8^+$  Т-клеткам. Каждая молекула *HLA* класса I состоит из одной тяжелой  $\alpha$ -цепи и одной легкой цепи  $\beta_2$ -микроглобулина (рис. 9). В свою очередь  $\alpha$ -цепь состоит из трех внеклеточных, одного трансмембранного и одного внутриклеточного (цитоплазматического) доменов. Из трех внеклеточных доменов  $\alpha$ -цепи два ( $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ ) являются переменными, а третий ( $\alpha_3$ ) – константным по строению. Молекула же  $\beta_2$ -микроглобулина содержит только один константный домен.

Антигены *HLA* класса II также являются гетеродимерными белками. Однако в отличие молекул первого класса белки *HLA* класса II состоят из двух тяжелых цепей – одной  $\alpha$ -цепи и одной  $\beta$ -цепи (рис. 9). Каждая из этих цепей построена по схожему с тяжелой цепью антигенов *HLA* класса I плану – имеет два внеклеточных домена (один переменный,  $\alpha_1$  или  $\beta_1$ , и один константный,  $\alpha_2$  или  $\beta_2$ ), один трансмембранный и один внутриклеточный домены. Молекулы *HLA* класса II экспрессируются только на антигенпрезентирующих клетках, таких как макрофа-

ги, дендритные клетки и др. При этом их основной задачей является презентация экзогенных пептидов  $CD4^+$  Т-клеткам.



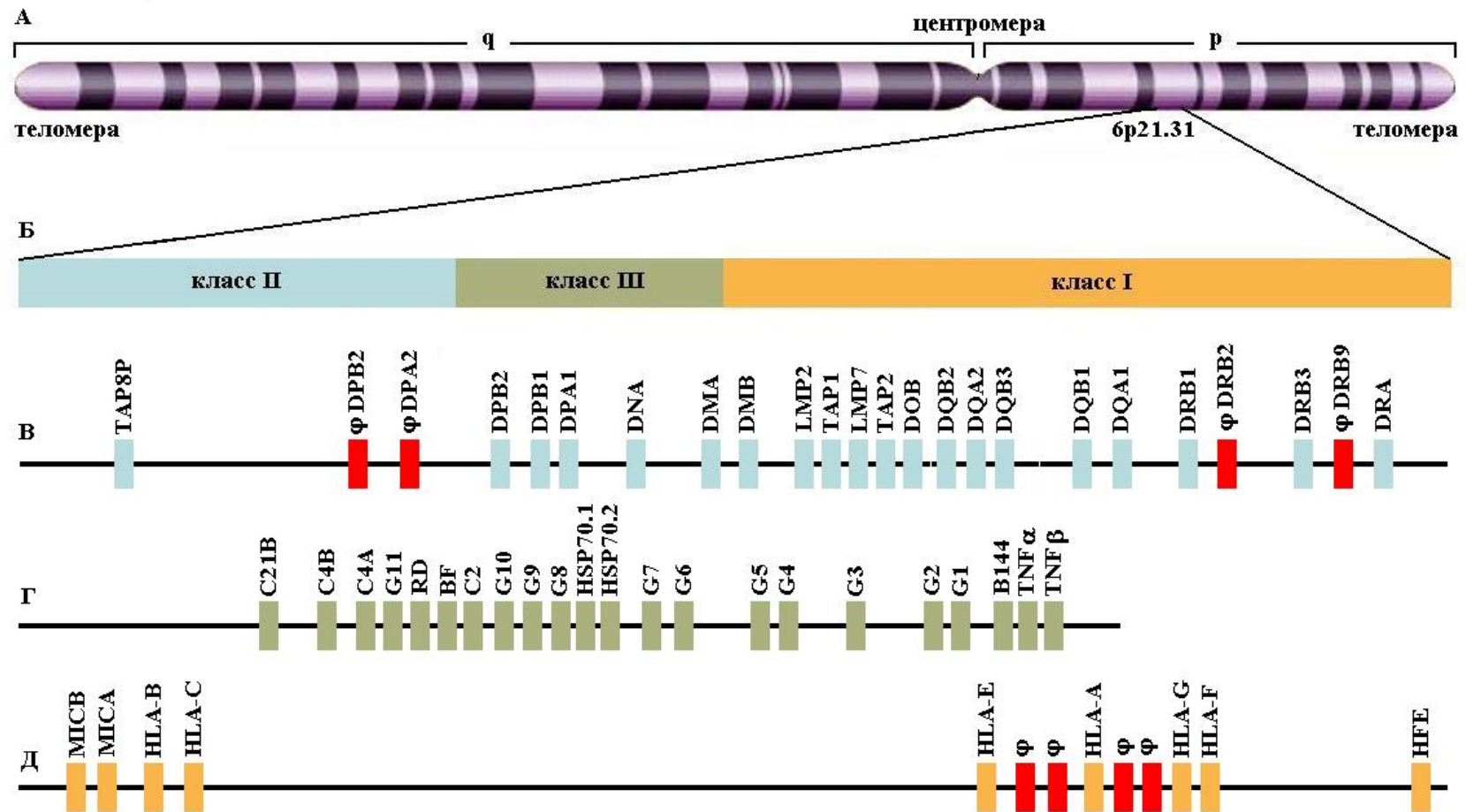
**Условные обозначения:**

- $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  и  $\alpha_3$  – внеклеточные домены  $\alpha$ -цепей;
- $\beta_2$ -m –  $\beta_2$ -микроглобулин;
- $\beta_1$  и  $\beta_2$  – внеклеточные домены  $\beta$ -цепи;
- TM – трансмембранные домены.

**Рис. 9.** Строение антигенов *HLA* класса I и класса II.

Молекулы *HLA* класса III к феномену гистосовместимости прямого отношения не имеют. Этот класс объединяет в основном белки, участвующие в регуляции иммунного ответа (например, фактор некроза опухолей- $\alpha$ ), а также обеспечивающие реакции гуморального иммунитета (компоненты комплемента C2 и C4). Более подробно об этих медиаторах, равно как и об антигенах *HLA* классов I и II, можно познакомиться в курсе клеточной и молекулярной иммунологии.

Все гены главного комплекса гистосовместимости человека локализованы на коротком плече 6-й хромосомы в так называемом *HLA*-регионе. Исключением является  $\beta_2$ -микроглобулин, ген которого не принадлежит к *HLA*-региону, а локализован на 11-й хромосоме. *HLA*-регион, общая протяженность которого около 7 Мб, состоит из трех генных кластеров (рис. 10).



**Рис. 10.** Организация *HLA*-региона. А) Хромосомная локализация *HLA*-региона. Б) Локализация кластеров генов *HLA* внутри *HLA*-региона. В) Организация кластера генов *HLA* класса II. Г) Организация кластера генов *HLA* класса III. Д) Организация кластера генов *HLA* класса I.



Кластер генов *HLA* класса I имеет общую протяженность 2,2 Мб и занимает область *p21.31* 6-й хромосомы, ближе к теломере. В его состав входит 9 работающих генов (*MICA*, *MICB*, *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G* и *HFE*), 4 полных непроцессированных псевдогена и много нефункциональных усеченных генов и/или генных фрагментов (см. рис. 10 и рис. 13).

Гены *HLA* класса II собраны в кластер размером 2 Мб, который занимает регион *p21.31* 6-й хромосомы, ближе к ее центромере. В состав этого кластера входит 13 функционирующих гена, кодирующих  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -цепи различных молекул *HLA* класса II (гены *DNA*, *DOB*, *DPA1*, *DPB1*, *DPB2*, *DQA1-A2*, *DQB1-B3*, *DRA*, *DRB1* и *DRB3*), 7 генов, продукты которых обеспечивают процессинг эндо- и экзогенных белков и их комплексообразование с молекулами *HLA* (гены *DMA*, *DMB*, *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2* и *TAP8P*) и 4 псевдогена.

Наконец, кластер генов *HLA* класса III располагается между двумя предыдущими кластерами в той же области *p21.13* 6-й хромосомы. Его общая протяженность равна примерно 2 Мб. В кластере обнаружено более 20 локусов. По меньшей мере, половина этих локусов активно функционирует. Наиболее интересными и важными из генов данного кластера являются гены компонентов комплемента *C2*, *C4A* и пропердинового фактора *B*, гены белка теплового шока *HSP70* и гены факторов некроза опухолей  $\alpha$  и  $\beta$ . В завершение следует отметить, что в каждой ядродержащей клетке из всего комплекса генов *HLA*-региона экспрессируются, как правило, гены, принадлежащие к классу генов "домашнего хозяйства" (например, гены *HLA* класса I) и часть тканеспецифических генов (например, ген фактора некроза опухолей- $\alpha$  экспрессируется у Т-киллеров, но не экспрессируется в фибробластах).

**Супергенные семейства.** Супергенное семейство – это совокупность нескольких мультигенных семейств, между которыми нет высокой степени гомологии, однако существует структурное и функциональное сходство между белковыми продуктами, кодируемыми данными семействами. Классическими примерами таких семейств являются супергенные семейства иммуноглобулинов, главного комплекса гистосовместимости (некоторые авторы объединяют его с суперсемейством иммуноглобулинов) и глобинов. В состав супергенного семейства иммуноглобулинов входит несколько мультигенных семейств, включая семейства генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, Т-клеточного рецептора, молекул межклеточной адгезии

*ISAM* и др.. Не смотря на то, что между отдельными членами этого супергенного семейства нет высокой степени гомологии на уровне ДНК, их белковые продукты имеют одну общую структурную особенность – наличие внеклеточных иммуноглобулиноподобных доменов. В свою очередь сходство строения обусловило и сходство (в широком смысле слова) выполняемых функций – все белки супергенного семейства иммуноглобулинов принимают участие в иммунологических реакциях.

### **1.2.1.2. Некодирующая ДНК**

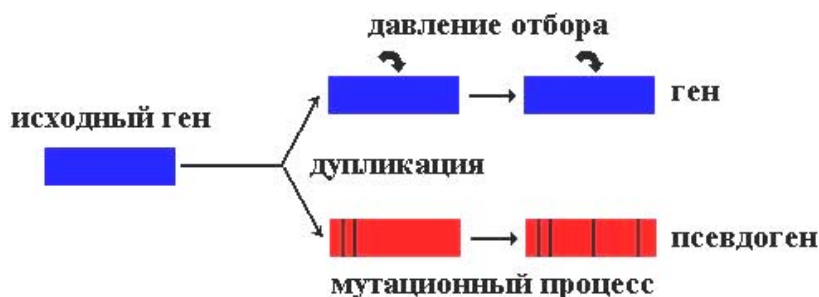
Некодирующая ДНК составляет 90% от всей фракции геномной ДНК ядра, которая организована в гены и геноподобные структуры. Она представлена псевдогенами, фрагментами генов, усеченными генами и интронами. По-видимому, происхождение не кодирующей ДНК тесно связано с процессами образования мульти- и супергенных семейств.

#### **Псевдогены.**

Псевдоген – это последовательность ДНК, которая обладает высокой степенью гомологии с нормальным неаллельным геном, но сама по себе функционально не активна. К настоящему моменту открыто и изучено несколько классов псевдогенов: неэкспрессирующиеся не процессированные, экспрессирующиеся не процессированные, неэкспрессирующиеся процессированные и экспрессирующиеся процессированные псевдогены.

***Неэкспрессирующиеся не процессированные псевдогены.*** Этот класс псевдогенов объединяет последовательности ДНК, которые являются нефункциональными копиями нормальных генов. Как правило, такие псевдогены содержат все структурные компоненты (экзоны, интроны, а также фланкирующие последовательности) работающего гена, но имеют мутации, которые не позволяют им экспрессироваться (например, стоп-кодон в начале кодирующей области). Предполагается, что основным механизмом образования неэкспрессирующихся не процессированных псевдогенов является тандемная дупликация исходного функционального гена. При этом одна из двух эквивалентных копий гена под давлением отбора сохраняет исходную активность, экспрессируется и дает функциональный продукт. Вторая же копия в условиях ослабления действия отбора может быстро накапливать мутации и, в конечном итоге, превращается в неактивный псевдоген

(рис. 11). По-видимому, в силу специфики своего происхождения псевдогены рассматриваемого класса (равно как и экспрессирующиеся непроцессированные псевдогены) чаще всего встречаются в сцепленных мультигенных семействах.

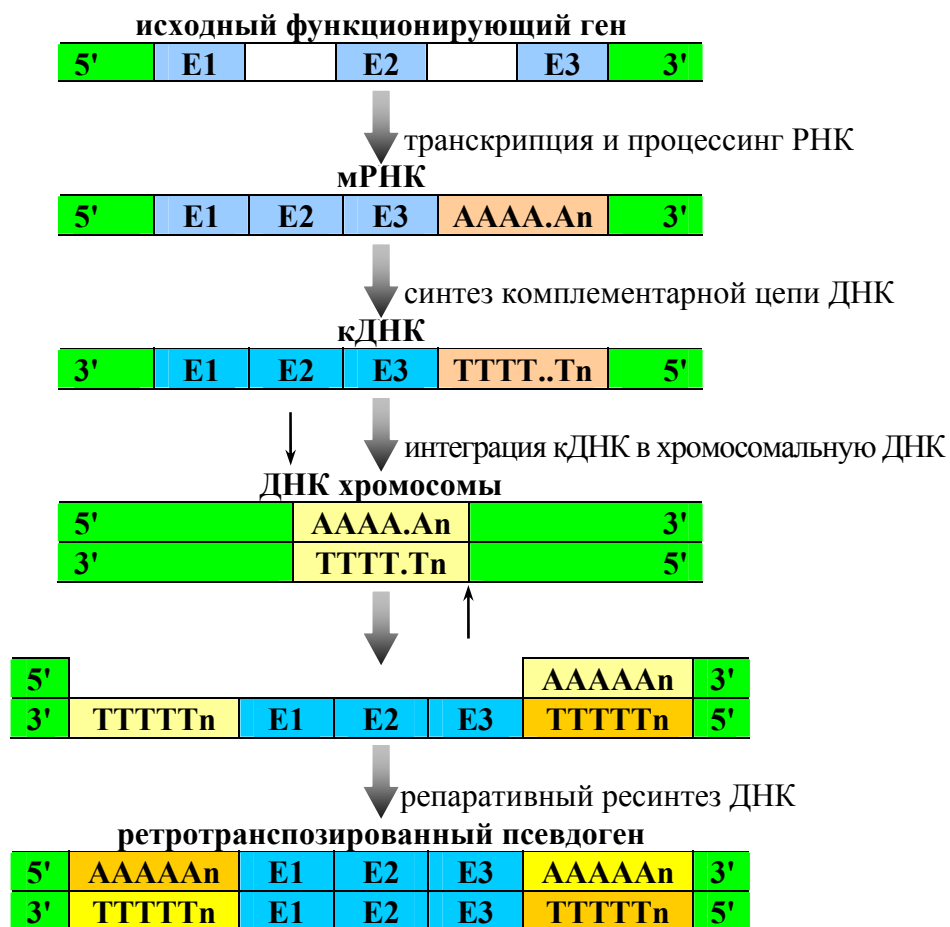


**Рис. 11.** Гипотетический механизм образования непроцессированных псевдогенов.

**Экспрессирующиеся непроцессированные псевдогены.** В этот класс входят непроцессированные псевдогены, которые являются транскрипционно активными копиями нормальных генов. Не смотря на то, что способность к экспрессии у таких последовательностей ДНК сохранена, лишь в некоторых случаях этот процесс может завершаться синтезом конечного белкового продукта, в большинстве же своем все ограничивается образованием только РНК-транскрипта. Так, например, хотя ген  $\theta$ -глобина экспрессируется с образованием зрелой мРНК, тем не менее до сих пор не обнаружен его белковый продукт. По-видимому, этот ген на самом деле является экспрессирующимся непроцессированным псевдогеном, РНК-транскрипт которого не подвергается трансляции. Однако даже в тех случаях, когда псевдоген экспрессируется с образованием белка, этот белок из-за мутационных изменений оказывается функционально неактивным. Более того, при дальнейшем накоплении мутаций такой псевдоген может потерять способность к экспрессии и превратиться в неэкспрессирующийся непроцессированный псевдоген.

**Неэкспрессирующиеся процессированные псевдогены.** Класс неэкспрессирующихся процессированных псевдогенов объединяет полностью нефункциональные копии кодирующей области нормального активного гена. Такие псевдогены имеют структурную гомологию с экзонами исходного гена, не содержат интронов, но, в некоторых случаях, могут иметь на одном (или на обоих) из своих концов олиго-А/Т-последовательность. В отличие от предыдущих двух классов процессированные псевдогены образуются в результате рет-

ротранспозиции, а не дупликации. Процесс ретротранспозиции предусматривает синтез одноцепочечной нити ДНК, комплементарной зрелой (процессированной) мРНК, с помощью обратной транскриптазы (ревертазы). В дальнейшем такая кДНК способна интегрировать в область генома, обогащенную А/Т-парами нуклеотидов. При этом по обе стороны от встроенного фрагмента ДНК образуются небольшие фланкирующие прямые повторы из А/Т пар оснований (рис. 12).



**Условные обозначения:**

E1-E2 – экзоны;

↑ ↓ – сайты надрезания при интеграции кДНК.

**Рис. 12.** Механизм образования процессированных псевдогенов.

**Экспрессирующиеся процессированные псевдогены.** Подобно неэкспрессирующимся процессированным псевдогенам этот класс псевдогенов имеет ретротранспозиционную природу. Однако в отличие от предыдущего класса экспрессирующиеся процессированные псевдо-

гены являются транскрипционно активными копиями кодирующих областей функциональных генов. По-видимому, существует, по меньшей мере, два механизма активации транскрипции таких последовательностей ДНК. Так, возможны случаи ретротранспозиции, когда кДНК при интеграции в геном попадает под влияние активного промотора другого гена и, как следствие, будет экспрессироваться. Если при этом функциональная активность интегрированной ДНК окажется селективно ценной, то она будет закреплена действием отбора. Например, у сумчатых млекопитающих известен аутосомный ген *PDHA1*, который кодирует субъединицу  $E1\alpha$  пируват-дегидрогеназного комплекса и принимает участие в регуляции сперматогенеза. У человека также имеется такой ген, но он локализован в X-хромосоме и не экспрессируется во время сперматогенеза. Однако его процессированная копия, ген *PDHA2*, функционально активен и вовлечен в процессы сперматогенеза.

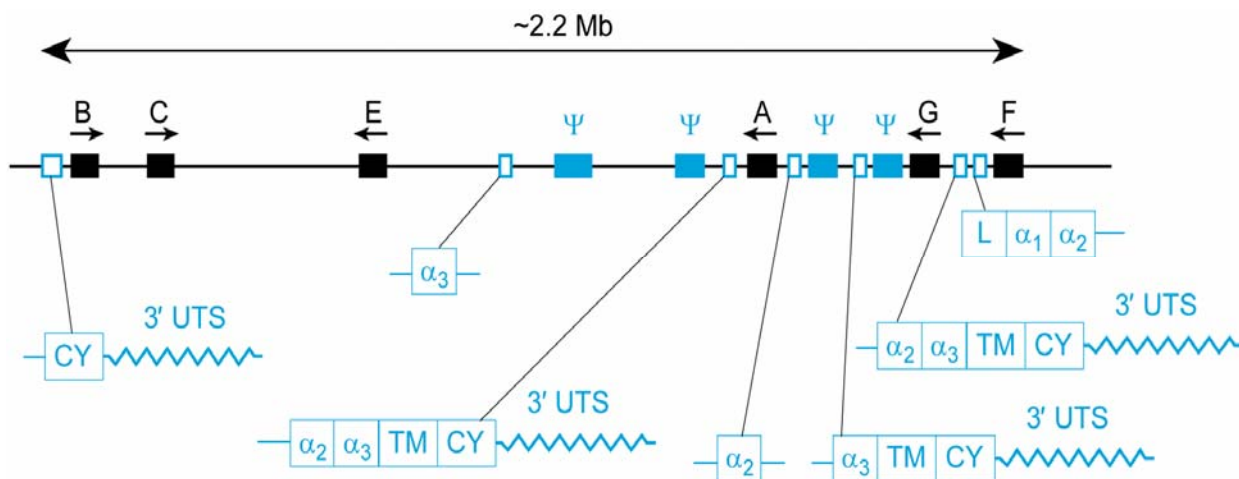
Заметим, что описанный выше механизм активации транскрипции наиболее характерен для процессированных копий генов класса II, РНК-транскрипты которых не содержат внутренних промоторов. Для процессированных же копий генов класса III возможен другой механизм транскрипционной активации. Установлено, что РНК-транскрипты генов класса III часто имеют внутренние промоторы. Поэтому при ретротранспозиции таких генов интегрированная копия уже содержит промотор и способна к экспрессии.

Точно так, как непроцессированные псевдогены в силу специфики своего происхождения чаще всего встречаются в сцепленных мультигенных семействах, также и процессированные псевдогены из-за особенностей своего образования идентифицируются преимущественно в рассеянных мультигенных семействах.

#### **Усеченные гены.**

Секвенс-анализ ядерного генома человека показал, что регионы хромосом, соответствующие сцепленным мультигенным семействам, часто содержат небольшие последовательности, гомологичные или идентичные 5'- или 3'-концам функциональных генов. Такие короткие нуклеотидные последовательности были названы усеченными генами. Так, *p21.31* регион 6-й хромосомы, где локализованы гены *HLA* класса I, содержит, по меньшей мере, 5 таких последовательностей (рис. 13). Из этих 5-и фрагментов 4 "обрезаны" с 5'-конца, имеют обязательно 3'-трейлерную последовательность и от 1-го до 4-х экзонов, соответствующих функциональным доменам  $\alpha$ -цепи. Пятый локус

"обрезан" с 3'-конца, имеет 5'-лидерную последовательность и два экзона, кодирующие  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -внеклеточные домены тяжелой цепи антигенов *HLA* класса I.



**Условные обозначения:**

- $\alpha_1$ - $\alpha_3$  – экзоны, кодирующие внеклеточные домены молекул *HLA* класса I;
- TM* – экзон, кодирующий трансмембранный домен молекул *HLA* класса I;
- CY* – экзон, кодирующий внутриклеточный (цитоплазматический) домен молекул *HLA* класса I;
- L* – 5'-лидерная последовательность;
- 3' UTS* – 3'-трейлерная последовательность.

**Рис. 13.** Усеченные гены и генные фрагменты в кластере генов *HLA* класса I.

**Фрагменты генов.**

Генный фрагмент – это очень маленький сегмент функционального гена, не связанный ни с 5'-лидерной, ни с 3'-трейлерной областью транскрипционной единицы. Чаще всего такой локус соответствует и равен какому-нибудь одному экзону многоэкзонного нормального гена. Так же как и усеченные гены, генные фрагменты часто встречаются в составе сцепленных мультигенных семейств. Например, кластер генов *HLA* класса I помимо функциональных генов, неэкспрессирующихся непроцессированных псевдогенов и усеченных генов содержит еще и два генных фрагмента: экзон, кодирующий  $\alpha_3$ -домен, и экзон, кодирующий  $\alpha_2$ -домен тяжелой цепи антигенов *HLA* класса I (см. рис. 13). Предполагается, что усеченные гены и генные фрагменты образуются в результате неравного кроссинговера, протекающего между сестринскими или несестринскими хроматидами.

### Интроны.

Интрон – некодирующий фрагмент ДНК, который разделяет два соседних экзона. Во время экспрессии гена интроны, подобно экзонам, транскрибируются в РНК, но в дальнейшем удаляются при сплайсинге этой молекулы.

У человека известно лишь немного генов, которые лишены интронов (табл. 7). Главным образом это митохондриальные гены и несколько групп ядерных генов: гены гистонов, гены малых РНК, гены гормональных рецепторов, процессированные копии интрон-содержащих генов и некоторые другие. В большинстве своем гены человека имеют мозаичную структуру, т. е. состоят из экзонов и интронов. Причем из 4-х известных групп интронов в генах человека обнаружена только одна – сплайсингосомные (классические) интроны. Остальные же группы интронов (группа I, группа II и археальные интроны) либо вообще не встречаются в геноме человека, либо пока просто не обнаружены.

Таблица 7

Непрерывающиеся гены человека.

Группа генов	Примеры
Гены митохондриального генома	Все 37 генов митохондриального генома
Гены гистонов	Все гены гистонов
Гены малых РНК	Большинство генов тРНК, гены 5S-РНК, 7SL-РНК, 7SK-РНК и гены всех U-РНК
Гены гормональных рецепторов	Гены рецепторов допамина <i>D1</i> и <i>D5</i> , ген рецептора серотонина <i>5-HT<sub>1B</sub></i> , ген рецептора 1 типа ангиотензина II, ген рецептора формил пептида, ген рецептора брадикинина <i>B2</i> , ген $\alpha$ 2-адренергического рецептора
Процессированные копии мозаичных генов	Ген фосфоглицерат киназы <i>PGK2</i> , ген глицерол киназы <i>GK</i> , ген <i>MYCL2</i> , ген <i>PDHA2</i> субъединицы <i>E1<math>\alpha</math></i> пируват дегидрогеназы, ген глутамат дегидрогеназы <i>GLUD2</i>
Гены интерферонов	Ген интерферона $\alpha$ , ген интерферона $\beta$
Другие гены	Ген тромбомодулина, гены <i>SRY</i> , многие гены <i>SOX</i> , ген <i>XIST</i>

Размер, число и местоположение интронов у разных генов человека различно. Средний размер интронов колеблется от 0,02 Кб (единственный интрон гена тРНК<sup>Тир</sup>) до 30 Кб (например, у гигантского гена молекулы дистрофина), а диапазон размеров лежит между 14 парами оснований (интроны некоторых генов тРНК) до 140 тысяч пар оснований (интрон 44 гена дистрофина). При этом общая длина интронов гена обычно превышает суммарную длину его экзонов в 2-10 и большее количество раз. Так, суммарная длина экзонов гена аденозиндезаминазы равна 1,5 Кб, а длина всех интронов этого гена равна 30 Кб. Это объясняется не только большей протяженностью отдельных интронов по сравнению с экзонами, но и увеличением числа интронов пропорционально длине последовательности, кодирующей белок. Например, ген инсулина, длина которого не превышает 1,4 Кб, имеет только два интрона, а ген VIII фактора свертывания крови при длине 186 Кб содержит 25 интронов (см. табл. 2).

Интроны располагаются в единицах транскрипции не случайным образом. В генах тРНК они локализуются всегда в одном и том же месте: через один нуклеотид от 3'-конца антикодона. В белок-кодирующих же генах интроны чаще всего находятся между сегментами, которые кодируют отдельные структурные или функциональные домены белка. В зависимости от характера прерывания кодирующей последовательности гена все интроны делят на 3-и типа: интроны нулевого, первого и второго типов. К нулевому типу относятся интроны, которые прерывают кодирующую область между кодонами. Этот тип является наиболее многочисленным и, по-видимому, самым старым. Интроны первого типа разрывают кодирующую последовательность между 1-м и 2-м основаниями кодона. Ко второму же типу относятся те интроны, которые прерывают кодон между 2-м и 3-м основаниями.

Наиболее характерной отличительной чертой всех интронов является наличие консервативных последовательностей вблизи их 5'- (левой, или донорной) и 3'- (правой, или акцепторной) концов (т. е. на стыках интронов и экзонов, или в сайтах сплайсинга). Извне донорный сайт сплайсинга чаще всего фланкирует последовательность ЦПуГ (где Пу – пурин), а 3'-сайт – всего один остаток Г. Изнутри первыми двумя нуклеотидами на 5'-конце интрона почти всегда являются ГТ (очень редким исключением может быть динуклеотид ГЦ); следующие четыре нуклеотида могут немного варьировать, но, по-видимому, канонической является последовательность (А или Г)АГТ. На 3'-конце ин-



трона всегда стоит пара АГ, перед которой чаще всего находится богатый пиримидином участок  $(\text{Пи})_n\text{МПиАГ}$  (где Пи – пиримидин). Кроме того, примерно за 40 пар оснований до терминального динуклеотида АГ располагается еще одна консервативная последовательность интрона, обязательным компонентом которой является нуклеотид А (рис. 14). Эта последовательность, названная сайтом ветвления, во время сплайсинга обеспечивает сворачивание вырезаемого интрона в лассообразную структуру.

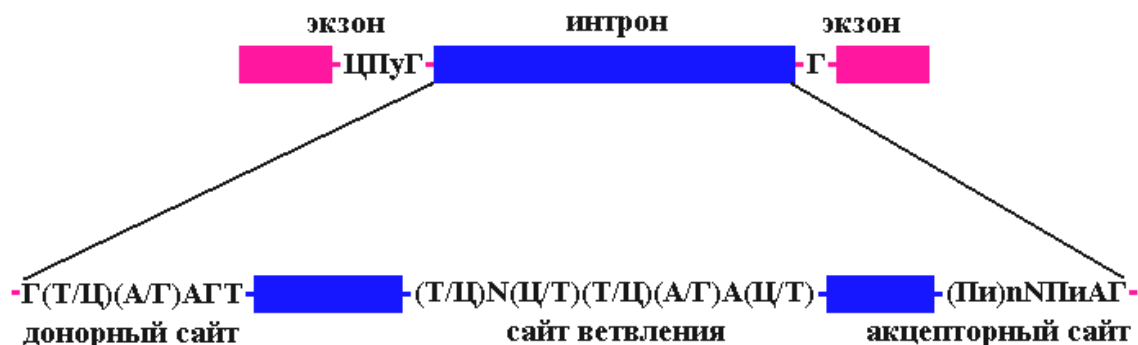


Рис. 14. Интегральная схема строения классического интрона генов класса II.

