

EFFECT OF ELECTROSTATIC FIELD ON SERINE PROTEASES AND THE PROCESSES OF PROTEOLYSIS WITH THEIR INVOLVEMENT

We have studied the effects of electrostatic field (100 kV/m) on the functional properties and the elements of secondary structure, such as chymotrypsin, trypsin and plasmin. It was established by absorption and fluorescence spectroscopy that exposure to electrostatic field for 4 hours did not result in irreversible structural changes in the molecules of these proteins. It was shown that the electrostatic field unaffected the rate of autolysis chymotrypsin and trypsin and the rate of thrombin-induced formation of fibrin from fibrinogen and fibrinogen plasminolysis. The action of electrostatic field did not alter the molecular weights hydrolysis products of fibrinogen and fibrin by plasmin. When processing a mixture of fibrinogen with erythrocytes electrostatic field we showed that the action of the electrostatic field resulted in release of erythrocyte proteases which cause nonspecific hydrolysis of fibrinogen.

А. А. Чиркин

Витебский государственный университет имени П.М. Машерова

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ: ГНОСЕОЛОГИЧЕСКИЕ И УЧЕБНЫЕ ПРОБЛЕМЫ

У прокариот и эукариот гены представляют собой последовательности нуклеотидов ДНК. На матрице ДНК происходит транскрипция - синтез комплементарной РНК. Далее на матрице мРНК происходит трансляция - синтезируются белки. Существуют гены, кодирующие нематричную РНК (например, рРНК, тРНК, малые РНК), которые экспрессируются (транскрибируются), но не транслируются в белки. Экспрессия генов — это процесс, в ходе которого генетическая информация гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт - различные типы РНК или полипептидные цепи белков. Этот процесс может регулироваться на уровне изменения формы ДНК, ее упаковки, транскрипции, сплайсинга РНК, трансляции, стадии модификации и фолдинга синтезированных белков, а у эукариот добавляются процессы альтернативного сплайсинга и регулируемого транспорта через ядерные поры. Изменения экспрессии генов (или фенотипа клеток) на фоне неизменных последовательностей нуклеотидов ДНК генов изучает эпигенетика. Считают, что эпигенетические изменения сохраняются в ряде митотических делений соматических клеток и даже могут передаваться следующим поколениям. Введение термина «гносеологические проблемы» связано с определением этого понятия в двух основных значениях: 1) как учение о всеобщих механизмах и закономерностях познавательной деятельности как таковой; 2) как философская дисциплина, предметом исследования

которой является одна форма познания - научное познание («эпистемология»).

Целью работы было обобщение основных достижений молекулярной биологии в области исследования проблемы экспрессии генов во взаимосвязи с ролью биохимии, ее познавательного-исследовательского и дидактического содержания в подготовке специалистов биологических и медицинских специальностей.

Материал и методы. В работе проведено сопоставление развития исследовательских технологий, связанных с секвенированием макромолекул, продолжительностью и стоимостью проводимых фундаментальных исследований в области молекулярной биологии и биохимии с содержательной базой наиболее популярных учебников и учебных пособий по биохимии. В работе использованы 15 учебников по биохимии, изданных за последние четверть века [1-15], оригинальные обзоры по достижениям молекулярной биологии и биохимии, а также материалы сайта <https://ru.wikipedia.org/wiki/> после проверки содержания первоисточников.

Результаты. Из определения экспрессии генов, следует, что этот процесс может оцениваться по эффективности процесса транскрипции (РНК клетки) и/или по эффективности процесса трансляции (протеом клетки).

Прокариоты и эукариоты Регуляция экспрессии генов (транскрипции) отличается у прокариот и эукариот. У прокариот (не имеют ядра) регуляция осуществляется на уровне оперона (лактозный оперон, триптофановый оперон, ГАМК-оперон и др.) посредством механизмов правильной посадки РНК-полимеразы в области промотора и использования продукта гена-регулятора – репрессора для управления началом транскрипции. Репрессорами могут быть ДНК-связывающие или РНК-связывающие белки, которые ингибируют экспрессию одного или нескольких генов путём связывания с оператором или сайленсерами. ДНК-связывающий репрессор блокирует прикрепление РНК-полимеразы к промотору, предотвращая таким образом транскрипцию генов в мРНК. РНК-связывающий репрессор связывается с мРНК и предотвращает трансляцию мРНК в белок. Эта блокировка экспрессии генов называется репрессией.

У эукариот гены, не транскрибируемые постоянно, часто находятся в гетерохроматине (участках ДНК, плотно упакованных за счет связывания гистонов и организованных в компактные хроматиновые фибриллы). ДНК в составе гетерохроматина недоступна для многих факторов транскрипции. Для того, чтобы регуляторные белки (транскрипционные факторы) могли связаться с ДНК, гетерохроматин должен быть трансформирован в эухроматин, обычно путём модификаций гистонов. Также для связывания транскрипционных факторов с ДНК важную роль играет свобода хроматина от нуклеосом. Хроматин свободный от нуклеосом называется открытым хроматином и значительно чаще связывает факторы транскрипции, чем связанный с нуклеосомами хроматин. Поэтому у эука-

риот (имеют ядро) важную роль в регуляции транскрипции играет первый - нуклеосомный уровень компактизации ДНК и, в частности, гистоны. Имеется понятие «гистоновый код», которое подразумевает разнообразные модификации (ацетилирование, фосфорилирование, метилирование) «хвостов» гистонов, формирующих ядро нуклеосом. Результатом таких модификаций является изменения экспрессии генов, передающиеся по наследству. Модификации гистонов влияют на характер упаковки хроматиновой фибриллы, разрыхляя или, наоборот, уплотняя ее, что в свою очередь соответственно облегчает или затрудняет доступ к ДНК многочисленным регуляторным факторам и в значительной мере определяет функциональное состояние гена. Гистоновый код служит одним из основных эпигенетических механизмов, контролирующих включение или выключение генов и передачу программы этого контроля по наследству от клетки к клетке. В модификации гистонов принимают участие ряд белков. Белки группы polycomb (*Polycomb-group proteins*, PcG) - это семейство белков, которые способны ремоделировать хроматин. Под ремоделированием хроматина понимают энергозависимый процесс изменения плотности нуклеосом или их взаимного расположению по длине молекулы ДНК, приводящий к инициации транскрипции, связыванию транскрипционных факторов и формированию активного («открытый») или неактивного статуса хроматина.