### 1.2.2. Внегенная ДНК

Внегенная ДНК, на долю которой приходится примерно 70% от всего количества ДНК ядерного генома человека, является самой загадочной частью генома. В соответствии с данными по анализу кинетики реассоциации молекул ДНК, а также результатами других исследований, внегенную ДНК принято делить на уникальные, низко-, умеренно- и высокоповторяющиеся последовательности. Такая классификация является достаточно условной и основана главным образом на двух характеристиках: длине повторяющихся "коровых" единиц, которая может варьировать от 1-2 до более чем 2000 пар оснований, и числе их копий, также меняющемся в очень широких пределах – от десятка до миллиона на гаплоидный геном. Не менее важными характеристиками различных классов повторяющихся ДНК являются нуклеотидная последовательность "коровых" единиц повторов, специфичность их организации, хромосомная локализация, внутривидовая стабильность, а также возможные функции этих типов ДНК. Если строение, хромосомная локализация и другие статические показатели внегенной ДНК к настоящему моменту достаточно хорошо изучены, то ее функциональное назначение остается не известным. Предполага-

ется, что рассматриваемая фракция геномной ДНК может выполнять несколько функций: участвует в регуляции экспрессии генов, участвует в процессинге РНК, выполняет структурную функцию, повышает точность гомологичного спаривания и рекомбинации, способствует успешной репликации ДНК и, возможно, является носителем принципиально иного генетического кода с неизвестной функцией.

### 1.2.2.1. Умеренно- и высокоповторяющиеся последовательности ДНК

Ядерный геном человека, подобно геномам других многоклеточных эукариот, примерно на 15% состоит из умеренно- и высокоповторяющихся последовательностей ДНК. Некоторые авторы, учитывая характер организации таких структур генома, первый класс именуют тандемно повторяющейся ДНК, а второй класс – диспергированными повторами (табл. 8).

**Таблица 8**

Умеренно- и высокоповторяющиеся последовательности ядерного генома человека.

Класс	Подкласс	Семейство
Тандемно повторяющиеся последовательности ДНК	Сателлитная ДНК	Сателлит I
		Сателлит II
		Сателлит III
Диспергированно повторяющиеся последовательности ДНК	Минисателлитная ДНК	Альфа-сателлитная (альфоидная) ДНК
		Бета-сателлитная ДНК
		Гипервариабельная минисателлитная ДНК
		Теломерная минисателлитная ДНК
Диспергированно повторяющиеся последовательности ДНК	Микросателлитная ДНК	Alu-повторы
		<i>LINE-1 (L1, Kpn)</i>
		<i>MER, THE-1, HERV/RTL</i>
	Другие	

#### **Тандемно повторяющиеся последовательности ДНК.**

К этому классу повторяющихся последовательностей ДНК относятся последовательности, организованные в блоки или кластеры. Каждый такой блок состоит из тандемных повторов, которые называются "коровыми" единицами повторяющейся ДНК. В зависимости от раз-

мера "коровой" единицы, а также протяженности кластера, образованного этими единицами, всю тандемно повторяющуюся ДНК делят на три подкласса: сателлитную, минисателлитную и микросателлитную ДНК. В свою очередь первые два подкласса ДНК, сателлитная и минисателлитная, включают несколько семейств (см. табл. 8).

Предполагается, что тандемно повторяющиеся последовательности ДНК могут возникать в результате общей рекомбинации между неаллельными гомологичными участками ДНК – неравного кроссинговера. Причем последовательные раунды такого неравного кроссинговера могут приводить как к удлинению, так и к укорочению длинных тандемных повторов.

**Сателлитная ДНК.** Сателлитная ДНК человека представлена очень большими блоками (от 0,1 до нескольких мегабаз в длину) тандемно повторяющихся последовательностей ДНК. Этот тип ДНК не транскрибируется, она локализована преимущественно в центромерных и гетерохроматиновых регионах хромосом и, в большинстве своем, не проявляет выраженной хромосомной специфичности. С помощью центрифугирования в градиенте плотности сульфата цезия было установлено, что сателлитная ДНК состоит из трех фракций (семейств), которые различаются между собой по плавучей плотности: сателлит I, сателлит II и сателлит III. Дополнительные исследования ядерного генома человека показали, что при расщеплении тотальной геномной ДНК с помощью рестрикционных эндонуклеаз можно идентифицировать еще два семейства сателлитной ДНК – альфа- и бета-сателлитную ДНК. Такие семейства обычно состоят из отдельных членов, которые различаются между собой по одному или более нуклеотидам. Некоторые из них дивергировали в результате случайных нуклеотидных замен. Иногда нуклеотидные замены обнаруживаются сразу в нескольких или во всех единицах какой-то части кластера. Если часть кластера существенно отличается от сателлитной последовательности в целом, то говорят о субкластере или о сателлитном доммене.

**Сателлит I.** Члены этого семейства сателлитной ДНК имеют наименьшую плавучую плотность – 1,687 г/см<sup>3</sup>. Протяженность "коровой" единицы – 25-48 пар оснований. В геноме человека эти мономеры образуют стабильные кластеры с кратностью в несколько десятков тысяч раз, которые иногда перемежаются с неповторяющимися последовательностями. Встречается в центромерном гетерохроматине и других гетерохроматиновых регионах большинства хромосом.

*Сателлит II.* При длине "коровой" единицы в 5 пар нуклеотидов члены этого семейства обладают промежуточной плавучей плотностью – 1,693 г/см<sup>3</sup>. Наиболее типичной нуклеотидной последовательностью "коровой" единицы является пентануклеотид АТТЦЦ. Встречается в гетерохроматиновых регионах практически всех хромосом.

*Сателлит III.* Семейство очень схоже с предыдущим семейством сателлитной ДНК. Плавучая плотность – 1,697 г/см<sup>3</sup>. Длина "коровой" единицы – 5 пар нуклеотидов. Так же как и в случае с сателлитом II, основной последовательностью "коровой" единицы сателлита III является пентануклеотид АТТЦЦ. Блоки сателлита III встречаются у большинства хромосом.

*Альфа-сателлитная ДНК.* Альфа-сателлитная (альфоидная) ДНК целиком локализована в центромерном гетерохроматине, составляя при этом 3-5% от общего количества ДНК каждой хромосомы. Длина "коровой" единицы альфоидной ДНК равна 171 паре нуклеотидов, хотя в последнее время были обнаружены и более протяженные единицы. В геноме человека эти мономеры образуют кластеры по 20 и более единиц. После расщепления рестриктазой *BamHI* в альфоидной ДНК выявляется серия фрагментов длиной около 2000 пар оснований, в составе которых обнаруживаются альфоидные последовательности, специфичные для гетерохроматиновых районов разных хромосом человека (1, 3-7, 9, 11, 17, 19, X). В некоторых случаях эти повторы гомологичны двум парам разных хромосом (9 и 15, 13 и 21, 18 и X). Хромосом-специфические последовательности альфоидной ДНК нашли широкое применение в молекулярной цитогенетике в качестве ДНК-зондов, удобных для маркирования индивидуальных хромосом в метафазных и интерфазных клетках человека.

*Бета-сателлитная ДНК.* Члены семейства образуют тандемные блоки, которые идентифицируются в области центромерного гетерохроматина 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 и Y хромосом. Протяженность "коровой" единицы – 68 пар оснований.

К сожалению, функция сателлитной ДНК остается до сих пор не известной. Предполагается, что она играет важную роль в поддержании структур хромосом и, возможно, в их спаривании в процессе мейоза. Однако не исключено, что она вообще не выполняет никакой функции в геноме.

*Минисателлитная ДНК.* "Коровые" единицы минисателлитной ДНК имеют длину от 6 до 24 пар оснований и организованы в блоки протяженностью 0,1-20 Кб. Подобно сателлитной ДНК, минисател-

литная ДНК не транскрибируется. Главными хромосомными регионами, где локализован этот тип ДНК, является центромерный и теломерный гетерохроматин. Подкласс минисателлитной ДНК включает два семейства повторяющихся последовательностей: гипервариабельную и теломерную минисателлитную ДНК.

*Гипервариабельная минисателлитная ДНК.* Длина "коровых" единиц этого семейства минисателлитной ДНК очень вариабельна – от 9 до 24 пар оснований. Однако, не смотря на такой полиморфизм длины, повторяющиеся единицы имеют относительно постоянное строение – общей коровой последовательностью является последовательность ГГГЦАГГАХГ (где Х – любой нуклеотид). Такие "коровые" единицы, тандемно повторяясь, образуют кластеры длиной от 0,1 до 20 Кб, общее число которых достигает 1000 копий на гаплоидный геном. Основным местом хромосомной локализации гипервариабельной минисателлитной ДНК является претеломерный гетерохроматин, хотя нельзя исключить и другие гетерохроматиновые зоны хромосом.

Транскрипционной активностью гипервариабельная минисателлитная ДНК не обладает. Однако в этом правиле есть исключение – транскрибирующаяся гипервариабельная минисателлитная ДНК обнаружена в гене, кодирующем гликопротеин *MUC1*. Этот гликопротеин, который можно идентифицировать в некоторых типах эпителиальных тканей и тканевой жидкости человека, характеризуется очень высоким полиморфизмом. Установлено, что такой полиморфизм связан с полиморфизмом "коровых" единиц минисателлитной ДНК, присутствующей в гене. Кроме того, предполагается, что гипервариабельная минисателлитная ДНК может выполнять функцию "горячих точек", по которым осуществляется гомологичная рекомбинация в клетках человека.

Знания по гипервариабельной минисателлитной ДНК получили и практическое применение. При блот-гибридации зондов, содержащих сегменты минисателлитной ДНК, с рестрицированной геномной ДНК на электрофореграмме появляется несколько полос. Их распределение у разных людей различается, но для ДНК из разных тканей одного индивида остается одинаковым. Распределение полос наследуется по Менделю, причем можно соотнести их с тем или иным родителем. Количества ДНК, содержащегося в нескольких каплях крови, вполне достаточно для проведения блот-гибридации, так что метод, основанный на использовании минисателлитной ДНК, можно применять в судебно-медицинской практике.

*Теломерная минисателлитная ДНК.* "Коровая" единица теломерной ДНК состоит из 6-и нуклеотидов ТТАГГГ. Тандемно повторяясь, этот гексануклеотид образует блоки протяженностью от 10 до 15 Кб, которые имеют строго постоянную хромосомную локализацию – концы, или теломеры, всех хромосом.

Транскрипционной активностью теломерная ДНК не обладает. Однако она, являясь главным компонентом теломерных концов хромосом, принимает участие в выполнении последними их специфических функций: препятствие "слипанию" концов хромосом, полная репликация концевых участков хромосомной ДНК, обеспечение пространственной организации хромосом в ядре и пространственной организации самого ядра, а также контроль количества делений клетки.

*Микросателлитная ДНК.* "Коровыми" единицами микросателлитной ДНК являются последовательности длиной от 1 до 4 пар нуклеотидов, которые организованы в блоки протяженностью не более 0,15 Кб. Мононуклеотидные повторы такой ДНК чаще всего представлены А/Т парами, на долю которых приходится около 0,3% (или около 10 Мб) от размера всего ядерного генома. В случае динуклеотидных "коровых" единиц чаще всего встречаются блоки из динуклеотидов ЦА (или ГТ на комплементарной цепи) – они составляют примерно 0,5% геномной ДНК. Реже встречаются динуклеотиды ЦТ (или ГА на комплементарной цепи) – в среднем один такой динуклеотид приходится на 50 Кб ДНК, а в общей сложности на их долю приходится примерно 0,2% от общего объема геномной ДНК. Еще реже встречаются динуклеотиды ЦГ (или ГЦ на комплементарной цепи). Также редки три- и тетрануклеотиды. Причем в последних двух случаях обнаружен очень высокий полиморфизм строения.

Микросателлитная ДНК рассеяна по всему геному. Транскрипционной активностью она не обладает. Функциональное назначение микросателлитной ДНК остается до сих пор не известным.

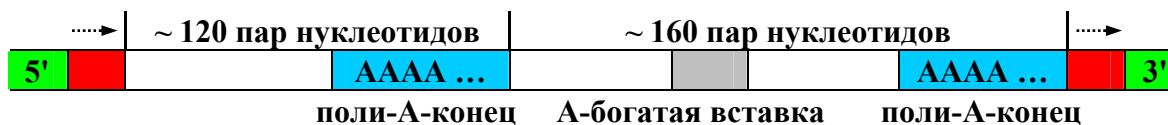
#### **Диспергированные последовательности ДНК.**

Класс диспергированных повторяющихся последовательностей ДНК представлен рассеянными по геному протяженными повторами, которые не организованы в кластеры (за редким исключением). Длина повторяющихся единиц этого класса варьирует и лежит в основе деления всего класса на подклассы, главными из которых являются два: короткие ядерные элементы, или подкласс *SINEs* (от англ. short interspersed nuclear elements) и длинные ядерные элементы, или подкласс *LINEs* (от англ. long interspersed nuclear elements). В свою оче-

редь каждый из подклассов включает одно или несколько семейств (см. табл. 8). По своим свойствам диспергированные повторяющиеся последовательности ДНК человека относятся к мобильным генетическим элементам.

**Короткие диспергированные ядерные элементы.** Максимальная протяженность "коровых" единиц *SINEs* не превышает 0,3 Кб. Общее число повторяющихся единиц может достигать примерно 1 млн. копий на геном. Предполагается, что члены этого подкласса представляют собой процессированные псевдогены, происходящие от генов класса III, в частности, генов тРНК и 7SL-РНК, и относятся к ретрогенам (или ретропозонам). Как правило, *SINEs* окружены прямыми повторами – сайтами-мишенями дупликаций, – и содержат А-богатую 3'-концевую последовательность. Одним из наиболее изученных семейств этого подкласса диспергированных последовательностей ДНК является семейство *Alu*-повторов, названное так потому, что все его члены содержат сайт для рестриктазы *AluI*.

***Alu*-повторы.** Типичная *Alu*-последовательность человека представляет собой димер, состоящий из двух повторов длиной около 120 пар нуклеотидов, соединенных голова-к-хвосту (рис. 15). Мономерные единицы в составе димера неодинаковы: наиболее существенное различие между ними состоит в том, что во втором из них имеется А-богатый дополнительный сегмент длиной 32 пары оснований. Каждый из мономеров заканчивается поли-А-хвостом разной длины. *Alu*-мономеры содержат последовательности, гомологичные 5'- и 3'-концам 7SL-РНК; центральная же часть 7SL-РНК длиной 155 пар нуклеотидов в *Alu*-последовательности делетирована. По краям *Alu*-последовательности фланкированы короткими (6-18 пар оснований) прямыми повторами. Кроме полных *Alu*-повторов в геноме человека обнаружены отдельные мономеры, содержащие только один из двух tandemных повторов, и множество усеченных вариантов димеров и мономеров.



**Условные обозначения:**

-----> – прямой фланкирующий повтор

**Рис. 15.** Структурная организация *Alu*-повторов человека.

В геноме человека обнаружено около 700-1000 тыс. копий *Alu*-повторов (или около 9% геномной ДНК человека), при этом различия между этими последовательностями у разных людей не превышают 15%. В среднем на каждые 5 тысяч пар нуклеотидов генома человека (или через каждые 2-3 диспергированных повтора, принадлежащих другим семействам) приходится одна *Alu*-последовательность. Распределение *Alu*-повторов по геному весьма неравномерно как между хромосомами, так и по их длине. *Alu*-элементы фланкируют гены, они обнаружены в интронах, в сателлитной ДНК и в составе кластеров вместе с другими вставочными последовательностями. Как правило, *Alu*-повторы лежат внутри *R*-дисков метафазных хромосом. При этом в одних хромосомах (например, в хромосомах 14, 16 и 21) *Alu*-последовательности концентрируются в области центромеры, а в других (например, в хромосомах 4, 19, 20, *X* и *Y*) не образуют скоплений и распределены относительно равномерно.

Установлено, что некоторые члены *Alu*-семейства могут транскрибироваться *in vitro* с помощью РНК-полимеразы III. Транскрипция начинается строго на 5'-конце единицы и заканчивается на первом участке из четырех или более остатков аденина в матричной цепи ДНК. Эффективность транскрипции *in vivo* *Alu*-повторов низка. Тем не менее, она может приводить к синтезу РНК, что, в свою очередь, может привести к появлению в клетках *Alu*-содержащих кДНК, обладающих свойствами ретропозонов, то есть способных инсертироваться в геномную ДНК. В литературе описаны случаи инсерционного мутагеназа *Alu*-повторов, приводящие к гемофилии *B* и нейрофиброматозу типа I, а также *Alu*-опосредованного делеционного мутагена, приводящего к развитию семейной гиперхолестеролемии. Однако частота таких событий, по-видимому, невелика.

Кроме того, *Alu*-последовательности могут транскрибироваться с помощью РНК-полимеразы II. Это происходит в том случае, когда они находятся в каком-либо интроне, в 5'-лидерной или 3'-трейлерной последовательности неродственной транскрипционной единицы класса II. Поэтому гетерогенные ядерные РНК содержат в большом количестве транскрипты *Alu*-повторов. В ходе процессинга первичных транскриптов с образованием мРНК *Alu*-последовательности обычно удаляются, в результате чего плазматическая РНК содержит их почти в десять раз меньше, чем ядерная.

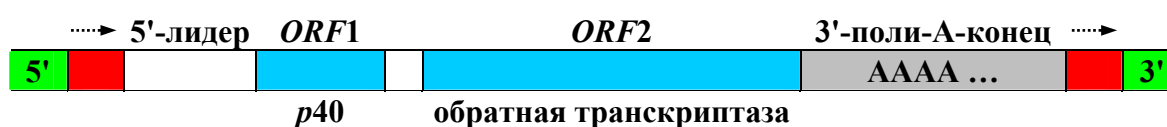
Наконец, есть данные, согласно которым *Alu*-последовательности



могут участвовать в регуляции транскрипции, в процессинге РНК, инициировать неравный кроссинговер и репликацию ДНК.

**Длинные диспергированные ядерные элементы.** Максимальная протяженность "коровых" единиц длинных диспергированных ядерных элементов достигает 6 и более Кб. Общее число повторяющихся единиц может достигать до 100 тыс. копий на геном, в среднем через каждые 2,2 тыс. пар оснований. Одним из наиболее изученных семейств этого подкласса диспергированных последовательностей ДНК является семейство *LINE-1*, или *L1*. Это семейство называют также *Kpn*-семейством, потому что все его члены содержат сайт для рестриктазы *KpnI*. По общепринятой классификации мобильных элементов семейство *LINE-1* относится к ретротранспозонам класса II.

**Семейство *LINE-1*.** Полноразмерные члены *LINE-1*-семейства достигают 6-7 тыс. пар нуклеотидов и имеют две открытые рамки считывания (*ORFs*, от англ. open reading frames) – *ORF1* и *ORF2*. *ORF1* находится на 5'-конце повторяющейся единицы и кодирует белок *p40* с неизвестной функцией. *ORF2* занимает регион, близкий к 3'-концу единицы, и кодирует, по-видимому, обратную транскриптазу. Перед *ORF1* находится небольшой нетранслируемый участок (5'-лидерная последовательность), который выполняет функцию внутреннего промотора, а за *ORF2* находится 3'-поли-А-конец. Кроме того, полноразмерные члены семейства фланкированы короткими прямыми повторами (рис. 16).



**Условные обозначения:**

- ORF* – открытая рамка считывания;
- .....→ – прямой фланкирующий повтор.

**Рис. 16.** Структурная организация *LINE-1*-последовательности человека.

Установлено, что многие члены семейства *LINE-1* имеют длину меньше 6-7 тыс. пар оснований. В таких укороченных сегментах обычно отсутствуют 5'-концевые последовательности, а иногда и внутренние участки. Кроме того, не все члены семейства колинеарны. Некоторые из них инвертированы или в них произошли какие-то перестройки. В целом, число копий различных частей длинных

*LINE-1*-последовательностей варьирует и увеличивается от левого конца к правому. В результате в геноме человека содержится около 3500 копий левого конца последовательностей и почти 100 тыс. копий правого конца.

Члены семейства *LINE-1* фланкируют гены, они встречаются в интронах и сателлитной ДНК. Иногда *LINE-1*-последовательности образуют кластеры, повторяющиеся несколько тысяч раз. Например, необычно много членов этого семейства имеется в сегменте ДНК человека размером 65 тыс. пар оснований, который содержит  $\beta$ -глобиновые гены. В целом, *LINE-1*-элементы локализуются преимущественно в эухроматиновых регионах различных хромосом. При этом в отличие от *Alu*-повторов, *LINE-1*-последовательности чаще всего встречаются в *G*-дисках (Гимза положительных зонах) метафазных хромосом.

В отличие от *Alu*-повторов, *LINE-1*-единицы, по-видимому, не являются псевдогенами обычных генов. Скорее всего, некоторые наиболее длинные *LINE-1*-последовательности представляют собой мобильные элементы, которые амплифицировались и встроились в новые геномные сайты в результате обратной транскрипции соответствующей РНК. Это предположение косвенно подтверждается тем, что в составе полноразмерных *LINE-1*-повторов имеется *ORF* обратной транскриптазы. Кроме того, известно несколько случаев инсерционного мутагенеза, обусловленного встраиванием *LINE-1*-единиц в нормальные гены. Так, у некоторых мальчиков, больных гемофилией, в *X*-сцепленном гене VIII фактора свертывания крови была обнаружена вставка *LINE-1*, в то время как у матерей эта вставка отсутствовала. Укороченные единицы *LINE-1* или единицы с перестройками могли произойти от неполных или аберантных транскриптов, от обратных транскриптов или же появиться в результате рекомбинаций, сопряженных с инсерцией.

Последовательности *LINE-1* транскрибируются РНК-полимеразой II вместе с геном, в некодирующий участок которого они встроены. В результате среди гетерогенных ядерных РНК встречается довольно много РНК, гомологичных обеим цепям последовательностей *LINE-1*. В полиаденилированной плазматической РНК дискретных транскриптов не обнаружено, как не обнаружено и соответствующих белков. Исключение составляют клетки тератокарциномы человека, которые содержат полноразмерные транскрипты цепи с *ORF*. Однако белков, кодируемых этими РНК, не обнаружено.

Кроме *Alu*-повторов и *LINE-1*-последовательностей у человека известно еще ряд семейств повторяющихся последовательностей ДНК, которые можно отнести к мобильным генетическим элементам. Примерами таких семейств могут быть семейство *MER* (умеренно повторяющиеся мобильные генетические элементы, от англ. medium reiteration frequency), семейство *THE-1* (транспозирующийся элемент человека, от англ. transposable human element) и семейства *HERV* (эндогенные ретровирусы человека, от англ. human endogenous retroviruses) и *RTL**V* (ретровирус-подобные элементы, от англ. retrovirus-like elements). Однако они изучены очень слабо и потребуются, по-видимому, не мало времени для окончательного выяснения их строения и выполняемых функций. Известно только, что полная протяженность повторяющихся единиц этих элементов колеблется от нескольких сотен пар нуклеотидов (семейства *MER*) до 6-10 Кб (семейства *HERV* и *RTL**V*), а число копий достигает нескольких сотен тысяч на геном.

## ГЛАВА 2. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА

---

ДНК в ядре, по-видимому, никогда не находится в свободном состоянии, а связана с катионами двухвалентных металлов, ди- и полиаминами и белками. Причем связь между этими компонентами и молекулой ДНК осуществляется за счет сил электростатического взаимодействия – отрицательно заряженные фосфатные группы дезоксирибонуклеиновой кислоты частично нейтрализуются положительно заряженными ионами металлов, ди- и полиаминов или основными аминокислотными остатками белков. Благодаря таким взаимодействиям хромосомальная ДНК способна компактизоваться, уменьшая свой объем в десятки, сотни и тысячи раз. По-видимому, ключевую роль в процессах компактизации ДНК играют белки хроматина, которые, к тому же, способны еще и контролировать экспрессию транскрипционно активных элементов ядерного генома.

Максимально конденсированными хромосомы становятся к метафазе митоза или метафазы I/II мейоза, когда степень их компактизации достигает 50-100 тыс. по сравнению с чистой хромосомальной ДНК. Именно метафазные хромосомы стали объектом пристального внимания исследователей на заре цитогенетики человека, поскольку именно на них проще всего изучать морфологию хромосом человека. Так, даже с помощью простых способов окрашивания метафазных клеток можно под световым микроскопом увидеть все 23 пары хромосом человека, а некоторые из них и идентифицировать. Однако полной идентификации хромосомы поддаются только после дифференциального окрашивания, которое позволяет изучить структурную вариацию внутри самих хромосом, а также установить различия между отдельными хромосомами. Структурная неоднородность хромосом, выявляемая с помощью дифференциального окрашивания, пока не имеет окончательного и однозначного объяснения, хотя к настоящему времени и предложено несколько интересных гипотез, в частности, модель "скэффолда и петли" Сайтохома Й. и Лаеммли Ю. К.

По своим индивидуальным характеристикам (морфологии, характеру сегментации и т. д.) хромосомы человека часто очень сильно различаются между собой. Что бы убедиться в этом, достаточно сравнить, например, мета- и субметацентрические хромосомы группы *A* и акроцентрические спутничные хромосомы группы *G*. Пока не совсем понятен биологический смысл таких структурных различий между

отдельными хромосомами. Правомочным будет предположение, что хромосомы, будучи дискретными внутриядерными частицами, на которые разделен весь ядерный геном человека, могли бы быть если не идентичными, то хотя бы очень близкими по строению. Однако такого явления мы не наблюдаем ни у человека, ни у какого-либо другого организма. Не исключено, что такие структурные различия каким-то образом связаны с выполняемыми хромосомами специфическими биологическими функциями, важнейшими из которых являются две: обеспечение равномерного распределения наследственного материала между двумя дочерними клетками во время митотического деления и распределение и перетасовка наследственного материала во время мейотического деления клеток.

Эта глава посвящена более подробному рассмотрению перечисленных выше вопросов, связанных со структурно-функциональной организацией хромосом человека, методов их изучения, а так же неразрешенным на сегодняшний день проблемам цитогенетики человека.

## **2.1. Структурная организация хроматина**

Хроматин – это основное вещество хромосом эукариотических клеток (в том числе и хромосом человека), состоящее из двухцепочечной ДНК, гистоновых и негистоновых белков. У человека, равно как и у других млекопитающих, в составе хроматина обнаружено пять гистоновых белков, которые обозначаются как *H1*, *H2A*, *H2B*, *H3* и *H4*. Гистон *H1* млекопитающих состоит примерно из 215 аминокислот; размеры других же гистонов варьируют от 100 до 135 аминокислот. Все они содержат необычно большое количество положительно заряженной аминокислоты лизина; *H3* и *H4* отличаются от других тем, что у них достаточно высок уровень положительно заряженной аминокислоты аргинина. Гистоны могут быть ацетилированы, метилированы, фосфорилированы, поли(АДФ)-рибозилированы, а гистоны *H2A* и *H2B* – ковалентно связаны с убиквитином. Какова роль таких модификаций в становлении структуры и выполнении функций гистонами до конца пока не выяснено.

Как уже отмечалось, кроме гистоновых белков хроматин содержит и другие белки, которые обычно называют негистоновыми. Некоторые из них, например ферменты, необходимые для репликации и экспрессии ДНК, могут связываться с хроматином временно. Другие белки, скажем, принимающие участие в различных процессах регуляции,

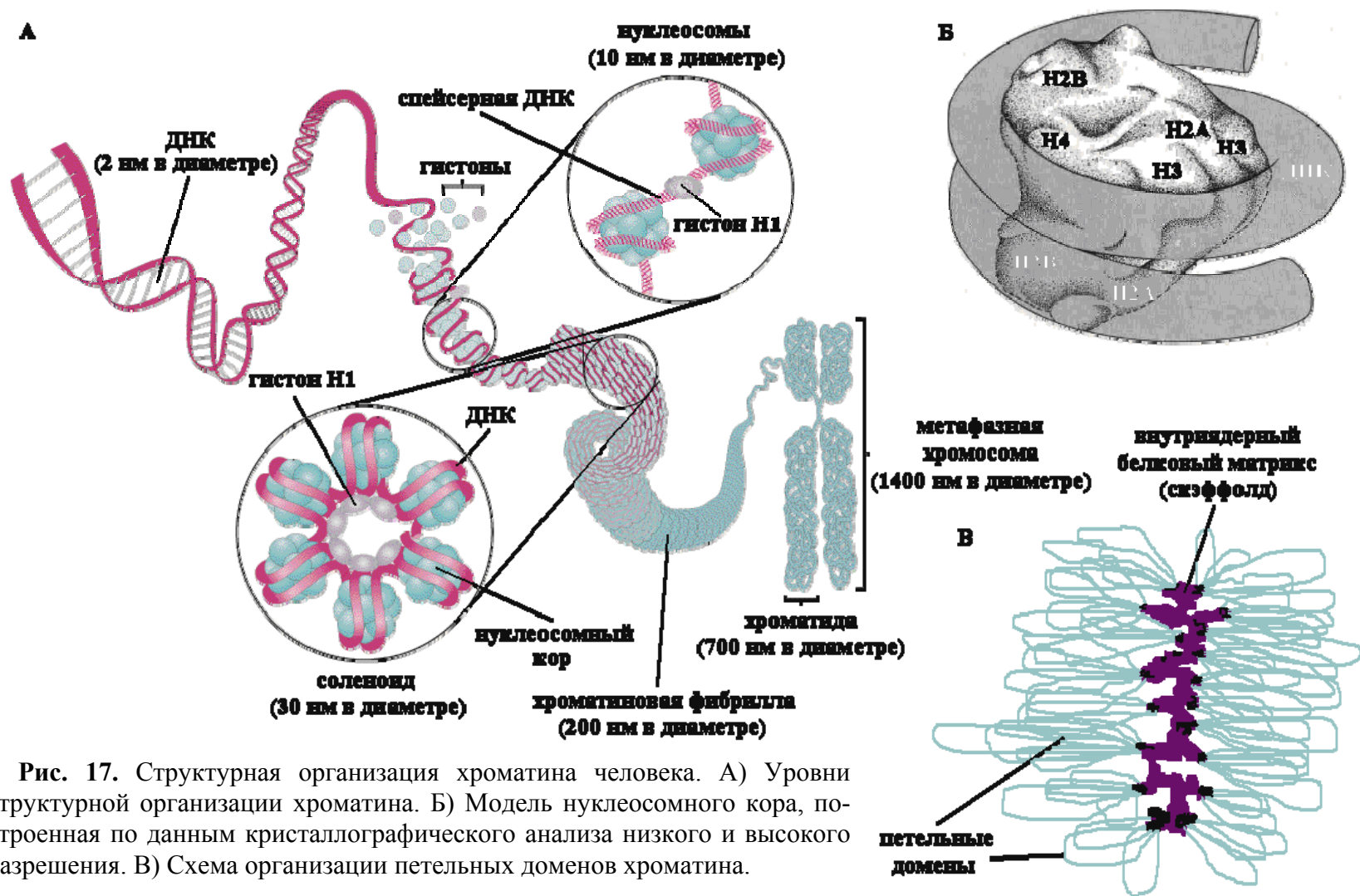
связываются с ДНК только в специфических тканях или на определенных стадиях дифференциации. Особенности строения и функции этих белков детально рассматриваются в многочисленных руководствах по молекулярной генетике, поэтому мы не будем подробно на них останавливаться.

Структурной единицей хроматина является нуклеосома – сверхспиральный сегмент ДНК длиной 146 пар нуклеотидов, намотанный с образованием 1,75 левых витков на нуклеосомный кор. Нуклеосомный кор – это гистоновый октамер, состоящий из гистонов *H2A*, *H2B*, *H3* и *H4*, по две молекулы каждого вида (рис. 17 Б). Пятый гистон, *H1*, не входит в состав нуклеосомного кора и не участвует в процессе наматывания ДНК на гистоновый октамер. Он контактирует с ДНК в тех местах, где двойная спираль входит и выходит из нуклеосомного кора. В такой структуре с одним гистоновым октамером и молекулой гистона *H1* ассоциированы 168 пар оснований спиральной ДНК.

На электронно-микроскопических фотографиях в зависимости от условий выделения и степени растяжения хроматин выглядит либо как длинная нить с утолщениями – "бусинками" нуклеосом диаметром 10 нм, нанизанными по всей длине нити с определенными интервалами, либо как более короткая и более плотная фибрилла (волокно) диаметром 10 нм. Далее эти фибриллы толщиной 10 нм при участии гистона *H1* скручиваются в спираль из шести нуклеосом на виток с образованием соленоида диаметром 30 нм (рис. 17 А).

В результате описанных выше взаимодействий ДНК с гистонами сегмент двойной спирали ДНК из 168 пар оснований со средним диаметром 2 нм и длиной 57 нм превращается в спираль диаметром 10 нм и длиной 5 нм. При последующем сжатии этой спирали до волокна диаметром 30 нм степень конденсации увеличивается еще в шесть раз. В конечном итоге упаковка дуплекса ДНК с пятью гистонами приводит к 50-кратной конденсации ДНК. Однако даже столь высокая степень конденсации не может объяснить почти 50000-100000-кратное уплотнение ДНК в метафазной хромосоме. К сожалению детали дальнейшей упаковки хроматина вплоть до метафазной хромосомы пока не известны, поэтому мы рассмотрим лишь общие особенности этого процесса.

Электронно-микроскопические данные свидетельствуют о том, что на более высоких уровнях компактизации хроматин состоит из отдельных топологически независимых участков – петельных доменов,



**Рис. 17.** Структурная организация хроматина человека. А) Уровни структурной организации хроматина. Б) Модель нуклеосомного кора, построенная по данным кристаллографического анализа низкого и высокого разрешения. В) Схема организации петельных доменов хроматина.

длиной примерно 30-300 тысяч пар оснований (рис. 17 В). Петельные домены своим основанием прикрепляются к внутриядерному белковому матриксу в так называемых встроенных местах прикрепления (*SAR*, от англ. scaffold attachment regions) – фрагментах ДНК протяженностью в несколько сотен пар оснований, которые характеризуются высоким содержанием (>65%) А/Т пар нуклеотидов. Каждый домен, по-видимому, имеет одну точку начала репликации и функционирует как автономная сверхспиральная единица. Любой петельный домен содержит множество единиц транскрипции, функционирование которых, вероятно, координируется – весь домен находится либо в активном, либо в неактивном состоянии.

## **2.2. Структурная организация хромосом**

Хромосома – дискретная динамическая внутриядерная структура клетки, состоящая из одной (до завершения *S*-фазы клеточного цикла) или двух (после завершения *S*-фазы клеточного цикла и до анафазы митоза или анафазы II мейоза) идентичных линейных двуцепочечных молекул ДНК и хромосомальных белков (белков хроматина) и имеющая в зависимости от фазы клеточного цикла разную степень компактизации. Заметим, что это определение не является универсальным и имеет некоторые недостатки. Так, строго говоря, во время митоза или мейоза, когда происходит разрушение ядерной оболочки и содержимое ядра смешивается с содержимым цитоплазмы, хромосому нельзя считать внутриядерной структурой. Кроме того, это определение не позволяет провести грань между понятиями хромосома и хроматида, хотя таковая и существует. Под хроматидами правильнее понимать две идентичные копии хромосомы, связанные между собой в области центромеры (т. е. понятие хроматида применимо к хромосоме в период ее существования от момента репликации до начала анафазы митоза или анафазы II мейоза).

Совокупность числа, величины и морфологии хромосом называется кариотипом данного вида. Рисунки же хромосом, расположенных в ряд в порядке убывания размера называют кариограммой. Как правило, изучение кариотипа данного вида (в том числе и человека) и составление его кариограммы проводится на прометафазных или метафазных клетках, когда хромосомы имеют максимальную компактизацию.



## **2.2.1. Приготовление препаратов метафазных хромосом человека**

### **2.2.1.1. Биологический материал, используемый для приготовления метафазных хромосом человека**

Препараты хромосом можно приготовить из всех тканей и клеточных суспензий, содержащих делящиеся клетки. У человека в большинстве случаев используют препараты из клеток костного мозга, кратковременной культуры крови или из длительной культуры фибробластов. Наиболее простым и доступным является метод культивирования клеток крови. Пункция костного мозга или биопсия кожи для культивирования фибробластов технически сложнее, и к тому же аспирация костного мозга - весьма неприятная процедура. Препараты из костного мозга имеют, однако, то преимущество, что дают возможность изучать митозы *in vivo*.

В крови здоровых людей (или больных, но не лейкозами) нет делящихся клеток. Однако митоз этих клеток можно стимулировать искусственно, например, обработав их фитогемагглютинином. Спустя один час после инкубации с фитогемагглютинином в лимфоцитах крови отмечается синтез РНК, а через 24 ч начинается синтез ДНК. Суспензию лимфоцитов выращивают в культуральной среде 72 ч и затем готовят препараты хромосом. Чтобы остановить клетки в прометафазе, подавляют образование веретена деления веществами с колхициноподобным действием, предпочтительно колцемидом. В специальных условиях время культивирования можно сократить до 48 ч. Для свободного распределения хромосом в плоскости препарата клетки обрабатывают в течение 10-30 мин гипотоническим раствором, а затем фиксируют смесью этанола и уксусной кислоты. Каплю такой суспензии наносят на стекло, высушивают на воздухе и окрашивают.

Препараты клеток костного мозга получают из материала пункции грудины или подвздошной кости. Клетки культивируют только 2 ч с колцемидом. Процедура приготовления препаратов несколько отличается от процедуры, описанной выше. Культуру фибробластов получают из материала биопсии кожи. Ее измельчают и выращивают в культуральной среде таким образом, чтобы кусочки были прикреплены к поверхности культурального сосуда. Через 10 дней культивирования клетки начинают расти по поверхности этого сосуда, а через 21 день можно уже готовить суспензию и делать препараты.

В конце 70-х годов прошлого столетия был предложен оригинальный

метод приготовления препаратов хромосом непосредственно из сперматозоидов человека. Для этого сперму сначала инкубируют с ооцитами золотистого хомячка, лишенными блестящей оболочки, чтобы индуцировать митозы. Этот метод весьма важен для прямого определения хромосомных аномалий в сперматозоидах человека. Однако его воспроизводимость очень плохая. Так, в одном исследовании частота хромосомных аномалий в сперматозоидах оказалась равной 8,5%.

### **2.2.1.2. Окрашивание метафазных хромосом человека**

Окрашивание хромосом можно проводить разными методами. Наиболее простой способ окрашивания – красителем Гимза или 2%-ным ацетоорсеином, или 2%-ным ацетокармином. Эти красители окрашивают хромосомы целиком, равномерно и интенсивно. Для некоторых диагностических целей (например, для выявления численных аномалий хромосом) этот метод вполне достаточен. Для получения же более детальной картины структуры хромосом и идентификации отдельных хромосом или их сегментов используются различные способы дифференциального окрашивания.

Еще на заре цитогенетики многие исследователи отмечали в хромосомах, окрашенных по обычной методике, некоторую неоднородность в плотности окрашивания отдельных участков. Этот факт оставался без внимания, пока Касперсон Т. с сотр. в 1968 году не обнаружили, что после обработки акрихин-ипритом флуоресценция по длине хромосомы распределена не равномерно, а в виде сегментов. Затем те же Касперсон Т. с сотр. показали, что каждую хромосому человека можно надежно идентифицировать с помощью такого метода окрашивания. Вскоре после этого стало ясно, что очень сходный рисунок сегментации можно получить и с помощью красителя Гимза, если дополнить процедуру окрашивания некоторыми приемами. Было показано, что частичная тепловая денатурация также приводит к выявлению сегментов в хромосомах. На Парижской конференции по стандартизации и номенклатуре хромосом человека в 1971 г. полученные к тому времени данные были сопоставлены, и оказалось, что все методы выявляют в принципе одни и те же структуры, но каждый из них специфичен в отношении определенных хромосомных сегментов (дисков или бэндов).

Различные типы сегментов обозначают по методам, с помощью которых они выявляются наиболее отчетливо:

**Q-сегменты** (*quinacrine*, акрихин) – участки хромосом, флуоресцирующие после окрашивания акрихин-ипритом или сходными соединениями (например, *Hoechst 33258*);

**G-сегменты** (*Giemsa*, Гимза) выявляются при окрашивании красителем Гимза в сочетании с дополнительными процедурами, которые способствуют тому, что краситель адсорбируется наиболее интенсивно на определенных участках. Q- и G-сегменты идентичны. В большинстве лабораторий в повседневной работе предпочитают G-метод, поскольку он не требует использования флуоресцентного микроскопа и окрашенные препараты можно длительно хранить. Однако специфическое преимущество Q-метода состоит в том, что он позволяет даже в интерфазном ядре идентифицировать Y-хромосому человека по яркой флуоресценции;

**R-сегменты** (*reverse*, обратные) окрашиваются красителем Гимза после контролируемой тепловой денатурации хромосомы. Они располагаются между Q-(или G-) сегментами. Для этого метода могут использоваться и другие красители, в частности хромомициновые красители (хромомицин A<sub>3</sub>, оливомицин или митрамицин);

**C-сегменты** (*constitutive heterochromatin*, конститутивный гетерохроматин) ограничивают прицентромерные районы в обоих плечах хромосомы. Выявляются с помощью красителя Гимза после денатурации хромосом в насыщенном растворе гидроксида бария;

**T-сегменты** (*telomeric*, теломерные) расположены в теломерных районах хромосом. Детальное описание этих методов можно найти в многочисленных руководствах. Кроме того, многие лаборатории используют свои собственные модификации.

Природа химических различий, выявляемых с помощью методов дифференциального окрашивания, окончательно не установлена. Наиболее интересными являются две гипотезы, предлагающие объяснение этому феномену: так называемая ДНК-вая и белковая модели дифференциальной окраски. Первая исходит из данных о том, что различные участки хромосом человека отличаются по количественному содержанию А/Т и Г/Ц пар оснований. Далее, известно, что акрихин-иприт связывается преимущественно с АТ-богатыми участками, а акридиновый оранжевый, соединяясь с одноцепочечной ДНК, дает красную флуоресценцию. На основании этих данных можно предложить следующую картину: G(Q)-сегменты соответствуют участкам, богатым А/Т-парами, а R-сегменты соответствуют участкам, богатым Г/Ц-парами, которые более устойчивы к тепловой денатурации, чем А/Т-

богатые участки. Эта гипотеза не объясняет, однако, все особенности рисунка сегментации. Белковая же гипотеза исходит из данных о том, что протеолитическая обработка индуцирует появление *G*-сегментов. Но поскольку разные участки ДНК связаны в хромосомах с разными белками, можно полагать, что рисунок сегментации тем или иным образом зависит от особенностей целостного комплекса ДНК/белок.

В 1994 году Сайтохом Й. и Лаеммли Ю. К. была предложена еще одна гипотеза, объясняющая феномен дифференциальной окраски хромосом. Как уже говорилось, петли хроматина прикрепляются к белковому скелету хромосомы в строго определенных сайтах – встроенных местах прикрепления (см. раздел 2.1). Так вот, согласно предложенной гипотезе *G(Q)*-сегменты соответствуют тем регионам хромосомы, которые содержат наибольшее количество встроенных мест прикрепления для петель хроматина (в этом случае петли хроматина называют *G/Q* петлями). Те же регионы хромосомы, которые имеют наименьшую плотность встроенных мест прикрепления, будут соответствовать *R*-сегментам (петли хроматина в таком случае называют *R* петлями).

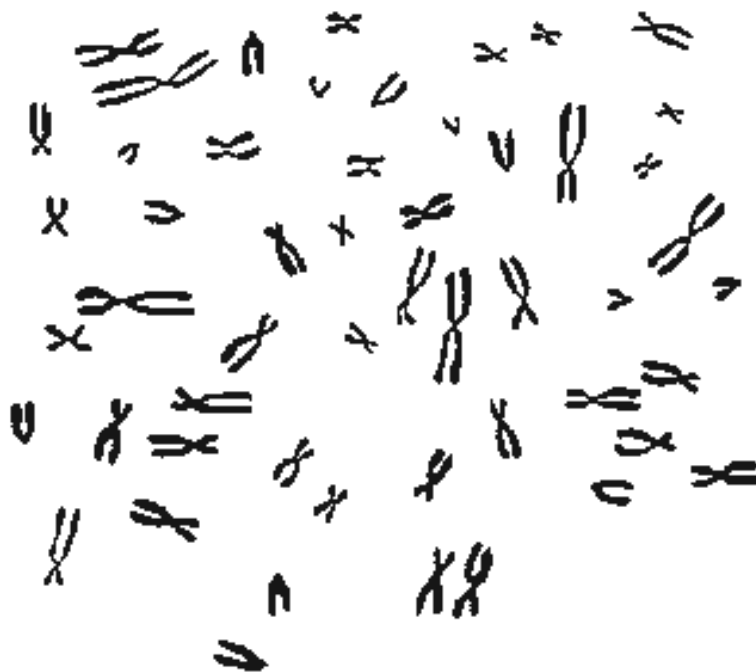
Для выявления районов ядрышкового организатора применяют метод серебрения, который специфичен именно для этих хромосомных регионов. Они видны как темные пятна на желто-коричневом фоне хромосом. При этом окрашиваются только те ядрышковые организаторы, которые функционировали в предшествующей интерфазе.

## **2.2.2. Нормальный кариотип человека в метафазе митоза**

### **2.2.2.1. Стандартное окрашивание**

В обычный световой микроскоп при использовании стандартных методов окрашивания метафазные хромосомы видны как палочковидные структуры разной длины с довольно постоянной толщиной (рис. 18). Толщина хромосомы нарушается только в одном месте – в области первичной перетяжки, или центромеры, – где она минимальна. Первичная перетяжка делит хромосому на два плеча, длина которых может быть различной. В том случае, когда длина двух плеч хромосомы одинакова, такую хромосому называют метацентрической. Если одно плечо хромосомы короче, чем другое, то такую хромосому называют субметацентрической. Палочковидную хромосому с очень коротким, почти незаметным вторым плечом называют акроцентриче-

ской. Кроме того, некоторые хромосомы имеют вторичную перетяжку (ядрышковый организатор), которая, как правило, расположена вблизи дистального конца хромосомы и отделяет маленький участок, спутник. Иногда такие хромосомы с вторичной перетяжкой называют спутничными или ядрышковыми.



**Рис. 18.** Нормальный кариотип человека. Стандартное окрашивание.

У человека известно 23 пары хромосом. Согласно Денверской классификации 1960 года все эти хромосомы располагаются и нумеруются в зависимости от их длины от 1 до 23. Однако в том же 1960 году Патау К. показал, что при использовании простых методов окрашивания в некоторых случаях хромосомы нельзя однозначно идентифицировать. Для решения этой проблемы он предложил идентифицировать пары хромосом на основании их относительной длины и положения центromеры. Кроме того, Патау К. предложил разбить все 23 пары хромосом человека на восемь групп – от *A* до *G*. Тем не менее, даже если использовать предложенные Патау К. подходы, а так же такой параметр хромосом, как центромерный индекс (отношение (в %) длины короткого плеча к длине всей хромосомы), то из всех хромосом человека можно идентифицировать только три пары метацентрических хромосом группы *A*, хромосому 16 из группы *E*, а так же Y-хромосому (на препаратах высокого качества удастся еще идентифицировать и хромосомы 17 и 18). Все же остальные хромосомы

групп *B*, *C* (включая *X*-хромосому), *D*, *F* и *G* идентифицируются только с помощью дифференциального окрашивания.

#### 2.2.2.2. Дифференциальное окрашивание

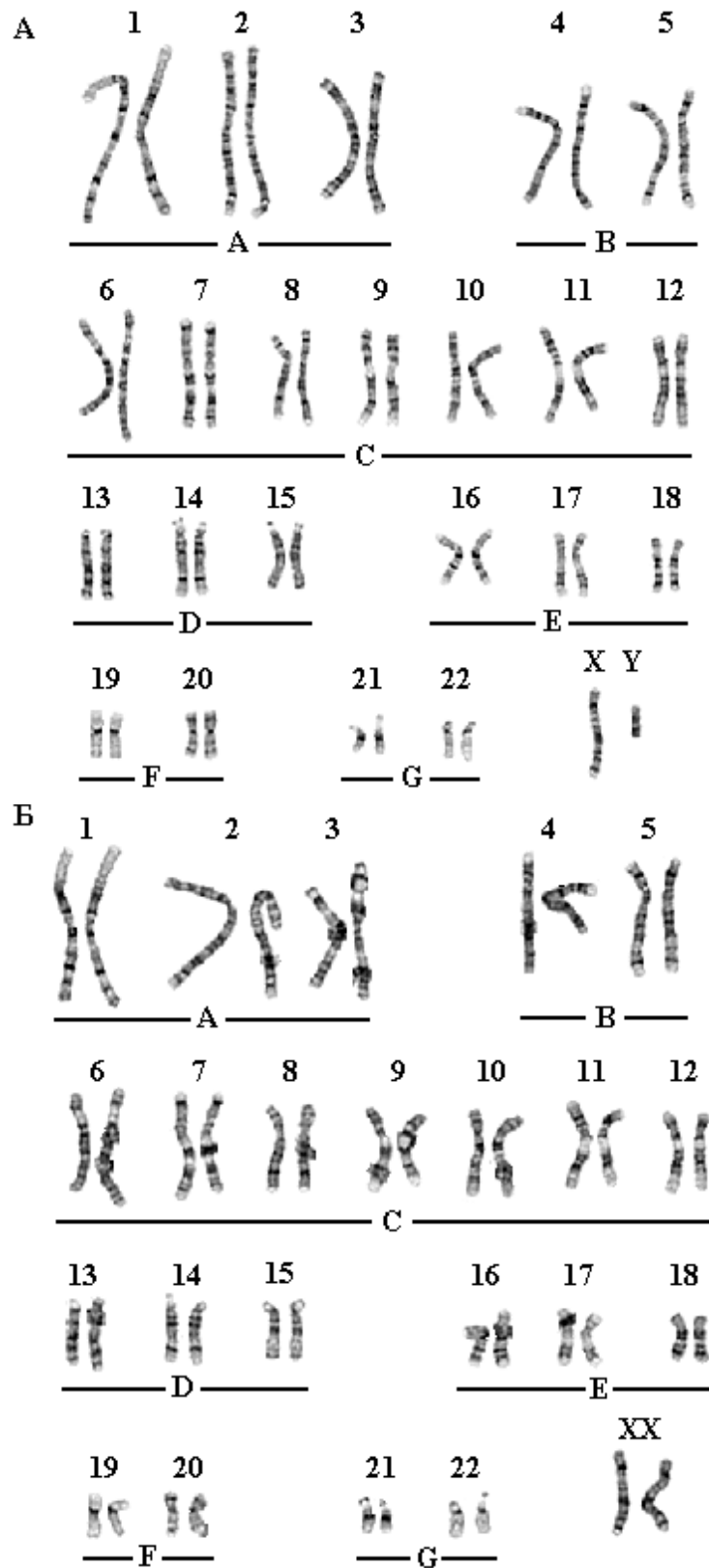
##### Номенклатура.

В соответствии с Парижской номенклатурой, принятой в 1971 году в Париже, короткое плечо хромосомы обозначается латинской буквой *p* (маленький, от фр. *petit*), а длинное – *q* (коса, от англ. *queue*). Каждое плечо хромосомы делят на несколько регионов, обозначаемых как *p1*, *p2*, *p3*, *q1*, *q2*, *q3* и т. д., причем их нумерацию ведут от центромеры. Каждый регион состоит из последовательных морфологически различимых элементов хромосомы (например, несколько сегментов и теломер). В зависимости от разрешающей способности микроскопа в каждом регионе можно идентифицировать сегменты (обозначаются как *p11*, *p12*, *p13* и т. д.), субсегменты (записываются *p11.1*, *p12.1*, *p13.2* и т. д.) и субсубсегменты (обозначаются как *p11.11*, *p12.12*, *p13.23* и т. д.). Так же как и в случае с регионами нумерацию сегментов, субсегментов и субсубсегментов ведут от центромеры. Центромера по Парижской номенклатуре обозначается "*cen*", а теломер – "*ter*".

##### Индивидуальные характеристики хромосом человека.

Нормальный кариотип человека (мужчины и женщины) представлен на рис. 19. Хромосомы, изображенные на этом рисунке, окрашены *G*-методом. Обобщенная схема (кариограмма) *G*-сегментации хромосом человека представлена на рис. 20. Соотношение реальной *G*- и *R*-сегментации со схематическим изображением *G*- и *R*-сегментов показано на рис. 21 (на примере хромосомы 1).

**Группа А (1-3).** Большие, метацентрические и субметацентрические хромосомы. Хромосома 1 – самая большая метацентрическая хромосома. Центромера расположена посередине, центромерный индекс равен 48-49. В проксимальной части длинного плеча вблизи центромеры часто обнаруживается вторичная перетяжка, что в ряде случаев приводит к удлинению *q*-плеча. Растянутый сегмент по сравнению с остальной частью хромосомы может выглядеть очень тонким, а по сравнению со сверхспирализованными метафазными – недоспирализованным (*uncoiler*). Признак недоспирализации, как и другие инди-



**Рис. 19.** Нормальный кариотип человека. Дифференциальное окрашивание (G-метод). А) Кариотип мужчины. Б) Кариотип женщины.

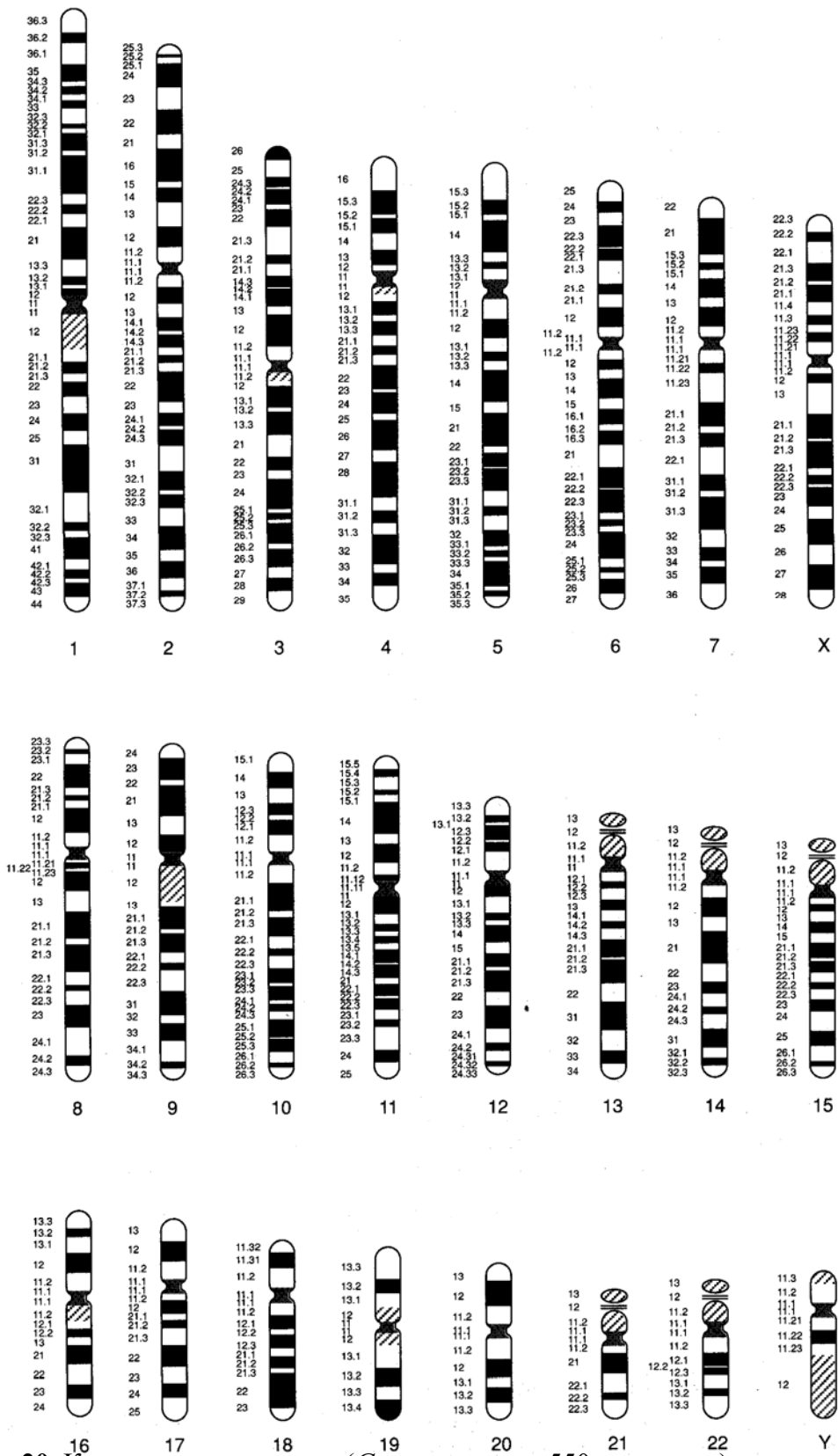
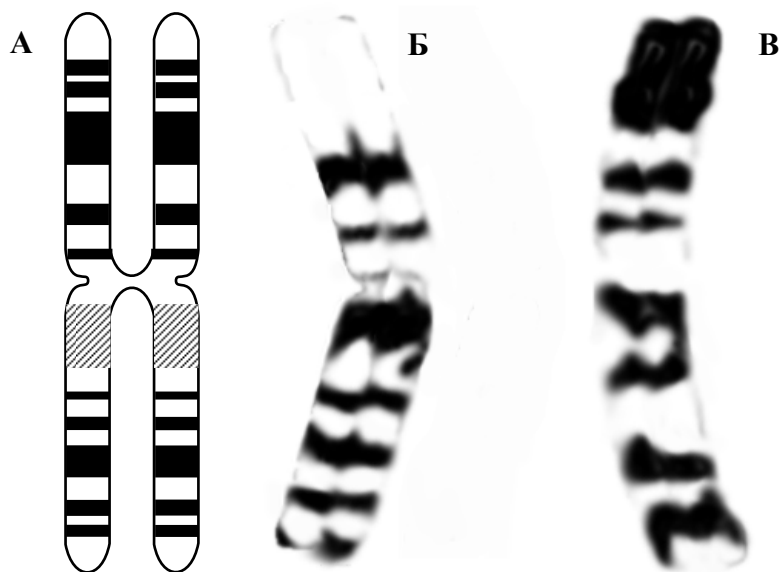


Рис. 20. Картиграмма человека (G-сегментация, 550 сегментов).





**Рис. 21.** Хромосома 1: сравнение реальной *G*- (Б) и *R*-сегментации (В) со схематическим изображением *G*- и *R*-сегментов (А).

видуальные особенности хромосомной морфологии, обнаруживается во всех соматических и в половине половых клетках, т. е. наследуется как простой доминантный признак. Локус *uncoiler-1*, определяющий этот признак, был использован для картирования локуса Даффи на хромосоме 1. При окрашивании *Q*-методом вторичная перетяжка флуоресцирует слабо, при использовании *G*-метода она выглядит как плотный сегмент.

Самой большой субметацентрической хромосомой является хромосома 2 (центромерный индекс 38-40). Радиоавтографическое исследование показало, что хромосома 2, особенно проксимальные районы обоих плеч, реплицируется относительно поздно.

Хромосома 3 с центромерным индексом 45-46 почти на 20% короче хромосомы 1 и, следовательно, легко идентифицируется. При окрашивании *Q*-методом в проксимальном районе ее длинного плеча часто выявляется ярко флуоресцирующий сегмент. Интенсивность флуоресценции значительно варьирует у разных индивидов, но постоянна во всех клетках для одного и того же хромосомного варианта.

**Группа В (4 и 5).** Большие субметацентрические хромосомы (центромерный индекс 24-30) не различаются между собой без радиоавтографии или дифференциального окрашивания. Согласно данным радиоавтографических исследований, хромосома 4 является поздно реплицирующейся по всей своей длине, в то время как в хромосоме 5 поздно реплицируется только короткое плечо. Рисунки распределе-

ния *R*-и *G*-сегментов у этих хромосом совершенно различны.

**Группа С (6-12).** Хромосомы среднего размера, субметацентрические. При стандартном окрашивании *X*-хромосому нельзя отличить от других хромосом этой группы. Хромосомы 6, 7, 8, 11 и 12 являются относительно субметацентрическими, их центромерный индекс 27-35. В хромосоме 9 часто обнаруживают вторичную перетяжку в проксимальной части длинного плеча. Все эти хромосомы легко идентифицируются с помощью *Q*- и *G*-окрашивания. Вторичная перетяжка хромосомы 9 не окрашивается ни акрихином, ни красителем Гимза. Хромосомы 11 и 12 обнаруживают очень сходный рисунок сегментации, что наводит на мысль об их общем происхождении и эволюции (они содержат локусы лактат-дегидрогеназы *A* и *B*, соответственно, общее происхождение которых предполагается на основании биохимических данных). Однако хромосома 11 заметно более метацентрическая, чем хромосома 12.

***X*-хромосома.** В противоположность другим хромосомам группы *C* *X*-хромосома значительно варьирует по длине. В целом она сходна с самыми длинными из *C* хромосом. Центромерный индекс высокий, но довольно вариабельный. В клетках женщин одна из двух *X*-хромосом реплицируется в поздней *S*-фазе, когда репликация других *C*-хромосом (за исключением ряда коротких сегментов) уже завершена. Важно, что поздним является не только завершение, но также и начало репликации ДНК.

**Группа D (13-15).** Эти хромосомы акроцентрические по форме, сильно отличаются от всех других хромосом человека. Центромерный индекс около 15 – наименьший в кариотипе человека. Все три пары содержат спутник. Короткое плечо этих хромосом обнаруживает сильную межхромосомную вариабельность. Длина проксимальных участков коротких плеч варьирует, спутники могут отсутствовать, а могут быть очень большими, могут ярко флуоресцировать, а могут и не давать флуоресценции. В некоторых случаях наблюдаются двойные (тандемные) спутники. Длинные плечи трех хромосом четко различаются по *Q*- и *G*-сегментам. Для выявления вариантов в группе *D-G* сравнивают длины короткого плеча этих хромосом с длиной короткого плеча хромосомы 18 в той же клетке. Плечо считают длинным, если оно такой же длины, как короткое плечо хромосомы 18, и очень длинным, если оно длиннее короткого плеча этой хромосомы. Большие спутники обозначают (*ps*+), двойные спутники (*pss*), укороченное *p*-плечо со спутниками или без них (*ph*-). Частота гетеромор-

физма гомологов в этой группе составляет 3,7% (8 из 216) в препаратах после дифференциального окрашивания и 2,3% (411 из 24400) в стандартных препаратах.

**Группа E (16-18).** Относительно короткие метацентрические или субметацентрические хромосомы. Хромосома 16 имеет центромерный индекс около 40. В среднем ее длина составляет чуть более одной трети длины хромосомы 1, но обнаруживает значительную изменчивость. В длинном плече примерно в 10% случаев выявляется вторичная перетяжка. Длина проксимального G-сегмента варьирует в зависимости от выраженности этой перетяжки. Хромосома 18 примерно на 5-10% короче хромосомы 17 и имеет более короткое длинное плечо (у хромосомы 17 центромерный индекс составляет 31 по сравнению с 26 у хромосомы 18). Хромосома 17 реплицируется рано, хромосома 18 - поздно.

**Группа F (19-20).** Эти две хромосомы имеют центромерный индекс в пределах 36-46. В стандартных препаратах они выглядят одинаково, но при дифференциальном окрашивании резко различаются.

**Группа G (21 и 22).** У этих маленьких акроцентрических хромосом центромерный индекс варьирует в пределах 13-33. Они легко различаются по рисунку сегментации. Изменчивость их коротких плеч так же значительна, как и в хромосомах группы D. Здесь классифицируют такие же варианты, как и в группе D. Флуоресценция спутников и коротких плеч может быть слабой, умеренной и сильной, так же как и интенсивность окрашивания при использовании G-метода. В выборке из 2444 новорожденных 3,5% обнаруживают удлинённые короткие плечи. Другие варианты, такие, как гигантские спутники, удлинённые или укороченные короткие плечи, встречаются намного реже. По данным некоторых исследователей, общая частота вариантов хромосом группы G составляет 1,8% по препаратам с дифференциальным окрашиванием и 1,6% в стандартных препаратах. Короткие плечи хромосом группы D и G содержат ядрышковый организатор и специфично окрашиваются методом серебрения.

**Y-хромосома.** Y-хромосома обычно (но не всегда) больше, чем хромосомы группы G, и хроматиды ее длинного плеча, как правило, лежат параллельно одна другой. Этим она отличается от хромосом группы G, у которых хроматиды длинных плеч часто образуют широкий угол. Центромера видна менее четко, спутники отсутствуют, размер длинного плеча сильно варьирует, и некоторые варианты его длины наследуются. Центромерный индекс варьирует от 0 до 26 (в сред-

нем ~16). При окрашивании акрихином обнаруживается довольно изменчивый ярко флуоресцирующий дистальный участок длинного плеча. Во многих случаях находят два сильно флуоресцирующих сегмента, реже – три. В популяционных исследованиях частота выраженных вариантов размеров длинного плеча *Y*-хромосомы составляет 5,6% (в выборке из 2444 новорожденных). В большинстве случаев *Y*-хромосома была удлиненной; у 5% новорожденных она оказалась длиннее *F*-хромосомы, у 0,33% – длиннее хромосомы 18; однако в 0,25% образцов была обнаружена очень маленькая *Y*-хромосома.

Обобщенная характеристика хромосом человека представлена в табл. 9. В этой таблице приведены данные по относительной длине (в процентах от длины гаплоидного набора аутосом) индивидуальных хромосом человека, их центромерному индексу и количеству ДНК.

**Таблица 9**

Общая характеристика хромосом человека.

<b>Хромосома</b>	<b>Относительная длина</b>	<b>Центромерный индекс</b>	<b>Количество ДНК (Мб)</b>
1	8,44 ± 0,433	48,36 ± 1,166	250
2	8,02 ± 0,397	39,23 ± 1,824	240
3	6,83 ± 0,315	46,95 ± 1,557	190
4	6,30 ± 0,284	29,07 ± 1,867	180
5	6,08 ± 0,305	29,25 ± 1,739	175
6	5,90 ± 0,264	39,05 ± 1,665	165
7	5,36 ± 0,271	39,05 ± 1,771	155
8	4,93 ± 0,261	34,08 ± 1,975	135
9	4,80 ± 0,244	35,43 ± 2,559	130
10	4,59 ± 0,221	33,95 ± 2,243	130
11	4,61 ± 0,227	40,14 ± 2,328	130
12	4,66 ± 0,212	30,16 ± 2,339	120
13	3,74 ± 0,236	17,08 ± 3,227	110
14	3,56 ± 0,229	18,74 ± 3,596	105
15	3,46 ± 0,214	20,30 ± 3,702	100
16	3,36 ± 0,183	41,33 ± 2,740	85
17	3,25 ± 0,189	33,86 ± 2,771	80
18	2,93 ± 0,164	30,93 ± 3,044	75
19	2,67 ± 0,174	46,54 ± 2,299	70
20	2,56 ± 0,165	45,45 ± 2,526	65
21	1,90 ± 0,170	30,89 ± 5,002	55
22	2,04 ± 0,182	30,48 ± 4,932	60
X	5,12 ± 0,261	40,12 ± 2,117	140
Y	2,15 ± 0,137	27,17 ± 3,182	60

### **2.2.2.3. Высокорастворяющее дифференциальное окрашивание**

Хромосомы в профазе и прометафазе конденсированы не столь сильно, как метафазные хромосомы. При обработке культуры лимфоцитов метотрексатом (для частичной синхронизации клеточного цикла) можно накопить достаточное число клеток, находящихся в профазе и прометафазе. Сокращение времени инкубации с колцемидом позволяет избежать сильной конденсации. В препаратах таких хромосом отдельные сегменты, выявляемые стандартными методами, можно подразделить на субсегменты и даже на субсубсегменты. Степень разрешения зависит от стадии, на которой клетки были зафиксированы, а также разрешающей способности микроскопа. Некоторые авторы описывают свыше 2000 сегментов в хромосомах человека, однако, обычно в поздней профазе можно увидеть 800-1200 сегментов. Хотя этот метод не заменяет стандартный, используемый при рутинной диагностике, однако он полезен для более точной идентификации точек разрывов и мелких аберраций, например в случае наследуемых сбалансированных и несбалансированных транслокаций или особенно в цитогенетике опухолей.

### **2.2.2.4. Гетероморфизм хромосом**

Морфология отдельных хромосом не всегда одинакова у разных индивидов. Гетероморфизм особенно выражен в отношении размера спутничной области акроцентрических хромосом, длины Y-хромосомы, особенно ее гетерохроматинового участка, и вторичных перетяжек хромосом 1 и 9. Характерен он и для гетерохроматиновых сегментов других хромосом. При анеуплоидии гетероморфизм гомологов по гетерохроматиновым районам можно использовать для выяснения происхождения данной хромосомы от одного из родителей.

## **2.3. Функциональное значение хромосом**

Хромосомы человека выполняют две биологически важные функции: обеспечивают равномерное распределение наследственного материала между двумя дочерними клетками во время митотического деления и распределение и перетасовку наследственного материала во время мейотического деления клеток. Выполнение этих функций возможно благодаря трем главным структурным элементам хромосом –

наличие у них центромерных регионов, теломерных концов и точек начала репликации ДНК.

### 2.3.1. Центромерные регионы хромосом

Центромера, или первичная перетяжка, морфологически выглядит как утончение тела хромосомы, которое делит ее на два плеча – короткое и длинное. Главной задачей этого структурного элемента хромосом является корректная сегрегация (разделение) сестринских хроматид по двум дочерним клеткам во время митотического или мейотического деления исходной родительской клетки. Известны случаи утери хромосомами центромерных регионов, что приводит к образованию ацентрических хромосомных фрагментов. Такие фрагменты элиминируются из клетки во время ее последующих делений, так как они не способны взаимодействовать с нитями веретена деления и корректно распределяться по двум вновь формирующимся клеткам.

Во время поздней профазы митоза (или профазы I мейоза) на центромере образуется пара дисковидных кинетохоров – по одному на каждую сестринскую хроматиду. В дальнейшем к этим структурам присоединяются многочисленные кинетохорные микротрубочки, тем самым, формируя физическую связь между хромосомой и двумя полюсами веретена деления. В анафазе кинетохорные микротрубочки обеспечивают расхождение сестринских хроматид к противоположным полюсам клетки, причем ключевую роль в этом процессе играют как раз кинетохоры, которые контролируют процессы сборки и разборки микротрубочек.

Поскольку положение центромеры строго постоянно для каждой индивидуальной хромосомы, то можно предположить, что ее строение и, в конечном итоге, функция связаны с определенными последовательностями ДНК. Отчасти это предположение подтверждается экспериментальными данными. Так, установлено, что центромерный гетерохроматин представлен главным образом сателлитной ДНК. Однако, не понятно, почему именно такой класс ДНК присутствует в центромерной области хромосом и как такая ДНК определяет свойства этих структур.

### 2.3.2. Теломерные концы хромосом

Теломеры – это специализированные структуры, расположенные на концах хромосом. Главным структурным компонентом теломерных концов являются кластеры коротких tandemно повторяющихся последовательностей ДНК. В отличие от центромерной ДНК, которая весьма вариабельна у разных видов, последовательности теломерной ДНК эволюционно очень консервативны. У большинства изученных организмов "коровая" единица теломерной ДНК состоит из 5-7-и нуклеотидов: ТТГГГГ (*Paramecium*), ТАГГГ (*Trypanosoma*), ТТТАГГГ (*Arabidopsis*) и ТТАГГГ (*Homo sapiens*). Tandemно повторяясь, эти пента-гептануклеотиды и образуют кластеры протяженностью от 10 до 15 Кб.

Как уже говорилось (см. главу 1), транскрипционной активностью теломерная ДНК не обладает. Однако она, являясь главным компонентом теломерных концов хромосом, принимает участие в выполнении последними их специфических функций: препятствие "слипанию" концов хромосом, полная репликация концевых участков хромосомной ДНК, обеспечение пространственной организации хромосом в ядре и пространственной организации самого ядра, а также контроль количества делений клетки.

В норме теломеры являются обязательным компонентом эукариотических хромосом. При этом ДНК-белковый комплекс, составляющий их основу, надежно защищает хромосому от дегградации и "слипания" ее концов с концами других хромосом. В тех же случаях, когда происходит потеря теломерных фрагментов, хромосомы приобретают нестабильность, их концы могут "слипаться", рекомбинировать и дегградировать.

С теломерами связана еще одна проблема существования хромосом. Известно, что при репликации ДНК одна из ее нитей, лидирующая, синтезируется непрерывно, а вторая, запаздывающая, фрагментами. Причем в последнем случае для инициации синтеза фрагмента запаздывающей цепи необходим РНК-праймер, который в свою очередь синтезируется по ДНК-матрице лидирующей цепи. Так как ДНК эукариотических хромосом линейна, то возникает проблема репликации небольших концевых участков запаздывающей цепи. Эта проблема решается с помощью специфического РНК-содержащего фермента – теломеразы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы). РНК, входящая в состав этого фермента, является матрицей для синтеза лидирующей це-

пи ДНК. После удлинения конца этой цепи создаются условия для синтеза дополнительных РНК-праймеров на лидирующей цепи как матрице. В последующем дополнительно синтезированные РНК-праймеры служат затравками для работы ДНК-полимеразы  $\alpha$ , которая и достраивает запаздывающую цепь (рис. 22).

Проблема репликации концов хромосомальной ДНК и участие в этом процессе теломеразы в последние годы активно обсуждается в связи с еще одним вопросом – вопросом взаимосвязи между теломерами и старением клетки. Дело в том, что в норме теломеразная активность обнаруживается только в активно делящихся стволовых клетках организма (например, в плюрипотентных стволовых клетках крови), а в слабо- или неделящихся дифференцированных клетках теломераза не работает. В связи с этим с каждым новым делением клетка, лишенная теломеразной активности, теряет небольшой фрагмент теломера. Когда же теряется весь теломер, то клетка перестает делиться и вскоре погибает. Точный механизм такого контроля количества делений дифференцированных клеток пока не установлен.

Наконец, теломерный гетерохроматин, взаимодействуя с белками ядерной пластинки, обеспечивает прикрепление хромосом к ядерной оболочке, тем самым пространственно организуя их в ядре.

### **2.3.3. Точки начала репликации хромосом**

К сожалению, у человека пока не обнаружены уникальные точки начала репликации хромосом наподобие аутономно реплицирующихся последовательностей дрожжей. На эту роль претендует недавно идентифицированная с помощью компьютерного анализа последовательность WAWTTDDWWWDHGWGWHMAWTT (где W = A или T; D = A, G или T; H = A, Ц или T; M = A или Ц), однако, экспериментально это предположение еще не подтверждено. Некоторые авторы полагают, что хромосомы человека имеют множество сайтов начала репликации, которые объединены в регион протяженностью несколько десятков килобаз. Однако и эта гипотеза пока экспериментальным путем ни подтверждена, ни опровергнута.





### ГЛАВА 3. РЕАЛИЗАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

---

Процессы транскрипции генов, процессинга РНК, трансляции и посттрансляционной модификации белковых продуктов у эукариот, равно как и у человека, хотя и не до конца, но достаточно глубоко и подробно изучены и изложены в многочисленных руководствах. В связи с этим в данной главе мы не будем дополнительно рассматривать перечисленные выше этапы реализации наследственной информации, а более подробно остановимся на проблеме контроля экспрессии генов у человека.

Действительно, вопросы контроля генной активности в настоящий момент находятся на стадии интенсивной разработки и привлекают к себе все больше и больше внимания. По ориентировочным оценкам, в тканях человека работает в среднем около 2-3% всех генов, в клетках печени – около 5%, а в клетках мозга – примерно 9-10%. Это означает, что в различных соматических клетках человека транскрибируется 1,4-8 тыс. генов. Значительная часть контролируемых ими белков необходима для обеспечения жизнедеятельности самих клеток. В связи с этим такие гены называли "генами домашнего хозяйства". В процессе же онтогенеза и клеточной дифференцировки в разных тканях организма происходит избирательная активация других генов, тканеспецифических, что, в конечном итоге, обуславливает значительные межклеточные различия в наборе белков и в скорости их синтеза. Как осуществляется контроль такой дифференциальной активности генов? К сожалению, ответ на этот вопрос мы знаем лишь в общих чертах и наши знания об этом феномене остаются до сих пор далеко не полными.

Тем не менее, согласно современным представлениям, регуляция экспрессии генов в цепочке "ген-РНК-белок" может осуществляться на различных молекулярных и надмолекулярных уровнях: на уровне транскрипции гена, процессинга РНК, ее трансляции, на уровне посттрансляционной модификации белковых продуктов и на эпигенетическом уровне. Так, установлено, что степень компактизации хроматина может существенно влиять на транскрипционную активность гена. Аналогичным образом, метилирование ДНК может также модулировать экспрессию гена, вплоть до ее полной блокады. Многообразие механизмов контроля генной активности на всех уровнях экспрессии генов представлено в табл. 10, а их подробный анализ проводится ниже.

Таблица 10

Многообразие механизмов контроля генной активности у человека.

Уровень контроля	Механизм	Примеры
Транскрипция	Взаимодействие тканеспецифических транскрипционных факторов с цис-элементами генов	См. табл. 11
	Взаимодействие гормонов, ростовых факторов и интермедиатов с отвечающими элементами генов	Глюкокортикоиды, ретиноевая кислота, цАМФ
	Использование альтернативных промоторов	Ген дистрофина
	Мультигенные транскрипционные единицы	Гены 28S, 18S и 5,8S рРНК, митохондриальные гены
Процессинг РНК	Тканеспецифический альтернативный сплайсинг РНК	РНК-транскрипт гена кальцитонина
	Тканеспецифическое альтернативное полиаденилирование РНК	РНК-транскрипт гена кальцитонина
	Тканеспецифическое редактирование РНК	РНК-транскрипт гена <i>aroB</i>
Трансляция	Избирательная деградация мРНК	мРНК гена <i>TfR</i>
	Избирательная трансляция мРНК	мРНК гена ферритина
Посттрансляционная модификация белков	Избирательный частичный протеолиз	Про-интерлейкин-1 $\beta$
Эпигенетический уровень	Межклеточное контактное взаимодействие	Тканеспецифические гены
	Метилирование ДНК	Гены глобинов, ген тимидинкиназы, ген аденинфосфорибозилтранс-феразы, ген к-цепи иммуноглобулинов
	Конкуренция за энхансеры или сайленсеры	Гены глобинов, ген <i>H19</i> , ген <i>IGF2</i>
	Компактизация хроматина	Ген <i>PAX6</i>
	Эффект положения гена	Ген <i>FSHD</i>
	Геномный импринтинг	См. таблицу 12
	Инактивация X-хромосомы	X-сцепленные гены
	Аллельное исключение	Гены иммуноглобулинов, гены T-клеточного рецептора

### **3.1. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне транскрипции**

На этом уровне контроля генной активности описано четыре механизма: взаимодействие тканеспецифических транскрипционных факторов с цис-элементами генов, взаимодействие гормонов, ростовых факторов и интермедиатов с отвечающими элементами генов, использование при транскрипции альтернативных промоторов и организация генов в мультигенные транскрипционные единицы.

#### **3.1.1. Взаимодействие тканеспецифических транскрипционных факторов с цис-элементами генов**

В отличие от геномов прокариот, геном человека настолько сложен, что добиться точного контроля экспрессии множества генов с помощью одного промотора и ограниченного количества транскрипционных факторов оказалось просто невозможным. Эта проблема была решена с помощью двух механизмов: сложной системы взаимодействующих цис-элементов генов и не менее сложной системы высокоспецифичных транскрипционных факторов.

Как правило, каждый индивидуальный ген ядерного генома человека содержит не один, а три и более классов регуляторных цис-элементов – от промотора до энхансера и сайленсера. Причем, как это уже обсуждалось в главе 1, каждый такой цис-элемент может содержать множество коротких (обычно 8-10 пар оснований) последовательностей ДНК – сайтов распознавания транскрипционных факторов, – в общей сложности занимающих область в несколько сот пар нуклеотидов. Сами же цис-элементы, контролирующие работу данного гена, могут находиться на значительном удалении друг от друга. Взаимодействие всех названных компонентов системы цис-элементов и позволяет достаточно точно регулировать активность генов.

Кроме того, для координации экспрессии множества генов, порой находящихся на разных хромосомах, они группируются в кластеры, а их активность контролируется одним общим регуляторным элементом. Классический пример такой системы контроля уже рассматривался нами в главе 1, когда шло обсуждение супергенного семейства глобинов. Каждый из кластеров этого супергенного семейства содержит по одному локус-контролирующему региону, который, взаимодействуя с эритроид-специфическими транскрипционными факторами (на-

пример, *GATA-1* или *NF-E2*), координирует работу всего семейства.

Транскрипционные факторы, идентифицированные к настоящему моменту в клетках человека, весьма разнообразны (табл. 11). Однако, не смотря на все свое многообразие, тканеспецифические транскрипционные факторы обладают рядом схожих специфических свойств, благодаря которым они и способны выполнять возложенную на них функцию – контролировать дифференциальную активность генов. К таким специфическим свойствам относятся:

1) пространственная организация транскрипционного фактора и сайта связывания этого фактора в регуляторном элементе гена находятся в полном соответствии (комплементарности) друг с другом (рис. 23 А);

2) взаимодействие между транскрипционным фактором и сайтом связывания осуществляется благодаря ионной, гидрофобной и гидрофильной связям, причем усиление такой связи и, как следствие, повышение специфичности взаимодействия, происходит за счет множественности внутренних точек контакта (обычно до 20 на одну комплементарную пару) (рис. 23 Б);

3) главным консервативным элементом третичной структуры любого транскрипционного фактора является  $\alpha$ -спираль (рис. 23 В);

4) большинство транскрипционных факторов имеют два и более функциональных домена, один из которых отвечает за связывание с ДНК, а второй – за специфическую активность транскрипционного фактора (см. рис. 23 В);

5) большинство транскрипционных факторов существует в форме гомо- или гетеродимеров (рис. 23 Г).

Следует отметить, что наличие общих свойств не исключает частные особенности транскрипционных факторов, благодаря которым их можно разделить на четыре больших класса. К первому классу относятся транскрипционные факторы, в основу которых положена так называемая *НТН*-структура (от англ. helix-turn-helix). *НТН*-структура состоит из двух коротких  $\alpha$ -спиралей, разделенных небольшим коротким участком. Этот участок позволяет всей структуре изгибаться, в результате чего две  $\alpha$ -спирали располагаются под некоторым углом друг к другу. (рис. 24 А). Именно *НТН*-структура ответственна за связывание всего транскрипционного фактора с ДНК, причем ключевую роль здесь играют  $\alpha$ -спиральные домены белка.

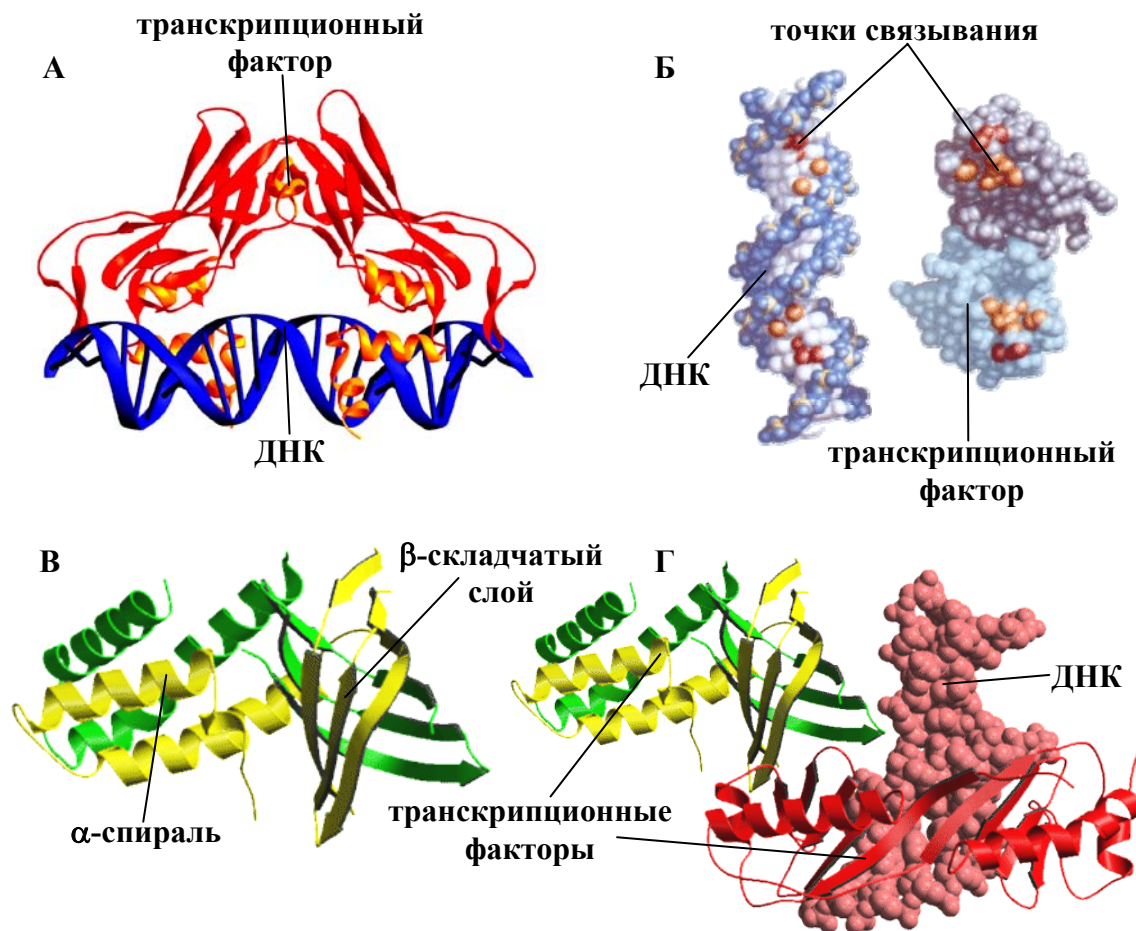
Таблица 11

Многообразие тканеспецифических транскрипционных факторов человека

Транскрипционный фактор	Сайт связывания	Тканеспецифическая экспрессия
<i>AP2</i>	ЦЦЦ(А/Ц)N(Ц/Г) <sub>3</sub>	Преимущественно в клетках нервной системы, кератиноциты
<i>GATA-1</i>	(А/Т)ГАТА(А/Г)	Эритроидные клетки
<i>NF-E2</i>	ТГАЦТЦАГ	Эритроидные клетки
<i>HNF-1</i>	ГТТААТНАТТААЦ	Клетки печени, почек, желудка, кишечника и селезенки
<i>HNF-5</i>	Т(Г/А)ТТТГ(Ц/Т)	Печень
<i>Ker1</i>	ГЦЦТГЦАГГЦ	Кератиноциты
<i>MBF-1</i>	(Ц/Т)ТАААААТАА(Ц/Т) <sub>3</sub>	Миоциты
<i>MEF-2</i>	(Ц/Т)ТА(А/Т)АААТА(А/Г)	Миоциты
<i>MyoD</i>	ЦААЦТГАЦ	Миобласты, мышечные волокна
<i>OTF-2</i>	АТГЦАААТ	Лимфоидные клетки
<i>TCF-1</i>	(Ц/А)А(Ц/А)АГ	Т клетки

Ко второму классу относятся транскрипционные факторы, содержащие *HLH*-структуру (от англ. helix-loop-helix). *HLH*-структура содержит две  $\alpha$ -спирали (одну короткую и одну длинную), которые соединены между собой относительно длинной петлей. Такая петля позволяет спиральным доменам свободно упаковываться в белковой молекуле напротив друг друга, причем практически в одной плоскости (рис. 24 Б). *HLH*-структура обеспечивает взаимодействие транскрипционного фактора с ДНК, а также его гомодимеризацию с другим аналогичным, но усеченным (с укороченной  $\alpha$ -спиралью, ответственной за взаимодействие с ДНК), белковым фактором. Такой гомодимер уже не способен взаимодействовать с ДНК и, как следствие, уходит с последней. Некоторые исследователи полагают, что рассмотренное выше явление гомодимеризации является механизмом контроля активности самих транскрипционных факторов.

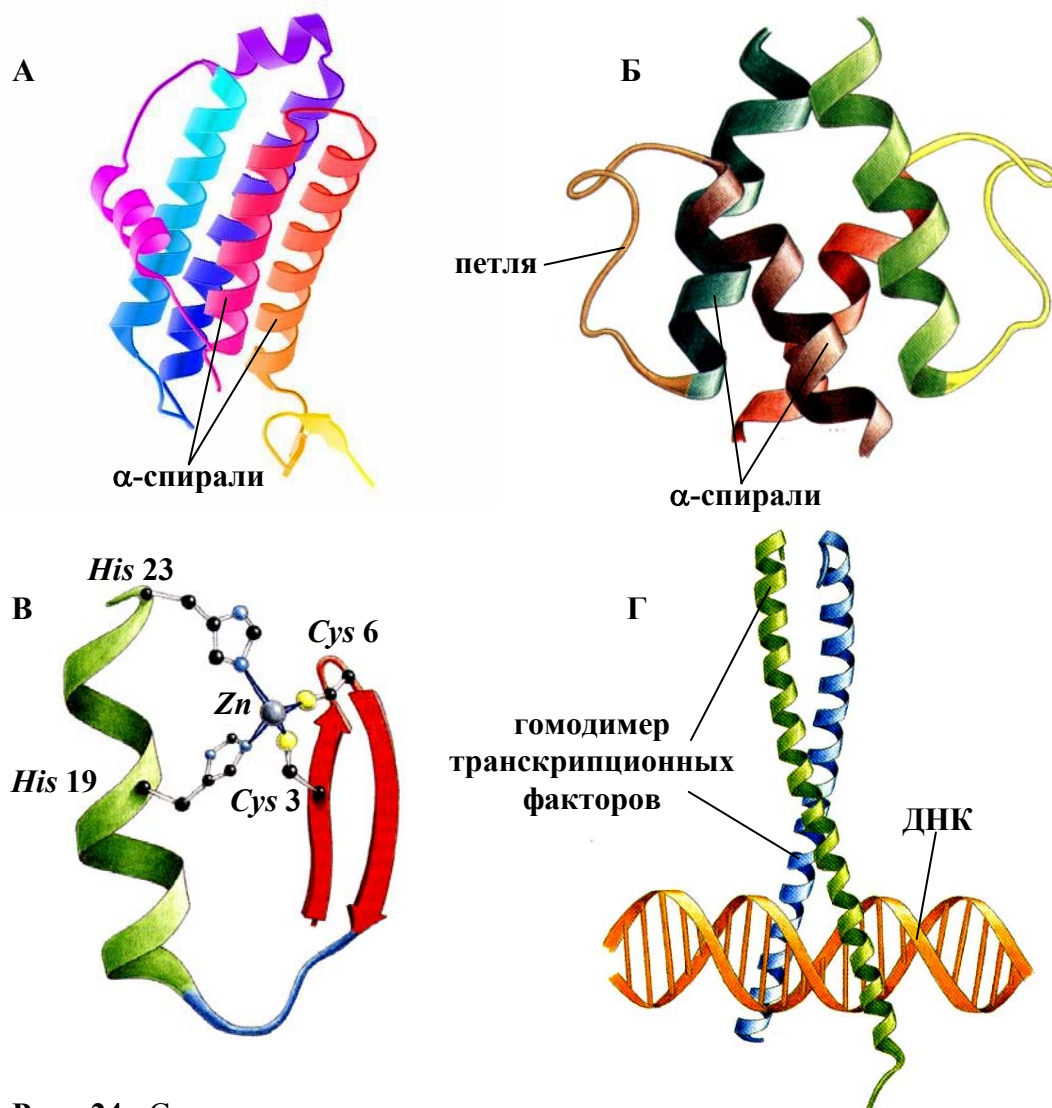
Транскрипционные факторы третьего класса содержат  $Zn^{2+}$ -связывающий карман, который образован пептидной петлей – тандемно повторяющейся последовательностью из четырех консервативных аминокислот (рис. 24 В). Чаще всего такая коровая последовательность состоит либо из двух остатков цистеина и двух остатков гистидина, либо из четырех остатков цистеина. В любом случае остатки аминокислот способны достаточно прочно удерживать в таком кармане ионы  $Zn^{2+}$ . Все вместе – ионы  $Zn^{2+}$  и пептидная петля, –



**Рис. 23.** Общие структурные особенности транскрипционных факторов человека. А) Комплементарное связывание транскрипционного фактора с ДНК. Б) Множество точек связывания между транскрипционным фактором и ДНК. В) Структурные домены транскрипционных факторов. Г) Гетеродимеризация транскрипционных факторов.

в дальнейшем укладываются либо в  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -слой, либо в две  $\alpha$ -спирали. Как и в двух предыдущих случаях, за взаимодействие с ДНК отвечает именно  $\alpha$ -спираль транскрипционного фактора.

Наконец, четвертый класс транскрипционных факторов представлен лейцин-обогащенными белками, у которых на один остаток лейцина в среднем приходится семь других аминокислот. Как правило, транскрипционные факторы этого класса существуют в виде гомодимеров. Мономеры такого гомодимера в своей основе имеют  $\alpha$ -спирали (рис. 24 Г), которые, взаимодействуя друг с другом, в итоге образуют Y-подобную структуру.



**Рис. 24.** Строение четырех классов транскрипционных факторов человека. А) *NTH*-подобный транскрипционный фактор. Б) *HLH*-подобный транскрипционный фактор. В) Цинк-связывающий транскрипционный фактор. Г) Лейцин-обогащенные транскрипционные факторы.

### 3.1.2. Взаимодействие гормонов, ростовых факторов и интермедиатов с отвечающими элементами генов

Отвечающие элементы – это специфические последовательности ДНК, которые, как правило, находятся перед промотором примерно за 1 Кб до точки начала транскрипции. Такого рода регуляторные элементы найдены только у тех генов, которые подконтрольны либо специфическим внешним факторам (например, гормонам и ростовым факторам), либо специфическим внутренним факторам (например,

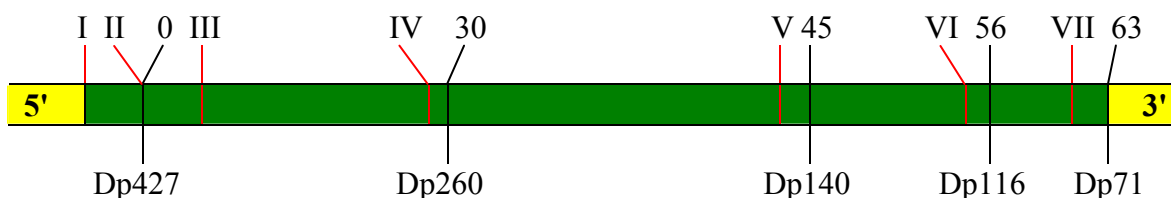


цАМФ). Причем каждый конкретный ген имеет строго специфический отвечающий элемент, взаимодействующий только со строго специфическим фактором. Так, у человека обнаружены гены, отвечающие элементы которых взаимодействуют только с глюкокортикоидами. Другие же гены подконтрольны только ретиноевой кислотой, цАМФ и т. д. При этом взаимодействие отвечающего элемента с адекватным фактором запускает экспрессию гена, который не подконтролен другим сигналам.

### 3.1.3. Использование альтернативных промоторов

У человека известно ряд генов, которые имеют два или более альтернативных промотора. В связи с этим в разных типах клеток работа одного и того же гена может сопровождаться образованием несколько разных белковых продуктов. Классическим примером гена, содержащего несколько альтернативных промоторов, является ген дистрофина человека.

Этот ген содержит, по меньшей мере, три внешних и четыре внутренних промотора, каждый из которых работает в строго индивидуальном типе клеток (рис. 25). Причем полноразмерный белок весом 427 кДа дают только внешние промоторы (I, II и III, работающие в кортикальных клетках, миоцитах и клетках Пуркинье, соответственно), под контролем которых считывание гена начинается с первого экзона. Внутренние же промоторы (IV, V, VI и VII, работающие в клетках сетчатки, нейронах центральной нервной системе, швановских клетках и клетках глии, соответственно) контролируют считывание гена дистрофина с последующих экзонов: IV промотор контролирует считывание с 30 экзона, V – с 45, VI – с 56 и VII – с 63 экзона. В результате получается еще 4 новых белковых продукта – 260, 140, 116 и 71 кДа, соответственно, – которые различаются между собой не только по строению, но и по активности.



**Рис. 25.** Альтернативные промоторы гена дистрофина человека. В верхней строке указаны номера промоторов и номера экзонов, с которых начинается считывание гена. В нижней строке указаны белковые продукты.

### **3.1.4. Организация генов в мультигенные транскрипционные единицы**

Подавляющее большинство генов человека транскрибируется индивидуально, как дискретные относительно самостоятельные элементы генома. В таких случаях понятие "транскрипционная единица" и понятие "ген" совпадают. Однако исследования последних лет показали, что и в этом правиле есть свои исключения, когда сразу несколько генов считываются на одну про-РНК, и лишь в последующем, после процессинга такого мультигенного РНК-транскрипта, получают транскрипты индивидуальных генов. В этом случае понятие "транскрипционная единица" и понятие "ген" не полностью идентичны. Примеры такого рода мультигенных транскрипционных единиц нами уже рассматривались ранее (см. главу 1): такого рода ситуация касается прежде всего митохондриальных генов и генов рибосомальных РНК. В чем биологический смысл такого явления до конца не выяснено. Некоторые исследователи полагают, что таким способом можно координировать синтез необходимых молекул РНК в необходимом и, самое главное, равном количестве.

## **3.2. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне процессинга РНК**

В настоящее время известно три механизма контроля дифференциальной активности генов человека на уровне процессинга РНК: тканеспецифический альтернативный сплайсинг РНК, тканеспецифическое альтернативное полиаденилирование РНК и тканеспецифическое редактирование РНК.

### **3.2.1. Тканеспецифический альтернативный сплайсинг РНК**

Альтернативному сплайсингу подвергаются многие гены человека, причем в ряде случаев наблюдается специфичность этого процесса по отношению к определенному типу тканей. При этом альтернативный сплайсинг может приводить к образованию либо очень схожих и по строению и по выполняемым функциям изоформ одного и того же белка, либо к совершенно разным продуктам. Классическим примером последнего случая является альтернативный сплайсинг про-мРНК гена кальцитонина *CALC* (рис. 26). В клетках щитовидной железы обра-



### 3.2.2. Тканеспецифическое альтернативное полиаденилирование РНК

Альтернативному полиаденилированию могут подвергаться многие гены человека, в том числе и рассмотренный выше в качестве примера ген кальцитонина. В ряде случаев процессы альтернативного полиаденилирования сопряжены с альтернативным сплайсингом РНК-транскрипта и приводят к образованию совершенно разных конечных продуктов. В разобранный выше примере аденилирование про-мРНК может происходить по двум альтернативным сайтам – после экзона 4 и после экзона 6 (см. рис. 26). В первом случае конечным результатом является синтез кальцитонина, а во втором – пептида *CGRP*.

### 3.2.3. Тканеспецифическое редактирование РНК

Редактирование РНК – это одна из форм процессинга про-мРНК, которая сводится к ферментативному удалению, вставке или замене отдельных нуклеотидов в молекуле РНК. Первые два варианта редактирования РНК обнаружены у некоторых микроорганизмов и плесневых грибов. У млекопитающих, и у человека, обнаружены только третий вариант редактирования – замена отдельных нуклеотидов, – причем наиболее часто встречаются варианты замены типа Ц→У, У→Ц и А→инозин (рис. 27). Установлено, что у человека такого рода редактированию подвергаются про-мРНК *WT1*, *apoB*, рецептора глутамата и некоторых других генов.

Наиболее изученным на сегодняшний момент является процесс редактирования РНК-транскрипта человеческого гена *apoB*. В печени этот ген кодирует мРНК размером 14,1 Кб, при трансляции которой образуется белковый продукт *apoB100*, состоящий из 4536 аминокислот. В кишечнике же ген *apoB* кодирует РНК-продукт размером всего 7 Кб, причем этот транскрипт содержит стоп-кодон, которого нет в исходном гене. При трансляции такой мРНК образуется белок *apoB48*, который идентичен с белком *apoB100* только по первым 2152 аминокислотам, а остальные аминокислоты у него просто отсутствуют, так как из-за нового стоп-кодона трансляция прерывается именно в этой точке (рис. 28).

Механизм редактирования РНК-транскрипта *apoB* гена сводится к следующему. Во время процессинга про-мРНК гена *apoB* мульти-

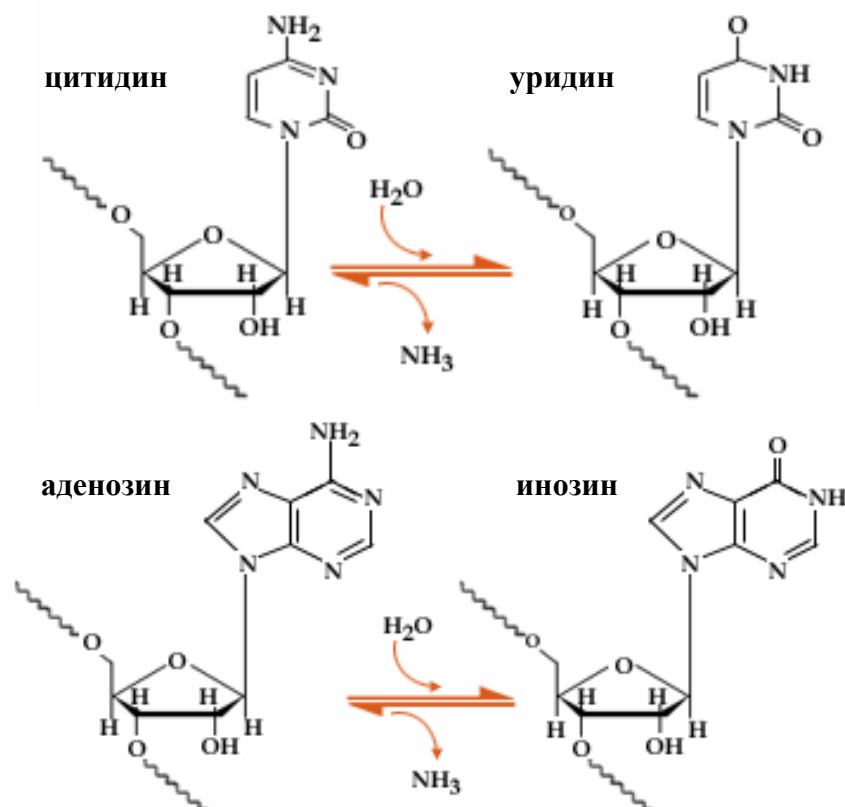


Рис. 27. направления замен нуклеотидов во время редактирования мРНК генов человека.

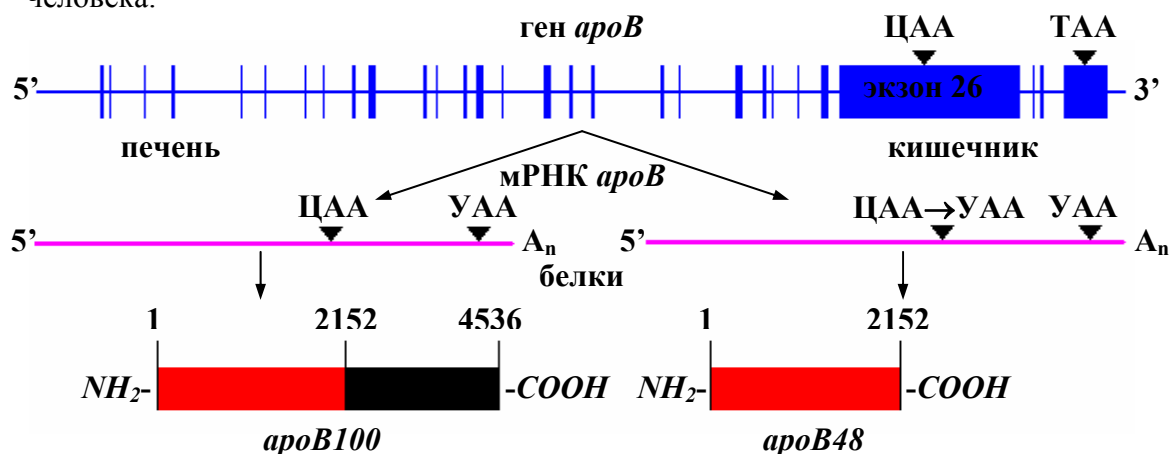


Рис. 28. РНК-редактирование транскрипта гена *aroB*.

субъединичный ферментный комплекс (эдитосома), в состав которого входит белок *AROBES-1* (*p27*), осуществляет специфическое дезаминирование цитидина в 6666-м положении РНК-транскрипта (рис. 29). В последующем происходит восстановление нуклеотида, но уже до уридина и смысловой кодон ЦАА заменяется на стоп-кодон УАА. Установлено, что упомянутый белок *p27* обладает каталитической активностью и входит в семейство цитидин-дезаминаз, представители которого наиболее хорошо изучены у прокариот.

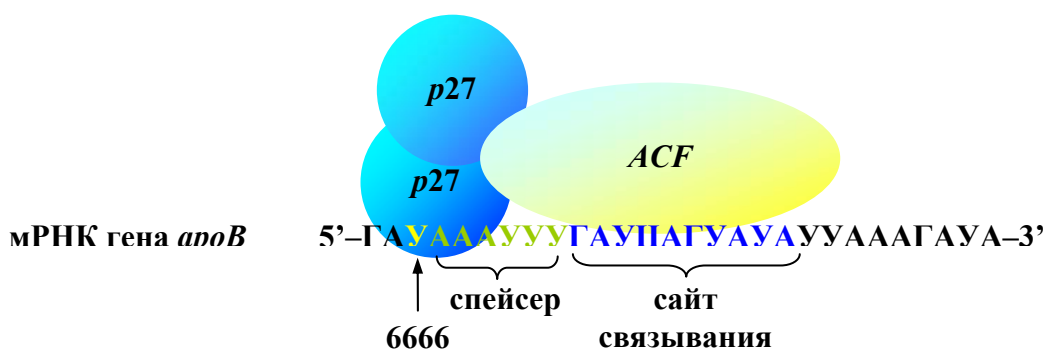


Рис. 29. Строение эдитосомы, осуществляющей редактирование мРНК гена *apoB*.

### 3.3. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне трансляции

О механизмах, регулирующих экспрессию генов человека на уровне трансляции, известно относительно немного. Установлено только, что это может осуществляться через избирательную (возможно, тканеспецифическую) деградацию или трансляцию отдельных видов мРНК.

#### 3.3.1. Избирательная деградация мРНК

Стабильность мРНК человеческих генов зависит от наличия особых последовательностей в ее 5'- и 3'-нетранслируемых участках. Сразу же следует отметить, что прямых данных о влиянии 5'-нетранслируемых участков мРНК человека на ее стабильность пока не получено. Однако на такую возможность косвенно указывают данные, полученные на других эукариотических организмах. Относительно же 3'-нетранслируемых участков мРНК есть ряд прямых подтверждений их особой важности в регуляции стабильности мРНК человека.

Установлено, что полиА-хвост в комплексе с белками увеличивает стабильность мРНК, защищая ее 3'-конец от экзонуклеазного расщепления. Мутации в сигнальной последовательности, блокирующие полиаденилирование, приводят к образованию очень нестабильных транскриптов. К такому же эффекту приводит и искусственное удаление полиА-хвоста мРНК. Имеются данные о том, что последовательные циклы трансляции мРНК сопровождаются постепенным укорочением полиА-хвоста, так что на каком-то этапе 3'-конец становится чувствительным к экзонуклеазному расщеплению.

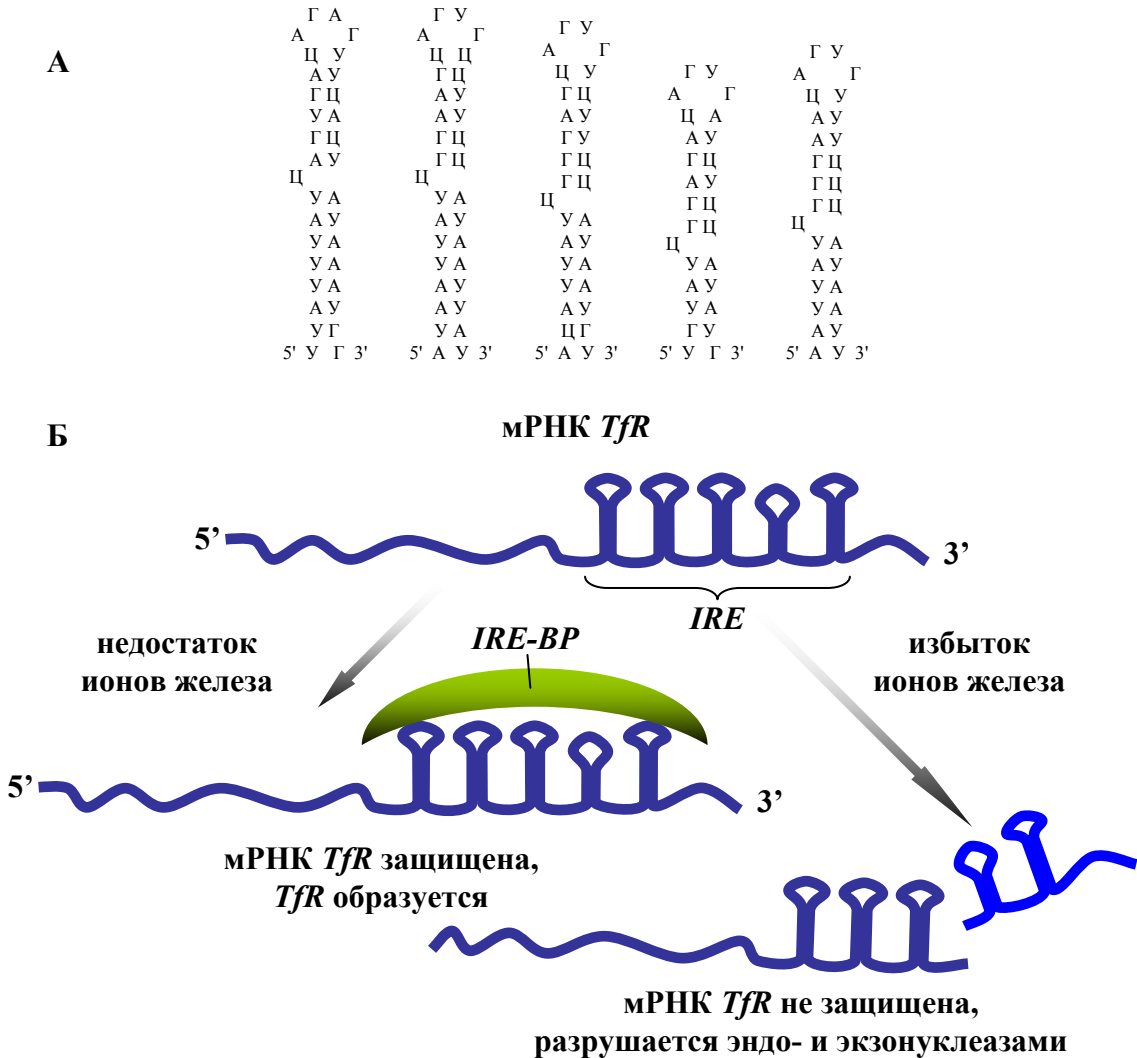
Помимо полиА-хвостов в 3'-нетранслируемых участках некоторых РНК-транскриптов человека были обнаружены дополнительные спе-

цифические последовательности, регулирующие стабильность мРНК. Так, перед сигналом полиаденилирования у короткоживущих мРНК (например, мРНК таких генов, как ген интерлейкина-2, ген *c-fos*, ген *c-myc* и др.) имеется многократно повторенная последовательность 5'-АУУУА-3, способствующая деградации этих РНК-транскриптов. В результате для таких мРНК характерна относительная метаболическая нестабильность, вследствие чего кодируемые ими белки оказывают свое физиологическое действие сравнительно непродолжительное время. Правда, пока не известно, каким образом происходит такая деградация.

Ярким примером роли 3'-нетранслируемых участков в регулируемой деградации мРНК является опосредованная железом регуляция содержания мРНК рецептора трансферрина (*TfR*, от англ. transferrin receptor) в клетках человека. Этот рецептор обеспечивает поглощение клеткой ионов железа из окружающей среды, причем его синтез подавляется при избытке железа в клетке и стимулируется при его недостатке. Установлено, что этот процесс контролируется на уровне избирательной деградации мРНК, и зависит от ионов железа. Согласно современным представлениям, в 3'-нетранслируемом участке мРНК *TfR* имеется чувствительный к железу элемент *IRE* (от англ. iron-response element) протяженностью в 680 нуклеотидов. Он имеет специфическую нуклеотидную последовательность, образующую пять схожих по структуре шпилек (рис. 30 А). Все шпильки содержат следующие элементы: 1) петлю ЦАГ(А/У)Г; 2) верхний стебель из пяти пар оснований; 3) не спаренный остаток Ц на расстоянии пяти оснований от 5'-конца петли; 4) нижний стебель разной длины. Ни одна из шпилек по отдельности, ни первые две или последние три не обеспечивают опосредованную железом регуляцию содержания мРНК *TfR*. Для этого необходимо кооперативное взаимодействие всех указанных структур.

Кроме того, в регуляции содержания мРНК *TfR* необходимо участие белка, специфически связывающегося с *IRE* (так называемый белок *IRE-BP*). При избытке железа содержание функционально активного *IRE-BP* уменьшается, при нехватке – наоборот, увеличивается. Предполагается, что при недостатке ионов железа функционально активный *IRE-BP* связывается с кластером шпилек *IRE* и защищает его или прилегающие участки от действия эндонуклеазы. При избытке же ионов железа количество функционально активного *IRE-BP* падает, что сопровождается вначале эндонуклеазным, а затем и экзонуклеазным

расщеплением мРНК *TfR* (рис. 30 Б). Регуляция по этой схеме поддерживает синтез *TfR* в том случае, когда клетка испытывает дефицит ионов железа.



**Рис. 30.** Регулируемая деградация мРНК *TfR* человека. А) Структура элемента *IRE*. Б) Механизм контроля стабильности мРНК *TfR* с помощью ионов железа.

Изучение очищенного *IRE-BP* показало, что для его связывания с мРНК *TfR* необходима свободная сульфгидрильная группа. Это наводит на мысль, что при высоких концентрациях железа облегчается образование дисульфидной или неактивной формы *IRE-BP*, а при низких – восстановление дисульфидных групп белка до свободных сульфгидрильных групп и переход белка в активное состояние. Таким образом, скорость деградации мРНК *TfR* должна зависеть от количества *IRE-*



*BP*, связанного с *IRE*, которое в свою очередь определяется регулируемой железом степенью окисления остатков цистеина *IRE-BP*. Внутриклеточная концентрация ионов железа играет роль своего рода "сульфгидрильного выключателя", который определяет, будет ли *IRE-BP* связываться с мРНК *TfR* и защищать ее от деградации.

### 3.3.2. Избирательная трансляция мРНК

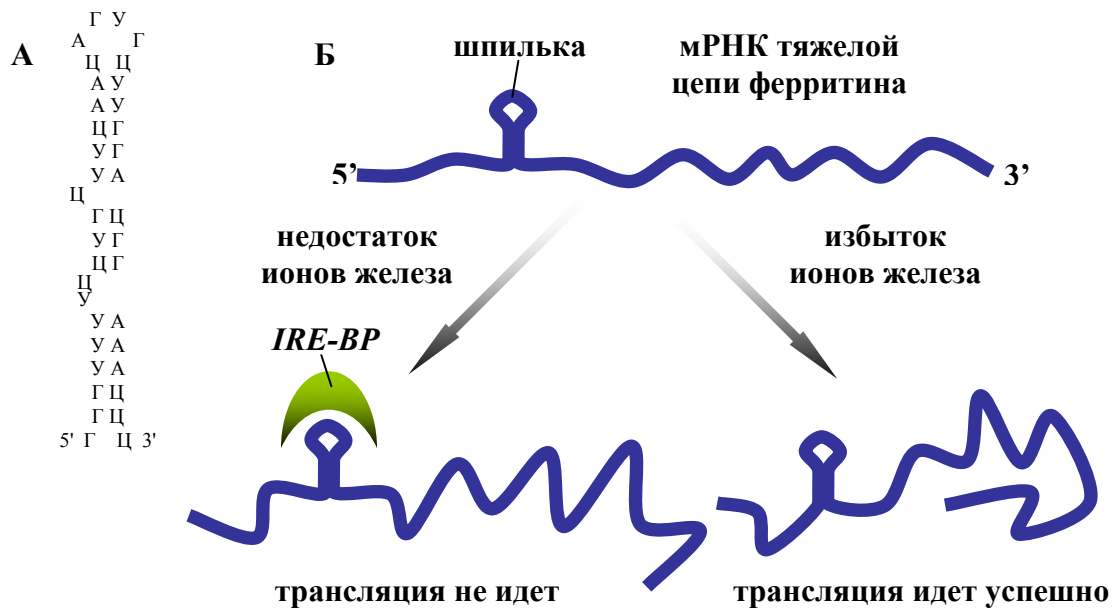
Еще одним белком, играющим ключевую роль в метаболизме железа, а точнее в его запасании внутри клетки, является белок ферритин. При этом его синтез в клетках человека регулируется с помощью самого же железа посттранскрипционно: при поступлении железа в клетку частота трансляции ферритиновой мРНК возрастает, а при недостатке железа – падает. Транскрипция же гена ферритина, как и стабильность соответствующей мРНК, не зависит от концентрации железа.

С помощью делеционного анализа было установлено, что за этот процесс отвечает небольшая последовательность 5'-нетранслируемого участка мРНК ферритина, размер которой равен всего 43 нуклеотидам. Эта небольшая последовательность образует шпильчатую структуру наподобие тех, которые образуются в 3'-нетранслируемом участке мРНК *TfR* (рис. 31 А). С 5'-концевой шпилькой ферритиновой мРНК связывается тот же самый белок, который присоединяется к *IRE* мРНК *TfR*, хотя в этом случае шпилька всего одна. Предполагается, что *IRE-BP* регулирует трансляцию мРНК, блокируя доступ рибосом к началу последовательности, кодирующей ферритин (рис. 31 Б). Таким способом клетки выключают синтез ферритина в условиях недостатка железа, при этом стабильность мРНК ферритина позволяет клеткам быстро реагировать на увеличение концентрации железа.

### 3.4. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне посттрансляционной модификации белков

Данные относительного этого уровня контроля экспрессии генов у человека остаются весьма фрагментарными. Так, известно, что для нормальной активации ряда белков необходим их частичный протеолиз. Например, интерлейкин-1 $\beta$  синтезируется в клетках всегда в неактивной форме. При его активации происходит частичный протеолиз молекулы про-интерлейкина-1 $\beta$  с помощью сериновой протеазы *ICE* (каспазы 1), во время которого высвобождается небольшой поли-

пептид и активная форма цитокина. Насколько этот процесс тканеспецифичен, остается до сих пор не ясным.



**Рис. 31.** Регулируемая трансляция мРНК ферритина. А) Структура шпильки в 5'-нетранслируемом участке мРНК ферритина. Б) Механизм контроля трансляции мРНК ферритина с помощью ионов железа.

### 3.5. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов у человека

Эпигенетические механизмы контроля экспрессии генов не являются специфичными, а влияют на экспрессию многих генов. В связи с этим их можно назвать глобальными механизмами контроля или механизмами удаленного контроля. Помимо этой особенности они отличаются и еще одним свойством - разнообразием. Так, на сегодняшний день у человека известно не менее восьми механизмов глобального контроля экспрессии генов: межклеточное контактное взаимодействие, метилирование ДНК, конкуренция за энхансеры или сайленсеры, компактизация хроматина, эффект положения гена, геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы и аллельное исключение.

#### 3.5.1. Межклеточное контактное взаимодействие

О возможном влиянии контактного взаимодействия между клетками на экспрессию специфических генов говорилось давно. Это связано в первую очередь с феноменом дифференцировки клеток на ранних

этапах эмбриогенеза. Действительно, это воистину уникальный и фантастический процесс, когда из одной единственной оплодотворенной яйцеклетки развивается сложный человеческий организм, организм, который состоит из множества различных типов клеток. Это становится еще менее постижимым, когда мы вспомним, что все эти клетки имеют один и тот же набор генов и других элементов генома, что их геномы идентичны.

К сожалению, точных знаний по этой проблеме у нас пока нет. Даже данные, полученные в модельных экспериментах на других животных, весьма фрагментарны и изобилуют "белыми пятнами". Тем не менее, предполагается, что развитие асимметрии из первично симметричного зародыша может быть обусловлено сигналами о контактном взаимодействии между клетками. Такая контактная информация в последующем может приводить к избирательной экспрессии генов и дифференцировке изначально одинаковых клеток.

### **3.5.2. Метилирование ДНК**

В течение последних лет несколькими группами исследователей было убедительно показано, что экспрессия генов человека коррелирует со степенью метилирования специфических остатков цитозина внутри регуляторных областей генов и вокруг них. Такой эффект отмечен для генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых кластеров, тимидинкиназы, аденинфосфорибозилтрансферазы, гена  $\kappa$ -цепи иммуноглобулинов и некоторых других. За исключением нескольких случаев, при наличии метилированных групп (гиперметилировании) эффективность генной экспрессии уменьшается, а чаще экспрессия вообще прекращается. Активное же состояние генов обычно сочетается с отсутствием метилирования или понижением степени метилирования (гипометилирования) в тех же самых сайтах. При этом сайты метилирования, сопряженные с инактивацией, локализованы в основном в области промоторов, но возможно и избирательное метилирование более далеких регуляторных последовательностей.

У человека, как и у других эукариот, метилированию подвергается цитозин, причем только в составе динуклеотидов 5'-ЦГ-3'. В результате у человека в метилированном состоянии находиться от 50 до 90% остатков цитозина в динуклеотидах ЦГ. Следует отметить, что степень метилирования разных генов оказывается неодинаковой для разных стадий развития человека, разных тканей и разных участков ДНК.

Например, ген  $\gamma$ -глобина остается гипометилированным в предшественниках эритроцитов из средней части печени плода, где происходит наиболее активная экспрессия этого гена человека, вплоть до рождения. После рождения же весь кластер глобиновых генов клеток печени, включая и ген  $\gamma$ -глобина, переходит в гиперметилированное состояние.

За процесс метилирования отвечает целый класс ферментов – метилтрансфераз, – которые в качестве донора метильной группы используют *S*-аденозилметионин. При этом разные метилтрансферазы обладают разной специфичностью, чем, по-видимому, можно объяснить избирательность метилирования генов. Кроме того, на характер метилирования могут влиять последовательности, окружающие динуклеотиды ЦГ, а так же состояние хроматина.

Механизм влияния метилирования остатков цитозина на характер экспрессии генов окончательно не установлен. Предполагается, что ингибирование транскрипции может происходить в результате нарушения связывания факторов транскрипции с соответствующими регуляторными областями генов при наличии метилированных групп в этих областях. Например, было однозначно показано, что связывание факторов транскрипции с промотором гена тирозинаминотрансферазы блокируется при метилировании цитозина динуклеотидов ЦГ в сайтах связывания факторов транскрипции указанного гена. Аналогичный эффект метилирования установлен и для генов, содержащих цАМФ-чувствительный элемент *CRE*, где имеется ЦГ-динуклеотид. Метилирование промоторов, транскрипционная активность которых зависит от одного или пары *CRE*, всегда блокирует связывание фактора транскрипции *CRE* и предотвращает транскрипцию соответствующих генов. Все эти наблюдения говорят о том, что метилирование ЦГ-динуклеотидов в участках связывания факторов транскрипции может блокировать их связывание и подавлять функцию промотора.

Исключением из описанного выше правила является метилирование динуклеотида ЦГ в сайте связывания фактора транскрипции *Sp1*: ни связывание *Sp1*, ни *Sp1*-зависимая транскрипция при метилировании не подавляется. Эта особенность *Sp1*-сайтов, вероятно, определяется характером связывания белка и ДНК. Не исключено, что она сформировалась в процессе отбора, поскольку *Sp1* участвует в транскрипции многих важных и повсеместно экспрессирующихся генов.

### 3.5.3. Конкуренция за энхансеры или сайленсеры

Такой механизм удаленного контроля экспрессии генов нами уже рассматривался ранее на примере глобиновых генов. Напомним, что стадиоспецифическое переключение экспрессии  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых генов может обеспечиваться благодаря конкуренции между глобиновыми генами за взаимодействие с соответствующими *LCRs* и стадиоспецифической активацией ген-специфических сайленсерных элементов (см. главу 1). Другим примером такого рода контроля может быть конкуренция за единственный энхансер между генами *H19* и *IGF2*, локализованными в бэнде *p15* 11-й хромосомы человека. В этом случае в соматических клетках человека работает только один из указанных генов только на одной из двух гомологичных хромосом, полученных от двух родителей.

#### 3.5.4. Компактизация хроматина

На каждом из этапов онтогенеза в клетках человека экспрессируется лишь небольшая часть генов, большинство же генов должно находиться в неактивном состоянии. Представляется маловероятным, что бы какой-нибудь из описанных выше механизмов регуляции экспрессии генов мог обеспечивать столь глобальный контроль. По-видимому, такой контроль может осуществляться с помощью принципиально иного механизма, каковым может быть, например, структурное состояние хроматина.

Идея о том, что структурное состояние хроматина может влиять на транскрипционную активность генов, появилась в научных кругах давно. Со временем она получила ряд экспериментальных подтверждений и в настоящее время не вызывает особых сомнений. Установлено, что компактизация хроматина сопровождается прекращением его транскрипционной активности, а декомпактизация гетерохроматина, переход его в эухроматин, наоборот, приводит к резкому повышению транскрипционной активности локально расположенных генов. Именно с такими структурными изменениями хроматина в определенных локусах хромосом связывают активацию или инактивацию генов, ответственных за некоторые заболевания человека. Так, развитие такого заболевания, как аниридия, обусловлено нарушением экспрессии гена *PAX6*, локализованного в бэнде *p13* 11-й хромосомы, причем его экспрессия изменяется вследствие структурной перестройки хроматина. По-видимому, такие же перестройки являются причи-

ной развития *campromelic* дисплазии, синдрома Прадера-Вилли, синдрома Ангельмана и т. д.

Высокая чувствительность активно транскрибируемых участков хроматина к действию нуклеаз (например, ДНКазе I) так же указывает на то, что они менее плотно упакованы. Такая чувствительность к нуклеазам часто распространяется на сегменты длиной в несколько тысяч пар оснований, фланкирующих транскрипционную единицу. Структурные особенности, лежащие в основе такой чувствительности, пока не установлены, но данные биохимических исследований свидетельствуют о том, что нуклеосомы, содержащие активные гены, характеризуются низким содержанием ассоциированного с ними гистона *H1*, обогащены ацетилированными и убиквитинсодержащими гистонами и связаны с так называемыми *HMG*-белками, имеющими четко выраженные кислотные свойства. Эти модификации, вероятно, влияют на связывание гистонов с ДНК и способствуют нерегулярному распределению нуклеосом, вследствие чего ДНК становится более чувствительной к нуклеазному расщеплению. Так, нормальное чередование сайтов нуклеазного расщепления генов, кодирующих белки теплового шока, меняется после тепловой индукции. Аналогичное изменение профиля нуклеазного расщепления наблюдается в случае овалбуминовых генов в клетках яйцевода (но не печени) и генов *IgL(κ)* лимфоцитов после их перехода в транскрипционно активную форму.

Кроме того, помимо упомянутых участков нуклеазной чувствительности активно транскрибируемые гены содержат гиперчувствительные сайты, которые находятся в пределах транскрипционных единиц и/или вблизи них. В очищенной ДНК такие сайты гиперчувствительности к ДНКазе I отсутствуют. Сайты гиперчувствительности обычно располагаются непосредственно перед точкой начала транскрипции гена, но иногда они встречаются внутри единицы транскрипции или на ее 3'-конце. Более того, в некоторых генах сайты гиперчувствительности к ДНКазе I находятся на значительных расстояниях слева от сайта кэпирования (например, более чем на 20 тысяч пар оснований левее гена  $\beta$ -глобина человека). В большинстве случаев сайты гиперчувствительности к действию ДНКазы I присутствуют только в ДНК тканей или клеток, в которых либо происходит, либо запрограммирована экспрессия определенного гена. Например, сайт гиперчувствительности на 5'-конце гена препроинсулина обнаружен в панкреатических  $\beta$ -островковых клетках поджелудочной железы и отсутствует в

клетках печени. Аналогично, сайты гиперчувствительности имеются в перестроенных иммуноглобулиновых генах В-клеток, но отсутствуют в генах клеток некроветворных тканей.

Сайты гиперчувствительности к нуклеазам, вероятно, находятся в областях, разделяющих нуклеосомы. Впервые на это обратили внимание, когда обнаружилась зависимость между положениями сайтов гиперчувствительности и не содержащей нуклеосом областью в геноме *SV40*. Такая область видна на электронно-микроскопических фотографиях очищенных мини-хромосом *SV40*. Она охватывает участок между точкой начала транскрипции ранних генов и 5'-концом энхансера. Если этот сегмент длиной 400 п. н. транслоцировать в другие области генома *SV40* или в чужеродные плазмидные ДНК, то в последних появляются области, не содержащие нуклеосом, и сайты гиперчувствительности к ДНКазе I. Отсюда можно сделать вывод, что оба эти свойства, по-видимому, обуславливаются особенностями нуклеотидной последовательности данного участка ДНК. В то же время на гиперчувствительность межнуклеосомной области к действию нуклеаз, вероятно, влияют негистоновые белки, связанные с этой областью, возможно, белки, взаимодействующие с Z-ДНК, и факторы транскрипции, ассоциированные с энхансером.

Такие же сайты гиперчувствительности и свободные от нуклеосом области имеются в энхансерах генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, в 5'-концевом участке гена металлотioneина и др. генах. Сайты гиперчувствительности к нуклеазному расщеплению появляются в глюкокортикоид-акцепторном элементе через несколько минут после введения в клетки глюкокортикоида и исчезают вскоре после удаления гормона. Возможно, сайты гиперчувствительности к ДНКазе I связаны также с активацией транскрипции генов рРНК, поскольку такие сайты встречаются как перед точками инициации транскрипции, так и по краям спейсеров рРНК-генов. Таким образом, гиперчувствительность к нуклеазе является своего рода маркером областей регуляции транскрипции.

Поскольку положение областей регуляции транскрипции согласуется с положением как сайтов гиперчувствительности, так и областей, свободных от нуклеосом, можно предположить, что все эти элементы взаимосвязаны. Возможно, присоединение факторов транскрипции к соответствующим последовательностям приводит к вытеснению нуклеосом или изменяет их упаковку, при этом образуются свободные от нуклеосом участки, которые можно визуализировать, или даже менее

заметные нарушения, обеспечивающие нуклеазное расщепление. Если, однако, плотноупакованные нуклеосомы стабилизированы, например, гистоном *H1*, образования структур более высокого порядка, то доступ белков транскрипции к сигнальным последовательностям затрудняется, и транскрипция блокируется.

### 3.5.5. Эффект положения гена

Модельные эксперименты, поставленные на дрозофиле, однозначно указывают на то, что блоки центромерного, теломерного или иного гетерохроматина могут подавлять экспрессию локально расположенных генов. Предполагается, что это связано с изменением структуры прилегающих к указанным блокам участков хроматина, хотя, правда, весомых аргументов в пользу данной точки зрения пока и не получено.

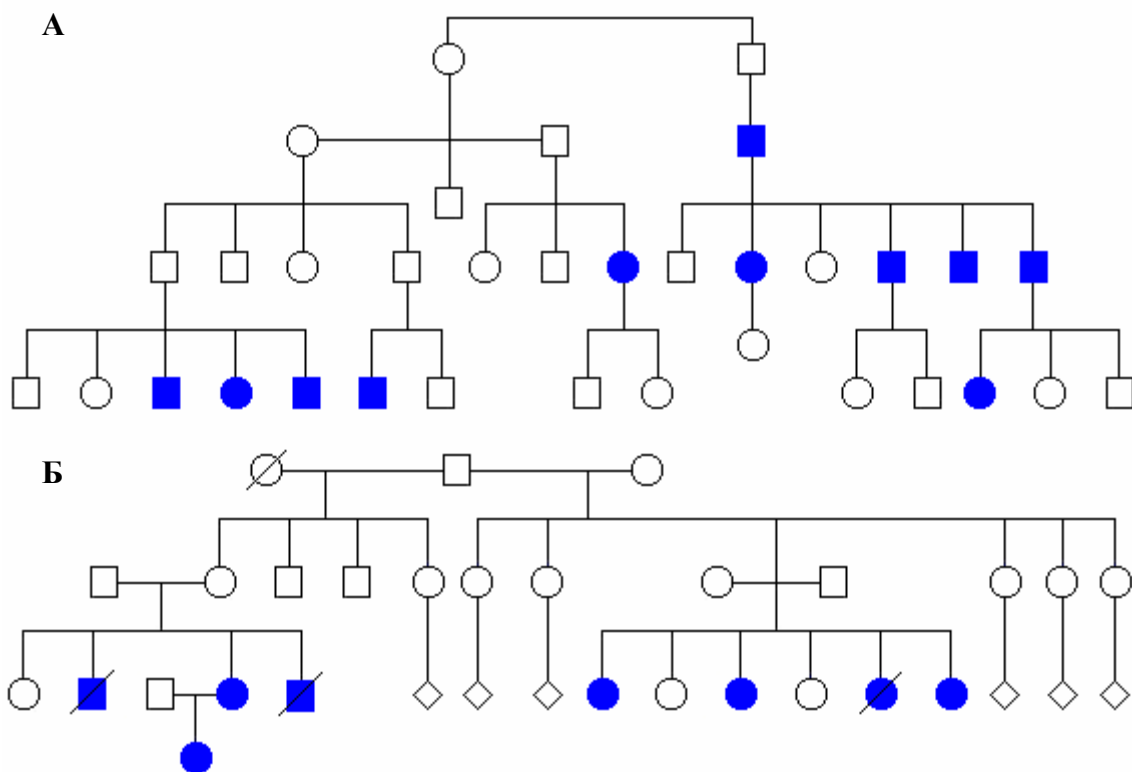
Аналогичное явление обнаружено не только у дрозофилы, но и у других организмов, в том числе и у человека. Одним из примеров такого феномена у человека может быть фасциальная лопаточно-плечевая мышечная дистрофия. Ген *FSHD*, ответственный за это аутосомно-доминантное прогрессирующее нервно-мышечное заболевание, локализован в претеломерной области длинного плеча 4-й хромосомы. Результаты рестрикционного картирования указанной области свидетельствуют о том, что у пациентов, страдающих мышечной дистрофией, имеется делеция небольшого участка 4-й хромосомы между геном *FSHD* и теломером ее длинного плеча. Следствием этой делеции является изменение положения гена *FSHD* и изменение его экспрессии.



### 3.5.6. Геномный импринтинг

Геномный импринтинг – это дифференциальная модификация материнского и отцовского генетического материала, входящего в зиготу, которая опосредует дифференциальную экспрессию родительских аллелей в процессе развития организма. Это уникальное явление было обнаружено у человека благодаря нескольким весьма любопытным наблюдениям. Во-первых, было замечено, что фенотипические различия между триплоидными абортусами определяются тем, от кого из родителей они получили третью лишнюю хромосому. Во-вторых, у человека известно несколько аутосомно-доминантных заболеваний, проявление которых зависит от происхождения генетического материала, определяющего патологию. На рис. 32 А представлена родословная одной семьи, где с высокой частотой развивались опухоли каротидного тела. Это заболевание наследуется по аутосомно-доминантному механизму, однако, проявляется оно только в том случае, когда ребенок получает мутантный ген от своего отца, а не от матери. Аналогичная ситуация наблюдается и для другого аутосомно-доминантного заболевания – синдрома Беквиса-Видмена (рис. 32 Б). Однако в этом случае заболевание проявляется тогда, когда ген получен от матери, а не от отца. В-третьих, в зависимости от происхождения абберантные хромосомы, несущие делеции, могут по-разному проявляться фенотипически. Так, если 15 хромосома с делецией *q12* получена от отца, то у ребенка развивается синдром Прадера-Вилли (задержка умственного развития, гипотония, ожирение, гипогонадизм), если же точно такая хромосома получена от матери, то развивается синдром Энгельмана (задержка умственного развития, задержка роста, гиперактивность, неадекватный смех). В-четвертых, при многих формах рака, вызванных инактивацией нормальной аллели, инактивируется отцовская аллель.

Эти и ряд других схожих наблюдений свидетельствуют о том, что геномы "запоминают" свое происхождение и в зависимости от такового ведут себя по-разному. Однако насколько много генов может вовлекаться в этот процесс, пока не известно. Скорее всего, что импринтингу подвержено ограниченное количество генов человека или небольшие регионы хромосом. Например, большинство генов 11-й пары хромосом экспрессируется на обеих хромосомах, однако ген *H19* экспрессируется только на материнской хромосоме, а ген *IGF2* – только на отцовской хромосоме (табл. 12).



**Рис. 32.** Аутосомно-доминантное наследование импринтных характеристик. А) Родословная семьи с наследуемыми опухолями каротидного тела. Б) Родословная семьи с синдромом Беквиса-Видмэна.

Не установлен до конца и механизм геномного импринтинга. Интересно отметить, что содержание метилированных сайтов в ДНК сперматозоидов и ДНК яйцеклетки различно. Это наводит на мысль, что половые различия в степени метилирования ДНК, проявляющиеся при гаметогенезе, могут вносить вклад в процесс импринтинга. По-видимому, импринтинг устанавливается во время гаметогенеза или до него и стабильно сохраняется при делении соматических клеток во многих поколениях. Он исчезает в линии зародышевых клеток, чтобы снова дифференциальным образом восстановиться в сперматозоиде и яйцеклетке. Геном яйцеклетки в значительной степени гипометилирован, а геном сперматозоида относительно гиперметилирован. Во время предимплантационного состояния зародыша оба этих набора хромосом частично деметилируются, затем, в процессе развития плода, родительские хромосомы интенсивно, но дифференциально метилируются. Возможно, это и есть ключ к пониманию механизма импринтинга.

Таблица 12

Некоторые импринтные гены человека.

Ген	Хромосомная локализация	Продукт	Экспрессируемая аллель	Исключения
<i>IGF2</i>	11p15	Инсулиноподобный ростовой фактор, тип II	Отцовская	В печени взрослых людей экспрессируются обе аллели
<i>H19</i>	11p15	Опухолевый суп-прессор	Материнская	
<i>SNRPN</i>	15q12	Малый ядерный рибонуклеопротеин <i>N</i>	Материнская	
<i>WT1</i>	11p13	Опухолевый суп-прессор	Редко – материнская	В почках экспрессируются обе аллели; в клетках мозга и плаценты экспрессируется материнская аллель

Остается не менее загадочной и функциональная роль геномного импринтинга. Наиболее популярной, хотя экспериментально пока и не обоснованной, является теория импринтинга как результата эволюционного конфликта между двумя эгоистичными геномами – материнским и отцовским. Согласно этой теории, отцовский геном является агрессивным по отношению к организму матери, поэтому материнский геном направлен на подавление его проявления с целью защиты организма. Не удивительно поэтому, что отцовский геном экспрессируется преимущественно в клетках трофобласта и неэмбриональных тканей, а материнский - преимущественно в клетках самого эмбриона.

### 3.5.7. Инактивация X-хромосомы

У человека инактивация одной из двух X-хромосом в соматических клетках женского организма компенсирует "нехватку" одной X-хромосомы в соматических клетках мужчин. Инактивация X-хромосомы осуществляется в три этапа на ранних стадиях эмбриогенеза. Сначала из двух X-хромосом выбирается одна, предназначенная для инактивации. Затем инактивация распространяется на всю

хромосому. Наконец, модифицированное состояние стабилизируется, так что выбранная хромосома остается неактивной в последующих поколениях клеток.

Инактивация хромосомы происходит не во всех эмбриональных клетках. Примерно на четвертый день после имплантации зародыша *X*-хромосома, полученная от отца, избирательно инактивируется в клетках, участвующих в формировании неэмбриональных тканей. Через шесть дней внутриматочного развития одна из двух *X*-хромосом, выбранная случайным образом, инактивируется во всех клетках, предназначенных для плода. Таким образом, плод женского пола развивается как мозаичный организм, в клетках которого экспрессируются либо отцовские, либо материнские *X*-хромосомы.

Неактивная *X*-хромосома в интерфазных ядрах имеет вид высококонденсированной гетерохроматиновой структуры (так называемое тельце Барра). В отличие от активной гомологичной хромосомы, неактивная *X*-хромосома реплицируется только в конце *S*-фазы. Почти все гены, кодируемые неактивной *X*-хромосомой, теряют способность к экспрессии. Неактивное состояние очень стабильно, и только в редких случаях происходит реактивация отдельных областей. При нормальном развитии реактивация осуществляется только в зародышевых клетках непосредственно перед мейозом.

К сожалению, как и в случае с геномным импринтингом, механизм выбора, инактивации и поддержания инактивированного состояния *X*-хромосомы не установлен. Известно только, что в этом процессе участвует *X*-сцепленный ген *XIST*, из двух аллелей которого активна только та, которая находится как раз таки на инактивируемой *X*-хромосоме. Кроме того, предполагается, что в инактивации *X*-хромосомы не маловажное значение имеет метилирование ДНК. Однако прямых экспериментальных подтверждений этой точки зрения пока не получено.

### **3.5.8. Аллельное исключение**

Феномен аллельного исключения был обнаружен при изучении синтеза легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов в В лимфоцитах и синтеза компонентов Т-клеточного рецептора в Т лимфоцитах. Оказалось, что в каждой индивидуальной клетке случайным образом выбирается одна (материнская или отцовская) из двух родительских аллелей, по которой будет идти в дальнейшем синтез иммуноглобулинов

(у В лимфоцитов) или Т-клеточного рецептора (у Т лимфоцитов). При этом никогда не происходит синтез указанных компонентов по обеим аллелям, материнской и отцовской. В этом и есть суть феномена аллельного исключения.

## ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

---

Без лишнего преувеличения можно сказать, что генетика индивидуального развития является самым интригующим и самым захватывающим разделом генетики человека. Вряд ли найдется хотя бы один генетик, который не задавался бы вопросом: так как же это все-таки происходит – развитие целого очень сложно устроенного организма, каковым является организм человека, из одной единственной клетки, из зиготы, какая сила управляет этим процессом? К сожалению, окончательного и полного ответа на этот вопрос мы пока не знаем. Тем не менее, затраченные усилия многих ученых, изучавших и изучающих феномен онтогенеза, принесли свои плоды, которые позволяют, пусть в общих чертах, но все же сформулировать основные принципы генетического контроля индивидуального развития человека.

### 4.1. Основные принципы генетического контроля индивидуального развития человека

Современные представления о генетическом контроле индивидуального развития человека основаны на нескольких принципах. Эти принципы перечислены и коротко охарактеризованы ниже, а их конкретное наполнение будет проведено на примерах генетического контроля ранних этапов развития центральной нервной системы и половой дифференцировки у человека.

*Принцип первый* – принцип универсальности механизмов генетического контроля индивидуального развития многоклеточных организмов. Согласно этому принципу генетический контроль индивидуального развития человека осуществляется по универсальным механизмам, общим для всех многоклеточных организмов – от низших многоклеточных (таких, как морские ежи, нематода и т. д.) до птиц и млекопитающих. Универсальность механизмов контроля индивидуального развития многоклеточных организмов основана на эволюционной консервативности нескольких ключевых семейств генов, участвующих в этом процессе: супергенного семейства трансформирующего фактора роста-бета и мультигенных семейств *Wnts*, фактора роста фибробластов, фактора роста тромбоцитов, морфогенетических белков костного мозга, *Nodal*, эфрина и *Sonic hedgehog* и *Indian*. По-видимому, однажды возникнув на заре эволюции многоклеточных

организмов, эти семейства сохранили эволюционный консерватизм в силу эффективности тех механизмов контроля индивидуального развития, которые они определяют.

*Принцип второй* – принцип эквивалентности геномов всех соматических клеток организма. Согласно этому принципу все клетки данного организма, не зависимо от их принадлежности к тому или иному клеточному типу, обладают абсолютно одинаковыми геномами. В случае человека и некоторых других животных исключением из этого правила являются только Т- и В-лимфоциты иммунной системы. Каждая клетка – представитель указанных клеточных типов, – имеет уникальный ген, кодирующий Т-клеточный рецептор или молекулу иммуноглобулина, соответственно. Это связано со спецификой дифференцировки таких клеток, на одном из этапов которой происходит эмбриональная реаранжировка отмеченных генов.

*Принцип третий* – принцип временной и пространственной асимметричности клеточных делений. Благодаря асимметричности клеточных делений возможно образование двух разных по свойствам, но одинаковых по геномам дочерних клеток, что создает предпосылку для их дальнейшей дифференцировки. Сама по себе асимметричность деления может быть вызвана либо внешними по отношению к делящейся клетке причинами (межклеточными контактами), либо внутренними (неравномерным распределением транскрипционных факторов между дочерними клетками).

*Принцип четвертый* – принцип клеточной дифференцировки. Согласно этому принципу все многообразие типов клеток человеческого организма возникает благодаря дифференциальной экспрессии генов в изначально одинаковых клетках, приводящей к клеточной дифференцировке. Первопричиной указанного феномена является асимметричность клеточных делений, а сама дифференциальная экспрессия генов контролируется на разных уровнях реализации наследственной информации клетки – от транскрипции до эпигенетического уровня (см. главу 3).

*Принцип пятый* – принцип единства процессов активации и инактивации экспрессии генов. Этот принцип тесно взаимосвязан с предыдущим и сводится к следующему: переход клетки на каждую последующую стадию дифференцировки обусловлен исключением генов предыдущей стадии и одновременным включением в работу нового набора дифференцировочных генов.

*Принцип шестой* – принцип кластеризованности дифференцировочных генов. Согласно этому принципу дифференцировка клетки может протекать успешно только при условии, что будет одновременно (согласованно) включен (или выключен) целый набор (кластер) генов, отвечающих за ту или иную стадию клеточной дифференцировки. Предполагается, что такого рода кластеры дифференцировочных генов могут находиться в отдельных петельных доменах хроматина, которые ведут себя как относительно автономные структуры (см. главу 2).

*Принцип седьмой* – принцип эмбриональной индукции. Под эмбриональной индукцией подразумевается явление, при котором в процессе эмбриогенеза один тканевой (органный) зачаток через индуктор влияет на другой (компетентную ткань), определяя путь его развития, и, кроме того, сам подвергается индуцирующему воздействию со стороны первого зачатка. В сущности, онтогенез – это цепь эмбриональных индукций, т. е. взаимодействий индуктор-компетентная ткань. Полноценная эмбриональная индукция зависит от того, насколько точно соответствует в развитии время созревания индуктора и компетентной ткани. В нормальных условиях компетентная система способна отвечать формообразованием в момент стимулирующего импульса от индуктора. Рассогласование (например, из-за мутаций) во времени созревания индуктора и компетентной ткани нарушает ход соответствующих морфогенетических процессов.

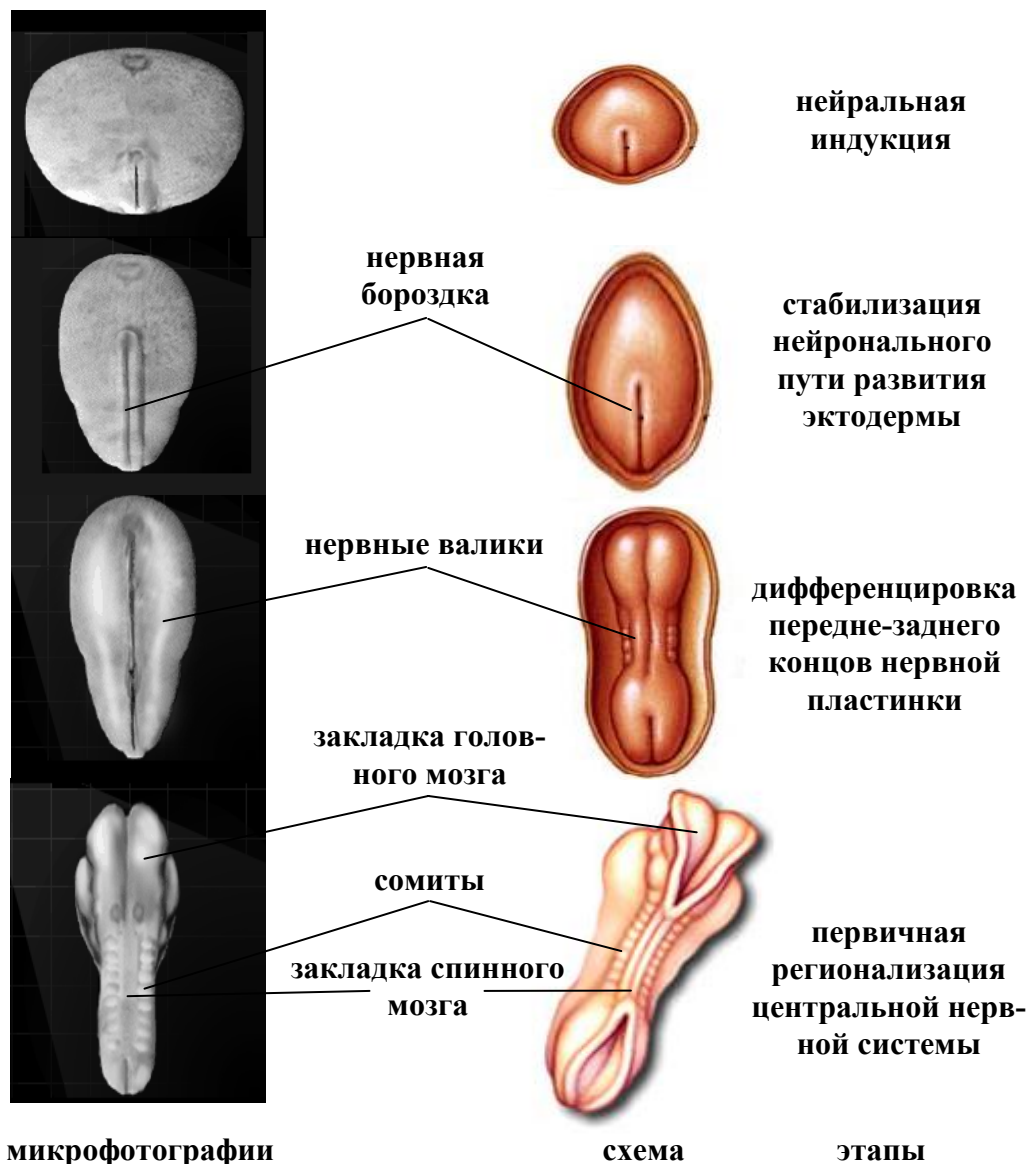
#### **4.2. Генетический контроль ранних этапов развития центральной нервной системы человека**

В своем развитии центральная нервная система человека проходит несколько последовательных этапов (рис. 33):

- 1) нейральная индукция;
- 2) стабилизация нейрального пути развития эктодермы;
- 3) дифференцировка передне-задних концов нервной пластинки;
- 4) первичная регионализация;
- 5) дифференцировка и специализация нейроцитов.

Каждый из перечисленных этапов инициируется предшествующим и инициирует последующий этап развития (по принципу эмбриональной индукции). Ниже более подробно мы рассмотрим молекулярно-генетический контроль прохождения центральной нервной системой первых четырех этапов своего развития.



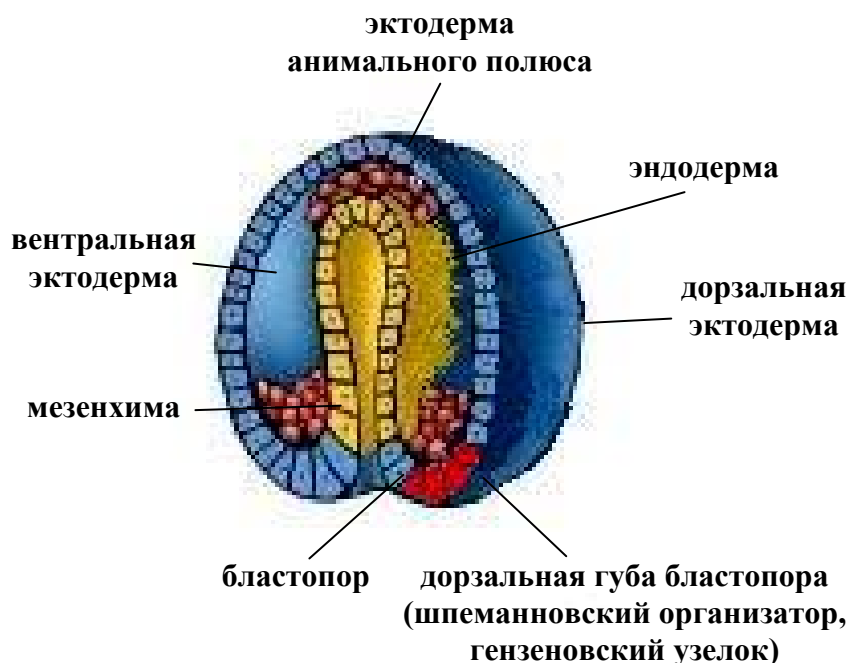


**Рис. 33.** Индукция и последовательные этапы формирования первичного зачатка центральной нервной системы (нервной пластинки) и его регионализации у человека на стадии поздней гаструлы и нейрулы.

#### 4.2.1. Нейральная индукция

Нейральная индукция – инициация образования первичного зачатка (нервной пластинки) центральной нервной системы человека из эктодермы. Согласно современным представлениям инициатором формирования первичного зачатка центральной нервной системы является так называемый шпеманновский организатор (гензеновский узелок) – группа эмбриональных клеток, образующих дорзальную губу бласто-

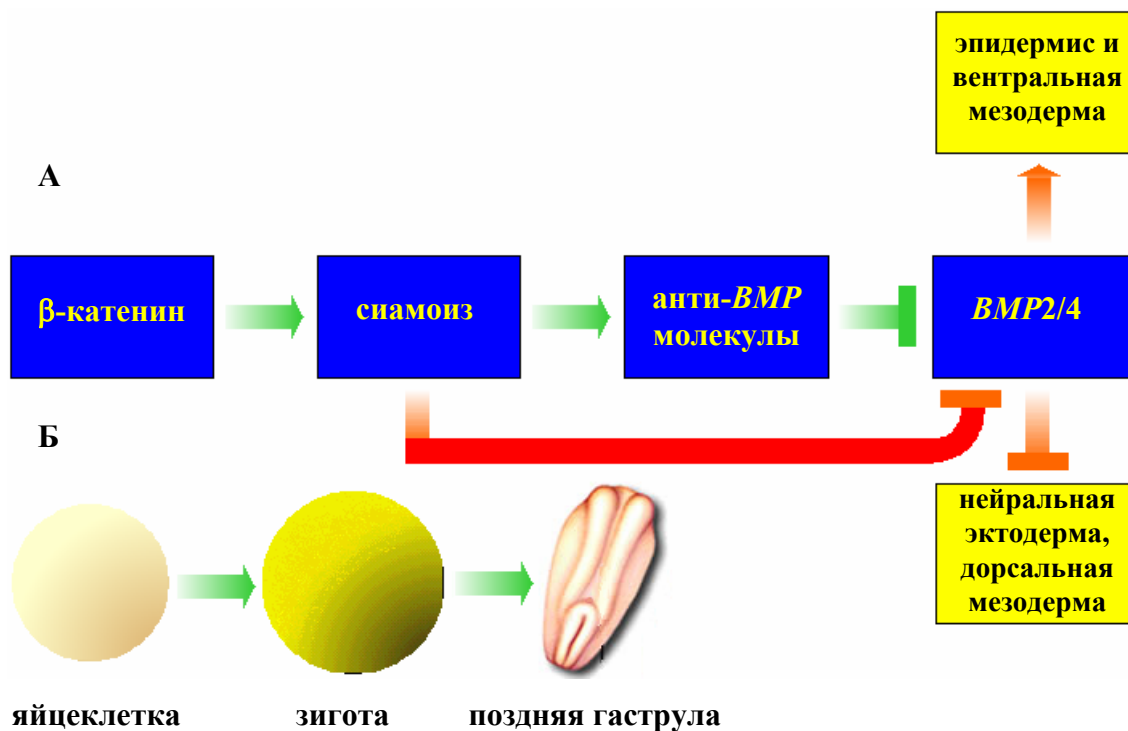
пора ранней гаструлы человека (рис. 34). В свою очередь закладка самого шпеманновского организатора иницируется  $\beta$ -катенином, который на поздних этапах созревания яйцеклетки перераспределяется в цитоплазме и накапливается у одного из ее полюсов.



**Рис. 34.** Схема строения гаструлы человека.

В клетках полностью сформированного шпеманновского организатора под влиянием высоких концентраций  $\beta$ -катенина активируется экспрессия гена, кодирующего белковый фактор сиамоиз. Этот фактор обладает двумя ключевыми функциями: во-первых, он является ингибитором функций морфогенетических белков *VMP2* и *VMP4* красного костного мозга, и, во-вторых, транскрипционным активатором генов других анти-*VMP* молекул.

Морфогенетические белки красного костного мозга, конститутивно синтезируемые в клетках эктодермы, инициируют формирование из эктодермы эпидермиса и вентральной мезодермы и блокируют развитие из этого же зародышевого листка нейральной эктодермы и дорзальной мезодермы. Подавление же функции указанных белков позволяет эктодермальным клеткам “ускользнуть” из-под их влияния и направляться по нейральному пути развития (рис. 35).



**Рис. 35.** Схема сигнального пути нейральной индукции. А) Схема молекулярного пути нейральной индукции. Б) От яйцеклетки к поздней гастрюле: согласованность с молекулярным путем нейральной индукции.

Нейрализующий эффект siamoisin оказывает дистанционно: первично синтезируясь в клетках шпеманновского организатора, он транспортируется в клетки окружающей эктодермы, где и выполняет свои специфические функции. Однако поскольку морфогенетические белки красного костного мозга играют ключевую роль в судьбе эктодермальных клеток, то они контролируются не только siamoisin, но и целым рядом других белков – так называемых анти-*BMP* молекул. К настоящему моменту идентифицировано довольно много молекулярных факторов, способных подавлять функцию морфогенетических белков красного костного мозга. У человека все они относятся к четырем семействам: хордина, ногина, фоллистатина и церберуса (табл. 13). По-видимому, такое разнообразие анти-*BMP* молекул повышает надежность контроля за функцией морфогенетических белков красного костного мозга.

Таблица 13

Анти-ВМР молекулы, индуцирующие образование первичного зачатка центральной нервной системы (нервной пластинки) у человека.

Группа молекул	Представители
Хордин	<i>CHRD, LOC57803</i>
Ногин	<i>NOG</i>
Фоллистатин	<i>FST, FSTL1, FSTL3, SPARCL1</i>
Церберус	<i>CER1, FLJ21195, DRM, CKTSF1B1</i>

#### 4.2.2. Стабилизация нейрального пути развития эктодермы

Для успешного формирования нервной пластинки необходимо закрепление нейрального пути развития эктодермы, инициированного на предшествующем этапе – этапе нейральной индукции. Стабилизация нейрального пути развития эктодермы контролируется множеством генов, которые включаются в работу после генов нейральной индукции и предшествуют активации генов последующих этапов развития центральной нервной системы человека (табл. 14).

По функциональной активности все гены, стабилизирующие нейральный путь развития эктодермы, подразделяются на три класса. К первому классу относятся гены (*loc137208/sox2, zic1, zic3*), белковые продукты которых модулируют способность клеток нейральной эктодермы воспринимать нейрализирующие сигналы. Белковые продукты, кодируемые генами второго класса (*loc51053, zic2*), поддерживают пролиферативный потенциал коммитированных по нейральному пути развития эктодермальных клеток и подавляют их дифференцировку. Наконец, гены третьего класса (*irx1, irx2, irx3*) контролируют дифференцировку коммитированных по нейральному пути развития эктодермальных клеток и их восприимчивость к белковым продуктам генов последующих этапов развития центральной нервной системы. Предполагается, что гены указанных классов активируются последовательно друг за другом.

#### 4.2.3. Дифференцировка передне-заднего концов нервной пластинки и ее первичная регионализация

Для объяснения механизмов дифференцировки передне-заднего концов нервной пластинки и ее первичной регионализации были предложены разнообразные модели, однако наиболее успешной счи-

тается двугradientная модель. Согласно этой модели дифференцировка передне-заднего концов нервной пластинки, равно как и ее первичная регионализация, контролируется двумя морфогенетическими факторами: мезодермолизующим и нейролизующим. Первый фактор вырабатывается клетками вентральной мезодермы, способен диффундировать на большие расстояния и подавлять развитие нейральной эктодермы. Концентрация мезодермолизующего фактора равномерно уменьшается по направлению к дорзальной эктодерме. Вторым фактором, нейролизующим, вырабатывается всеми клетками презумптивной нейроэктодермы, равномерно распределяется вдоль нервной пластинки и определяет дальнейшее развитие клеток нейроэктодермы по нейральному пути.

**Таблица 14**

Гены, контролирующие различные этапы формирования первичного зачатка центральной нервной системы (нервной пластинки) и его регионализации у человека.

<b>Этап формирования центральной нервной системы</b>	<b>Гены, контролирующие реализацию этапа</b>
Стабилизация нейронального пути развития эктодермы	<i>loc137208 (sox2), zic1, zic2, zic3, loc51053, irx1, irx2, irx3</i>
Дифференцировка передне-заднего концов нервной пластинки	<i>fgf, wnt3a, ra</i>
Первичная регионализация центральной нервной системы	<i>emx, otx, fgf, en, wnt, hox, shh, bmp</i>

Предполагается, что высокая концентрация мезодермолизующего фактора при наличии нейролизующего инициирует дифференцировку спинного мозга. Уменьшение же концентрации мезодермолизующего фактора при неизменной концентрации нейролизующего создает предпосылки для закладки средних отделов головного мозга. Наконец, передние отделы головного мозга закладываются из той части нервной пластинки, где концентрация мезодермолизующего фактора практически сошла на нет, а концентрация нейролизующего сохранилась на прежнем уровне.

На роль мезодермолизующего фактора (-ов) претендуют морфогенетические белки красного костного мозга *BMP2* и *BMP4*. Нейролизующей же активностью обладают довольно разнообразные белковые и небелковые факторы, ключевыми из которых являются факторы роста фибробластов, белки семейства *Wnt*, продукты генов *hox*, *shh*, ретиноевая кислота и другие (см. табл. 14).

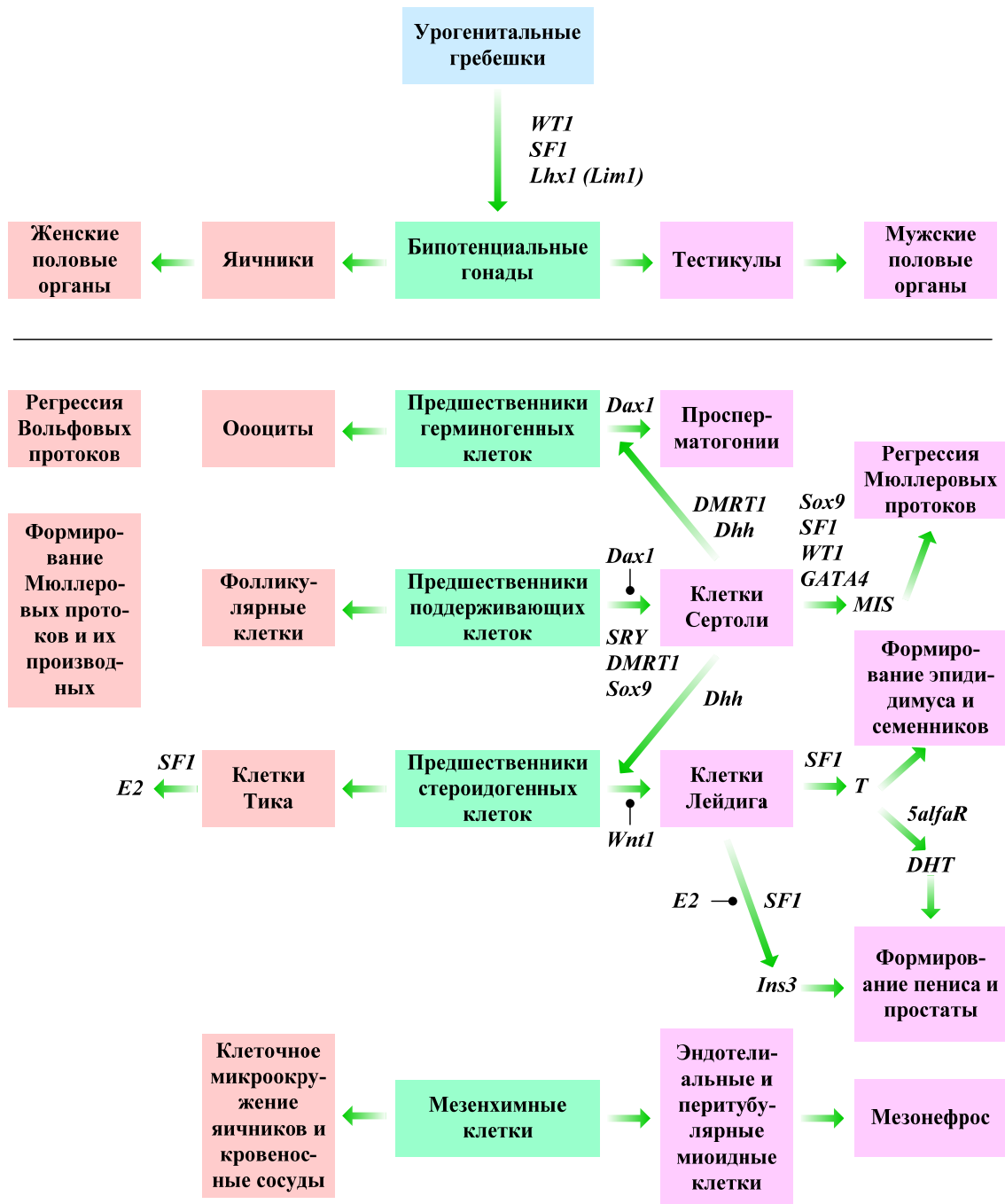
### 4.3. Генетический контроль половой дифференцировки у человека

Интегральная схема генетического контроля индукции и дифференцировки гонад и половой дифференцировки у человека представлена на рис. 36. Не зависимо от типа будущего пола гонады у человека закладываются как бипотенциальные, т. е. способные в конечном итоге дифференцироваться и как в женские, так и в мужские гонады. Такого рода бипотенциальные гонады формируются из клеточных элементов, образующих угоренитальные гребешки. Дифференцировка уrogenитальных гребешков в бипотенциальные гонады инициируется активацией экспрессии ряда специфических генов, продукты которых контролируют этот процесс. Ключевыми из них являются гены *WT1*, *SF1* и *Lhx1*.

Полностью сформированные бипотенциальные гонады состоят из четырех типов клеток: предшественников герминогенных клеток, предшественников поддерживающих клеток, предшественников стероидогенных клеток и мезенхимных клеток. Первые три типа клеток пока еще сохраняют способность дифференцироваться в соответствующие зрелые клетки и мужских и женских гонад. Их дальнейший путь развития зависит от белкового продукта Y-сцепленного гена *SRY*.

Установлено, что белковый продукт гена *SRY* является транскрипционным активатором ряда дифференцировочных генов, в частности, генов *DMRT1* и *Sox9*. Появление такого белка в предшественниках поддерживающих клеток обеспечивает их дифференцировку в клетки Сертоли. Полностью дифференцировавшись клетки Сертоли, будучи вспомогательными клетками мужских гонад, начинают активно секретировать белки *DMRT1* и *Dhh*. Последние, являясь регуляторами дифференцировки, контролируют дифференцировку предшественников герминогенных клеток в просперматогенные клетки. Обнаружено, что в этом процессе важную роль играет и еще один ген – ген *Dax1*. Белковый продукт гена *Dax1* строго необходим для нормальной дифференцировки просперматогенных клеток, однако, при усиленной экспрессии указанного гена (например, из-за амплификации), происходит блокирование мужского пути развития гонад и направление его по женскому пути (даже при наличии активно работающего гена *SRY*).

Клетки Сертоли принимают активное участие и в дифференцировке предшественников стероидогенных клеток в клетки Лейдига. Возможно, ключевую роль здесь играет один из белков, секретлируемых



**Рис. 36.** Суммарная схема генетического контроля индукции и дифференцировки гонад и половой дифференцировки у человека.

клетками Сертоли – белок *Dhh*, – который и инициирует дифференцировку предшественников стероидогенных клеток в клетки Лейдига. Кроме того, при активации в клетках Сертоли таких генов как *Sox9*, *SF1*, *WT1* и *GATA4* они начинают вырабатывать и секретировать суб-

станцию, ингибирующую формирование Мюллеровых протоков (*MIS*). В полном соответствии со своим названием *MIS* подавляет развитие Мюллеровых протоков, в конечном итоге приводя к их регрессии.

Клеткам Лейдига отводится центральная роль в формировании первичных мужских половых признаков, таких как закладка и созревание эпидидимуса, семенников, простаты, формировании пениса и т. д. Свою функцию клетки Лейдига выполняют через продукцию стероидных гормонов, таких как тестостерона, и секрецию инсулиноподобного ростового фактора 3 (или инсулина-3). Так, тестостерон, вырабатываемый клетками Лейдига в ответ на усиление экспрессии в них же самого гена *SF1*, контролирует формирование эпидидимуса и семенников, а в кооперации с инсулином-3 – пениса и простаты.

Оставшиеся пока не в удел мезенхимные клетки бипотенциальных гонад при формировании мужской половой системы дифференцируются в эндотелиальные клетки и перитубулярные миоидные клетки мезонефроса. При формировании же женской половой системы они дифференцируются в клетки микроокружения яичников и эндотелиальные клетки. В целом, развитие женской половой системы не требует дополнительных “усилий” со стороны генома клеток бипотенциальных гонад, так как они изначально запрограммированы по женскому пути дифференцировки. Так, при инактивации гена *SRY* или чрезмерной активности гена *Dax1* (например, из-за генных мутаций) у эмбриона с кариотипом 46 XY будет сформирована женская половая система. При этом предшественники герминогенных клеток дифференцируются в ооциты, предшественники поддерживающих клеток – в фолликулярные клетки, а предшественники стероидогенных клеток – в клетки Тика, вырабатывающие эстрогены. Гормональная активность клеток Тика в конечном итоге обеспечивает формирование зрелых Мюллеровых протоков и их производных и регрессию Вольфовых протоков.

### **4.3. Генетические аспекты старения человека**

Термин "старение" применяется для обозначения целого спектра явлений, порой не имеющих между собой ничего общего. Так, нам известны процессы старения полимеров, старения семян, старения машин, старения галактик, однако все эти процессы не являются чем то одним и тем же. Даже если мы возьмем мир живой природы, то старе-



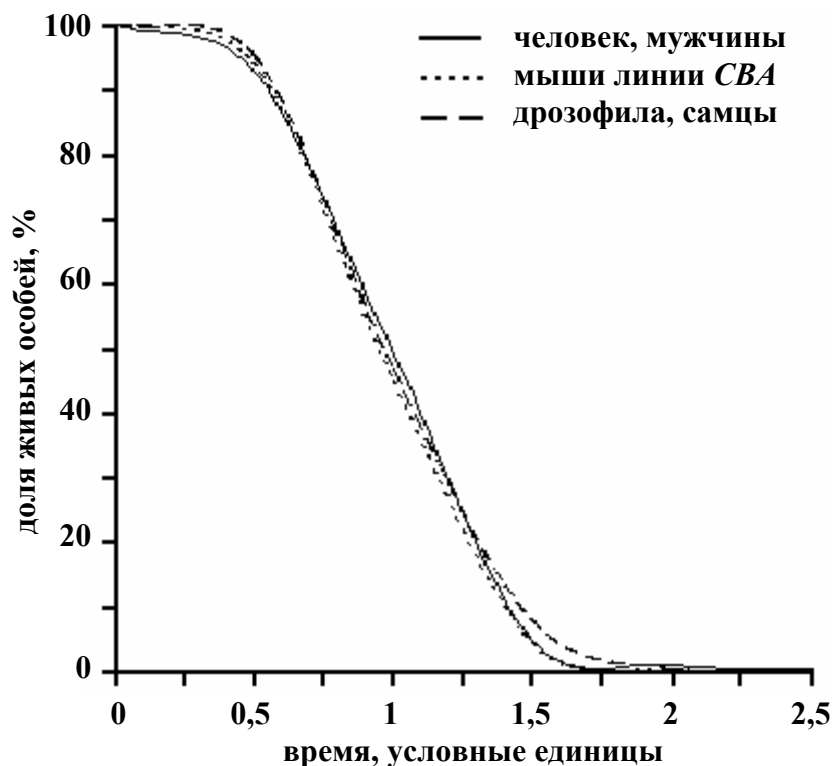
ние клонов микроорганизмов и старение, скажем, растений или человека, будут все же отличаться друг от друга.

Относительно живых организмов существуют некоторые разночтения в определении понятия "старение", что, по-видимому, обусловлено в первую очередь нашим непониманием и слабой изученностью этого феномена. В Большом энциклопедическом словаре старение определяется как "закономерный, разрушительный процесс возрастных изменений организма, ведущих к снижению его адаптационных возможностей и увеличению вероятности смерти". Это определение впервые было предложено А. Комфортом более 30 лет назад и именно такого определения понятия "старение" придерживаются почти все современные геронтологи. В таком единодушии нет ничего удивительного, поскольку это определение напрашивается само собой, когда начинаешь анализировать возрастные изменения клеток, тканей, органов, систем органов и организма в целом. А таких изменений множество, причем нередко в одном и том же органе и даже в одной клетке наблюдается несколько разных сенильных нарушений. По-видимому, именно с этим связано то, что в настоящее время предложено порядка 400 гипотез о механизмах старения.

Многообразие проявлений возрастных изменений организма наводит на мысль, что за этот процесс отвечает множество механизмов, причем, возможно, мало связанных друг с другом. Однако такая идея не согласуется с некоторыми фактами, которые, наоборот, указывают на существование некоего общего и универсального для всех живых организмов механизма старения и смерти. Так, динамика смертности, проявляющаяся в кривых выживания, у таких разных организмов, как дрозофила, мышь и человек, поразительно сходна, что проиллюстрировано на рис. 37. На этом рисунке кривые выживания (кривые, описываемые уравнением  $n(t)/n(0)$ , где  $n(t)$  – число особей в синхронной экспериментальной группе, доживших до возраста  $t$ ) дрозофилы, мыши и человека приведены в универсальном масштабе, когда средняя продолжительность жизни принята за 1. Несмотря на разницу в реальной продолжительности жизни дрозофилы и человека на три порядка, динамика их смертности идентична.

Динамику смертности можно было бы описать распределением случайной величины, каковой является зависимость вероятности гибели особей из исследуемой популяции от времени. В природе распределения вероятностей многих событий имеют одинаковое – нормальное, или Гауссово, распределение. Это всегда верно, когда изу-

чаемое событие является следствием многих других независимых событий. Однако динамика смертности достоверно отличается от распределения Гаусса (кривые смертности имеют неравный 0 эксцесс и отличную от 1 асимметрию). Следовательно, смерть не есть следствие случайных процессов (например, накопления тех или иных случайных повреждений), но результат работы определенного механизма. Поскольку совпадают безразмерные параметры распределений, включая самый точный из них – коэффициент вариации, резонно предположить, что механизм старения и смерти различных организмов имеет некую общую основу. В связи с этим, прежде чем мы приступим к рассмотрению теорий старения, нам предстоит найти этот универсальный механизм (и его субстрат, основу), существование которого служит гарантией стопроцентной смертности организмов, дабы иметь точку опоры для анализа.



**Рис. 37.** Кривые выживания разных видов животных и человека.

Формальная логика подсказывает нам, что материальным носителем (субстратом), где может быть записана программа старения, является ДНК. К такому выводу приходишь, когда учиываешь, что смертность – это одна из инвариантных констант живых организмов.

Особенность же биологических констант заключается в том, что все они, так или иначе, записаны в ДНК, ибо только через эту молекулу осуществляется информационная и материальная преемственность живой материи.

Итак, какие же доказательства генетической природы старения мы имеем на сегодняшний момент? Для удобства анализа весь фактологический материал представляется целесообразным разделить на несколько групп, причем в пределах каждой группы мы постараемся изложить и факты "за" и факты "против".

#### **4.3.1. Продолжительность жизни человека**

Видовая продолжительность жизни у человека точно не установлена, но полагают, что она находится в пределах 100-130 лет. Однако в литературе встречаются описания людей, проживших гораздо более длительный срок. Так, есть описание японской семьи Мамие, где главе семьи якобы было 242 года, его жене – 221 год, сыну – 201 год, жене сына 193 года, внуку 153 года, жене внука – 138 лет. Другой пример – англичанин Фома Кари, который будто бы пережил 12 королей и умер в возрасте 207 лет. Приводятся и другие примеры долгожителей, однако насколько точно определен их возраст – сказать сложно. Дело в том, что зачастую крайне трудно установить истинный возраст долгожителей. При проверке часто оказывается, что в ряде случаев мы имеем дело с искажением истинного возраста. Старики часто умышленно увеличивают себе возраст (так называемое "старческое кокетство"). Так, во время экспедиции по изучению продолжительности жизни на Горном Алтае (одном из очагов долголетия на планете) в 1963 г. ученые столкнулись с фактом неправильной записи возраста при получении паспорта. Например, одному жителю по паспорту было 208 лет (год рождения – 1755). Тщательная же проверка показала, что ему всего 97 лет. При паспортизации алтайцев в документы зачастую записывали возраст, который назывался весьма произвольно. Кроме того, могли просто ошибиться не очень грамотные тогдашние секретари аймачных сельсоветов, многие из которых не знали алтайских наречий и т. д.

Таким образом, вопрос о максимальном возрасте человека остается открытым. Наиболее вероятным пределом человеческой жизни, ограниченным смертью, по-видимому, следует считать все же 120-130 лет. Причем вероятность смерти ("коэффициент смерти"

$K = 1/n(t) \times dn(t)/dt$ , где  $t$  – возраст, а  $n(t)$  – количество индивидуумов в возрасте  $t$ ) для человека растет с возрастом. Непосредственный расчет предельного значения вероятности смерти невозможен, поэтому предельная вероятность – всегда продукт аппроксимации, – и она никогда не равна 1. Поэтому теоретически у человека всегда есть шанс стать бессмертным. Так, согласно расчетам Феллера Г., теоретически возможно появление человека, который проживет 1000 лет, среди  $10^{34}$  людей. Однако указанная численность людей представляется невероятной (даже если увеличить численность ныне существующих людей на Земле в 10 миллиардов раз и человечество просуществует в 10 миллиардов раз дольше, чем оно существовало с момента возникновения до сих пор, то и тогда количество людей, побывавших на Земле, не превысит указанной величины), поэтому невероятно и предполагаемое событие (т. е. появление тысячелетнего долгожителя). Однако какой бы ни была по продолжительности жизнь человека, нас интересует вопрос, детерминируется ли этот предел генетически, передается ли этот показатель по наследству.

Связь между долголетием родителей и детей была подмечена давно. Еще Ч. Дарвин писал, что "... крепкое здоровье, выносливость и долговечность наследственны". Эту мысль подтверждают результаты исследований Р. Пирля и других ученых. По данным Р. Пирля, 86% людей, доживших до 90 и 100 лет, имели одного или обоих долголетних родителей. У родителей с небольшой продолжительностью жизни дети не отличались долголетием. Р. Росль и его ученики проанализировали родословную известных ученых М. Шульца и Э. Геккеля и установили в их семьях большую частоту глубокой старости, высокую плодовитость, малую детскую смертность. Как подчеркивают многие исследователи, долговечные семейства отличаются небольшой детской смертностью. А. Плотц изучил с этой точки зрения европейские царствующие фамилии XVIII-XIX вв., т. е. семьи, где совершенно исключены плохой уход за детьми и недоедание. На материале 5500 детей он подтвердил полный параллелизм между большой продолжительностью жизни родителей и малой смертностью детей в возрасте до 5 лет. Следует отметить, что наследуемость долголетия выявлена не только у англосаксов, но и у финнов, китайцев, казахов, болгар и т. д.

Считается, что как мать, так и отец вносят примерно одинаковый вклад в передачу долголетия потомству. Е. Белл изучил продолжительность жизни около 3000 потомков из одного американского семейства. У потомков, умерших ранее 20 лет, среди отцов было лишь

24,1% долгожителей (80 лет и более), у умерших между 50 и 80 годами – уже 37,5%, а у умерших в 80 лет и более – 46%. Схожая связь наблюдалась и между продолжительностью жизни потомков и их матерей. По данным Р. Пирля, у 49% 90-летних и у 53% 100-летних долгожителей долголетними были и отец, и мать. Аналогичные данные получены и многими другими исследователями. Например, по данным советских исследователей П. С. Степанова и А. С. Агаджанова, изучивших 2468 долгожителей, наследственное долголетие отмечалось в 1184 случаях (48%). При этом преобладания долголетия по отцовской или материнской линии не наблюдалось. Среди долгожителей было 524 мужчин и 660 женщин. Около 80% из них родилось в семье первыми от молодых родителей. Лица, не имевшие долголетних предков, родились первенцами в 55%. Однако финская исследовательница Е. Яловисто подчеркивает большую роль матери в долголетию детей, нежели отца.

Тем не менее, не смотря на имеющиеся данные по связи между продолжительностью жизни родителей и их детей коэффициент корреляции (и, как следствие, коэффициент наследуемости) для этого показателя невелик – всего 0,14. В тоже время однояйцевые близнецы характеризуются высокой конкордантностью по продолжительности жизни. Так, Ф. Кальман выяснил, что однояйцевые близнецы, живущие в разных условиях среды, умирают в большинстве случаев в одинаковом возрасте. У однояйцевых близнецов, умерших в возрасте 60-74 лет, разница средней продолжительности жизни примерно в 2,5 раза меньше, чем у двуяйцевых. Для близнецов, умерших в возрасте старше 74 лет, эта разница стирается. Продолжительность жизни близнецов зависит от длительности жизни их родителей, причем влияние возраста как матери, так и отца было одинаковым. Это противоречит данным Е. Яловисто о том, что длительность жизни матери влияет на долголетие потомков обоих полов, а длительность жизни отцов – только на долголетие сыновей.

Наблюдаемый феномен – низкий коэффициент корреляции по продолжительности жизни между отцами и детьми и конкордантность по этому признаку однояйцевых близнецов, – может быть объяснен, по-видимому, только мультифакториальной природой старения и продолжительности жизни.

#### **4.3.2. Инбридинг и аутбридинг**

В сообществах людей, длительное время находящихся в изоляции по географическим, религиозным, расовым или иным причинам, обычно часты различные формы инбридинга. Подобные изоляты значительно насыщены теми или иными отдельными генами. В этих условиях возрастает вероятность появления гомозиготных по этим генам организмов. При нарушении изоляции степень этого насыщения уменьшается; вероятность возникновения гетерозиготных особей увеличивается. Там, где идет процесс нарушения изоляции, где высока частота браков между представителями отдельных изолятов, там наиболее часто можно встретить гетерозисное усиление жизнеспособности, которое может выразиться в повышении долголетия. Быть может, этим объясняется тот факт, что долголетие чаще встречается в горных или других районах, где можно предполагать наличие изолятов.

Рассмотрим это на конкретном примере – на примере продолжительности жизни жителей Горного Алтая. Отдельные группы коренных жителей Горного Алтая в течение долгих веков жили более или менее изолированно, в небольшом районе, населенном тем или иным родом. В результате формировались устойчивые изоляты населения. После присоединения Алтая к России начался интенсивный процесс нарушения этих изолятов. Происходило политическое, экономическое, культурное объединение доселе разрозненных групп и племен полудиких кочевников в единую народность алтайцев. В процессе нарушения изолятов стали частыми браки между представителями различных групп населения, каждая из которых ранее характеризовалась признаками инбридинга. Эти условия благоприятствовали проявлению гетерозиса, который и явился, по мнению некоторых исследователей, одной из причин высокого долголетия на Алтае.

Однако повышенную жизнеспособность долгожителей Горного Алтая можно объяснить не только гетерозисом. Можно предполагать наличие у долгожителей хорошо сбалансированного набора генов, высокой помехоустойчивости их генотипа, передающегося от родителей потомкам.

### **4.3.3. Возраст родителей и продолжительность жизни детей**

О важной роли наследственных факторов в процессах старения и долголетия человека говорит влияние возраста родителей на продолжительность жизни детей. Потомки старых родителей менее долговечны. У старых матерей больше рождается детей с различными на-

следственными аномалиями. Однако эта закономерность может проявиться только на статистическом уровне. Отклонения от этого правила очень значительны.

Частота врожденных аномалий выше также и при более поздних родах. Продолжительность предстоящей жизни старших детей в семье больше, чем их младших братьев и сестер. У человека влияние возраста родителей на жизнеспособность потомства объясняется повреждением с возрастом генетических структур в половых клетках. Человек постоянно подвергается действию природных ионизирующих излучений – космических лучей, излучений, испускаемых радиоактивными изотопами вне организма или внутри его и т. п. Кроме того, на генетический аппарат клетки действуют другие факторы, вызывающие мутации – свободные радикалы, некоторые химически активные продукты обмена веществ, колебания температур и т. д. С возрастом число мутаций в клетках накапливается, в том числе и в половых. Поэтому половые клетки у молодого организма содержат меньше мутаций, они более полноценны, чем у старого. Дети, развивающиеся из половых клеток более старого организма, менее долговечны, чем из половых клеток молодого. Особенно влияет на продолжительность жизни потомков возраст матери: чем старше возраст матери, тем меньшая продолжительность жизни у ее потомков. Эта закономерность обнаружена не только у человека, но и у большого количества видов других животных, а так же у растений.

#### **4.3.4. Прогерии**

У человека известно два синдрома, при которых наблюдается преждевременное старение организма и наступает ранняя смерть: синдром Вернера и синдром Гетчинсона-Гилфорда. Существование этих синдромов является еще одним доказательством роли генетических механизмов в контроле старения и смерти. Кроме того, они являются естественными биологическими моделями, на которых можно изучать процессы старения.

При синдроме Вернера (или прогерии взрослых), впервые описанном в 1904 г. О. Werner, заболевание проявляется в возрасте от 15 до 30 лет. Типичными клиническими симптомами этого заболевания являются задержка роста, раннее поседение, облысение, выпадение зубов, склеродермия, особенно выраженная на конечностях, атрофия подкожного жирового слоя и мышечной ткани. На стопах и лодыжках

в местах давления возникают плохо заживающие язвы, в мягких тканях конечностей обнаруживаются кальцификаты. Лицо сморщенное, нос клювовидный (рис. 38 А). В 20-30 лет развиваются двусторонняя катаракта, макулярная дегенерация, пигментный ретинит и хориоретинит. Эндокринная патология включает сахарный диабет и гипогонадизм. Характерны бесплодие, импотенция, дисменорея или аменорея, отсутствие либидо, высокий голос, гинекомастия, скудное оволосение в подмышечных впадинах и на лобке. Рентгенологически выявляются остеопороз, деформации костей стоп, остеоартриты периферических суставов, спондилез. Наблюдаются признаки генерализованного артериосклероза, стенокардия и инфаркт миокарда; нередко злокачественные новообразования. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Установлено, что ген, ответственный за проявление названных выше признаков, локализован в области *p12-p11* 8-й хромосомы.



**Рис. 38.** Синдромы преждевременного старения у человека. А) Фотография пациента с синдромом Вернера. Б) Фотография пациента с синдромом Гетчинсона-Гилфорда.

Синдром Гетчинсона-Гилфорда (или истинная прогерия) впервые был описан в 1886 г. J. Hutchinson. Его популяционная частота равна приблизительно 1:250000 (соотношение мужского и женского пола 2:1). При этом заболевании пациенты имеют характерный внешний вид: низкий рост, относительно большую голову и уменьшенную лицевую часть черепа, небольшой тонкий клювовидный нос, микрогнатию, экзофтальм, оттопыренные уши (рис. 38 Б). Кожа чрезвычайно тонкая, лоснящаяся, сухая, натянута, а на руках и стопах вялая и морщинистая; в нижней части живота и на бедрах кожные изменения напоминают склеродермию. С возрастом появляются небольшие коричневатые



пигментные пятна на фоне малопигментированной кожи, склонной к солнечным ожогам. Подкожный жировой слой полностью отсутствует за исключением лобковой области. Наблюдаются тотальная алопеция (иногда пушковые волосы сохранены), отсутствие бровей и ресниц. На черепе выражена подкожная венозная сеть. Ногти дистрофичные, маленькие, аномальной формы, ломкие, могут вообще отсутствовать.

Кроме того, при этом синдроме отмечаются задержка прорезывания и дефекты расположения зубов; нарушение дентиногенеза, аномалии прикуса; раннее разрушение молочных и постоянных зубов. К особенностям скелета таких больных относятся: трубчатые кости и ребра тонкие, длинные; суставы (особенно коленные) выступают, умеренно тугоподвижны; грудная клетка узкая, грушевидная; кифоз, короткие ключицы и узкие плечи, аномальная форма позвонков, позднее закрытие родничков. Больные отстают в половом развитии, бесплодны. Иногда имеются неврологические симптомы – асимметрия черепной иннервации, нистагм, анизорефлексия и судороги. Характерны ранний атеросклероз коронарных артерий, аорты, мезентериальных сосудов, а также инфаркт миокарда и нарушения мозгового кровообращения. Продолжительность жизни – 7-27 лет. В крови повышен уровень холестерина и липопротеидов. Исследование коллагеновых волокон обнаруживает их дезорганизацию, утолщение, снижение растворимости. На аутопсии выявляют генерализованный атеросклероз, фиброз миокарда; отложение жироподобного вещества в мозге, коре надпочечников, почках, печени, половых железах; истончение коркового слоя в костях. В отличие от синдрома Вернера для синдрома Гетчинсона-Гилфорда тип наследования не установлен, равно как не обнаружен и первичный генетический дефект, приводящий к этому заболеванию.

Преждевременное старение наблюдается и при некоторых других синдромах, например, при синдроме Дауна и синдроме Шерешевского-Тернера, однако в этих случаях сенильные изменения организма не столь выражены, как при прогериях.

#### **4.3.5. Раковые и другие иммортализованные клетки человека**

На наш взгляд существование раковых и других потенциально бессмертных клеток так же является аргументом в пользу гипотезы о генетической природе старения. В настоящее время созданы обширные коллекции перевиваемых линий опухолевых и лейкозных клеток человека, а так же иммортализованных *in vitro* нормальных клеток, ко-

торые могут практически неограниченное время поддерживаться в культуре. Так, например, В-лимфобластная линия IM-9 была впервые получена в 1967 году, однако до сих пор клетки этой линии успешно размножаются *in vitro*. Наиболее известными коллекциями (банками) таких клеточных культур являются американская коллекция ATCC, германский банк клеточных культур DSM ACC и европейская клеточная коллекция ECACC. В связи с тем, что такого рода клеточные культуры могут использоваться как модели для изучения процессов старения на уровне индивидуальных клеток, немного позже мы еще вернемся к этой проблеме.

#### 4.3.6. Экспериментальные биологические модели

Интерес к проблеме старения стимулировал многих исследователей к разработке и анализу подходящих биологических моделей этого процесса. В связи с этим к настоящему моменту разработано довольно много таких экспериментальных моделей. Поскольку анализ всех моделей займет много времени, то мы остановимся лишь на некоторых из них.

У излюбленного объекта классической генетики – плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, – в настоящее время обнаружено около 50 генов, мутации в которых влияют на продолжительность жизни. Они локализованы в 10% генома, откуда сделано формальное заключение, что всего таких генов может быть до 500. Особый интерес представляет ген *methuselah* (*mth*), названный так в честь библейского долгожителя Мафусала. Этот ген не только увеличивает среднюю продолжительность жизни насекомых на 35%, но и повышает их резистентность к высокой температуре и параквату – гербициду, который может повреждать клетки путем генерирования свободных радикалов. Кроме этого, Гельфанд С. Л. с соавт. в 1995 году показали, что работа некоторых генов взрослой дрозофилы разворачивается по строгому графику. Причем при изменении продолжительности жизни исследуемой линии в 3 раза адекватно меняются и графики работы этих генов.

У другого объекта молекулярно-генетических исследований – *Caenorhabditis elegans*, – Эберт Р. с соавт. (1996) нашли 10 локусов, ответственных за продолжительность жизни этого вида нематод. Авторы отмечают, что увеличение продолжительности жизни *C. elegans* коррелирует с повышением уровня каталазы и супероксиддисмутазы у старых нематод. Интересна так же работа Йохансона Т. Е. с соавт.,

при проведении которой был обнаружен ген, нормальный аллель которого сокращает продолжительность жизни нематод – *age-1*, – мутация же в нем на 70% увеличивает продолжительность жизни.

Гены, ответственные за старение и продолжительность жизни, обнаружены не только у животных, но и у других организмов. Так, Россигнол М. и Силар П. в 1996 году показали, что у нитчатого гриба *Podospora anserina* на продолжительность жизни может влиять очень много генов (между 600 и 3000). Причем среди мутаций, которые влияют на продолжительность жизни, есть как увеличивающие, так и уменьшающие ее на 50%.

### **4.3.7. Теории старения человека**

#### **4.3.7.1. Теория изнашивания**

Теория изнашивания восходит к концепции А. Вейсмана о непрерывности зародышевой плазмы и служебности функций сомы, обеспечивающей выживание половых клеток до момента размножения. По выражению Т. Кирквуда, пессимистически оценивающего средний запас прочности тела человека в 40 лет, это "концепция сомы одноразового использования". А. Вейсман сформулировал свое понимание проблемы старения следующим образом: "Конечной причиной, определяющей продолжительность жизни, является изнашивание, которому подвергаются особи в течение их существования. Смерть кажется мне целесообразной, так как изношенные особи для вида не имеют цены и даже вредны, отнимая место у лучших". По предположению А. Вейсмана, старение эволюционно выработалось при переходе от бессмертных одноклеточных к многоклеточным на основании сформулированного им же механизма "ретрогрессивной эволюции", подобно тому, как приспособления, лишённые адаптивной ценности (скажем, зрение у подземных животных), регрессируют в рудименты. По А. Вейсману, природа не пошла по пути совершенствования реактивности (адаптивности) организма до точки достижения индивидуального бессмертия, потому что создать "одноразовый футляр" для бессмертных клеток зародышевой линии оказалось эволюционно дешевле. Поэтому "сома" несовершенна и изнашивается, что приводит к падению репродуктивного потенциала клеток (по другой авторской версии, этот потенциал первично эволюционно ограничен). Концепция А. Вейсмана, возможно, один из наиболее общих ответов на во-

прос, почему реактивность организма не дала ему абсолютно совершенных приспособлений. Такое совершенство излишне для выполнения репродуктивного долга, которое А. Вейсман и считал целью выживания.

Дальнейшее свое развитие концепция А. Вейсмана получила в работах таких ученых как Р. Гертвиг, М. Рубнер, И. И. Мечников и др. Так, И. И. Мечников создал учение, трактующее изнашивание организма как результат аутоинтоксикации кишечными ядами. "Причина смерти – самоотравление организма... Чем длиннее толстые кишки – тем жизнь короче", – афористично выразился нобелевский лауреат.

Молекулярные механизмы износа организма человека стали выясняться во второй половине XX века. Исторический шаг был совершен Д. А. Хэрменом, который предположил, что изнашивание макромолекул организма может вызываться свободными (активными) кислородными радикалами (АКР). Согласно его гипотезе, изнашивание и гибель клеток при старении обусловлено сдвигом редокс-состояния организма, который происходит с возрастом.

Усиление генерации и длительности существования АКР и ослабление антиоксидантных систем клеток действительно отмечено при старении и особенно выражено при прогериях. Так, гемосидерин, накопление которого в старости характерно для макрофагов, образуется при участии железозависимых аутоокислительных процессов. Схожим образом пигмент старения липофусцин, откладывающийся в стареющих тканях, образуется при участии процессов перекисного окисления липидов. Эти же процессы приводят и к возрастным изменениям состояния биологических мембран (в частности, обуславливают циклизацию мембранных липидов), ухудшению дренажной функции липопротеидов высокой плотности и т. д.

Кроме того, установлено, что АКР способны вызывать кумулируемые повреждения структуры и функции ферментов и других белковых молекул. Так, с течением времени в ферментативных белках организма нарастает количество поперечных сшивок и карбонильных групп, являющихся результатом окисления. Это приводит к нарушению их нормального функционирования или полной инактивации, замедляет метаболизм таких белков и, в конечном итоге, отражается на работе отдельных органов и организма в целом. При этом функциональные изменения, например, в мозге грызунов, могут быть временно обращены путем введения антиоксидантов (фенилбутилнитрона, дибунола и т. п.).

В целом, систематическое применение пищевых антиоксидантов или повышение резистентности организма к АКР за счет эндогенных факторов продлевает жизнь млекопитающих. Так, для гормона тироксина, который при высоких концентрациях замедляет процессы старения некоторых тканей, в настоящее время показано, что он является феноловым антиоксидантом. М. Р. Роуз и соавт. в 1991 году вывели чистую линию дрозофил-долгожительниц, у которых оказалась резко повышена активность супероксиддисмутазы, увеличена способность к использованию жирных кислот и запасанию гликогена. Т. Э. Джонсон вызвал у червя *C. elegans* индуцированную мутацию в гене *age-1*, повышающую продолжительность жизни. Мутантный ген *age-1*, как оказалось, кодирует ингибитор антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, которые значительно активизировались у червей-долгожителей. Таким образом, имеются все основания отводить теории Д. А. Хэрмена интегрирующую роль в исследовании механизмов старения.

Правда, не все факты легко укладываются в рамки предложенной теории. Остается, например, непонятным, почему при синдроме Дауна, когда количество генетического материала 21 хромосомы, кодирующей цитоплазматическую *Cu/Zn*-зависимую форму супероксиддисмутазы, увеличено, продолжительность же жизни, наоборот, снижена. Возможно, дело в компенсаторном снижении активности митохондриальной *Mn*-зависимой супероксиддисмутазы, кодируемой в 6-й хромосоме, или же существуют иные механизмы, объясняющие данный феномен.

#### **4.3.7.2. Теория генетически запрограммированной инволюции**

Наблюдения о наследуемом характере предрасположенности к долгожительству и о существовании наследственных синдромов с ускорением старения (таких, как описанные выше прогерии, а также синдромы Дауна и Шерешевского-Тернера), культуральное бессмертие малигнизированных и иных гетероплоидных клеток, несущих соматические мутации – все это наводит на мысль, что процесс старения контролируется или даже индуцируется генетически. Зоологи, обнаружив запрограммированную гибель после нереста у тихоокеанского лосося и ряда других видов животных, размножающихся лишь однажды, тоже пришли к подобной идее, а первым был опять-таки фрейбургский профессор зоологии Август Вейсман, указывавший, что *Lepidoptera*

потеряли способность к продолжению жизни после размножения из-за действия того же "ретрогрессивного" эволюционного механизма, который сделал их взрослые особи безротыми.

Сложившаяся на этой основе альтернативная теория старения может быть охарактеризована, как теория генетически запрограммированной инволюции. Еще в конце 19-го века Е. Пфлюгер говорил о "декременте творческой силы зародыша, восстанавливаемой только оплодотворением", а русский физиолог И. Р. Тарханов высказал мысль, что "причиной естественной смерти служит не изнашивание самих клеток, а прогрессирующее ограничение способности клеток к созиданию и размножению". Причиной утраты пролиферативного потенциала он прозорливо считал изменения ядерного вещества.

В настоящее время считается, что гены, контролирующие старение (геронтогены), могут локализоваться в 1-й и 4-й хромосомах. Как полагают некоторые ученые, геронтогены могли сохраниться в эволюции в силу сцепления с полезными аллелями или из-за антагонистической плейотропии, когда один и тот же ген обуславливает ранние селективные преимущества, но вызывает вред при экспрессии в позднем возрасте. По выражению П. Медавара, старение – побочный результат снижения с возрастом коррелирующей силы естественного отбора, своего рода "дальнозоркость природы".

На роль таких геронтогенов с антагонистическим плейотропным эффектом могут претендовать гены, контролирующие программируемую клеточную гибель. Действительно, с одной стороны, эта программа необходима для нормального формирования и функционирования многоклеточного организма. Вместе с тем она делает неизбежной постепенную убыль неделящихся клеток, вызывая их гибель от тех или иных повреждений, которые сами по себе, возможно, и не абсолютно летальны для клетки. Поскольку фонд таких клеток достаточно велик, это плейотропное действие программы клеточной гибели будет проявляться довольно поздно, не сказываясь на плодовитости индивидуума и жизнеспособности потомства. Аналогичным эффектом могут обладать и гены, контролирующие выработку половых гормонов, интенсивная работа которых, безусловно, биологически выгодна в репродуктивный период, но может способствовать развитию опухолей гормонозависимого характера в более позднем возрасте.

Конечно, прекращение или ослабление пролиферации клеток еще не равнозначно сенильным изменениям в организме, тем более, что

нейроны и кардиомиоциты, от которых так зависит жизнь организма, как раз в постнатальном онтогенезе не делятся. Более того, фибробласты, взятые от умирающих престарелых индивидов еще сохраняют способность дать несколько поколений клеток в культуре.

Наконец, Л. Сцилларду принадлежит идея, что старение может быть вызвано накоплением соматических мутаций в организме, идея, следующая старым взглядам немецких авторов о решающей роли естественной радиации в старении. Интегративная окислительная теория старения признает роль соматических мутаций и трактует их, как следствие действия АКР на ДНК. С этой точки зрения, гены, контролирующие функции антиокислительной системы, могут быть решающими в определении продолжительности жизни. Теоретически, наиболее уязвимой для АКР должна быть ДНК митохондрий, где кислородные радикалы могут во множестве формироваться. И действительно, установлено, в частности, что в ходе онтогенеза миокарда и мозга у престарелых людей наблюдается накопление дефектов митохондриальной ДНК. Предполагается, что это может нарушать функцию митохондрий и вызывать энергетический голод в стареющих клетках по типу сенильной тканевой гипоксии.

## ЛИТЕРАТУРА

---

1. Балахонов А. В. Ошибки развития / Изд. 2-е, перераб. и дополн. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2001. 288 с.
2. Корочкин Л. И., Михайлов А. Т. Введение в нейрогенетику. М.: Наука, 2000. 274 с.
3. Приходченко Н. Н., Шкурат Т. П. Основы генетики человека. Ростов-на-Дону: Феникс, 1997. 368 с.
4. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2 т. / Пер. с англ. М.: Мир, 1998. 376 с.
5. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3 т. / Пер. с англ. М.: Мир, 1989-1990. 1056 с.
6. Gilbert S. F. Developmental biology, 7<sup>th</sup> edition. // Sinauer Associates, Inc., 2003. 750 p.
7. Moody S. A., Je H.-S. Neural induction, neural fate stabilization and neural stem cells. // Reviews in stem and progenitor cells. – 2002. – Vol. 2. – P. 1147-1166.
8. Strachan T., Read A. P. Human molecular genetics. BIOS Scientific Publishers Ltd, 1996. 702 p.
9. Swain A., Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. // Genes and Development. – 1999. – Vol. 13. – P. 755-767.



## ОГЛАВЛЕНИЕ

---

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>ГЛАВА 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА</b> .....	5
1.1. Митохондриальный геном человека .....	7
1.1.1. Митохондриальные гены .....	7
1.1.2. Митохондриальный генетический код .....	11
1.2. Структурно-функциональная организация ядерного генома человека .....	11
1.2.1. Гены и геноподобные последовательности .....	12
1.2.2. Внегенная ДНК .....	41
<b>ГЛАВА 2. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА</b> .....	52
2.1. Структурная организация хроматина .....	53
2.2. Структурная организация хромосом .....	56
2.2.1. Приготовление препаратов метафазных хромосом человека .....	57
2.2.2. Нормальный кариотип человека в метафазе митозе .....	60
2.3. Функциональное значение хромосом .....	69
2.3.1. Центромерные регионы хромосом .....	70
2.3.2. Теломерные концы хромосом .....	71
2.3.3. Точки начала репликации хромосом .....	72
<b>ГЛАВА 3. РЕАЛИЗАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА</b> .....	74
3.1. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне транскрипции .....	76
3.1.1. Взаимодействие тканеспецифических транскрипционных факторов с цис-элементами генов .....	76
3.1.2. Взаимодействие гормонов, ростовых факторов и интермедиатов с отвечающими элементами генов .....	80
3.1.3. Использование альтернативных промоторов .....	81
3.1.4. Организация генов в мультигенные транскрипционные единицы .....	82
3.2. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне процессинга РНК .....	82
3.2.1. Тканеспецифический альтернативный сплайсинг РНК ...	82
3.2.2. Тканеспецифическое альтернативное полиаденилирование РНК .....	84

3.2.3. Тканеспецифическое альтернативное редактирование РНК .....	84
3.3. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне трансляции .....	86
3.3.1. Избирательная деградация мРНК .....	86
3.3.2. Избирательная трансляция мРНК .....	89
3.4. Регуляция экспрессии генов у человека на уровне посттрансляционной модификации белков .....	89
3.5. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов у человека .....	90
3.5.1. Межклеточное контактное взаимодействие .....	91
3.5.2. Метилирование ДНК .....	91
3.5.3. Конкуренция за энхансеры или сайленсеры .....	93
3.5.4. Компактизация хроматина .....	93
3.5.5. Эффект положения гена .....	96
3.5.6. Геномный импринтинг .....	97
3.5.7. Инактивация X-хромосомы .....	99
3.5.8. Аллельное исключение .....	100
<b>ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА .....</b>	<b>102</b>
4.1. Основные принципы генетического контроля индивидуального развития человека .....	102
4.2. Генетический контроль ранних этапов развития центральной нервной системы человека .....	104
4.2.1. Нейральная индукция .....	105
4.2.2. Стабилизация нейрального пути развития эктодермы ..	108
4.2.3. Дифференцировка передне-заднего концов нервной пластинки и ее первичная регионализация .....	108
4.2. Генетический контроль половой дифференцировки у человека	110
4.3. Генетические аспекты старения человека .....	112
4.3.1. Продолжительность жизни человека .....	115
4.3.2. Инбридинг и аутбридинг .....	118
4.3.3. Возраст родителей и продолжительность жизни детей ..	118
4.3.4. Прогерии .....	119
4.3.5. Раковые и другие иммортализованные клетки человека ..	121
4.3.6. Экспериментальные биологические модели .....	122
4.3.7. Теории старения человека .....	123
<b>ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>128</b>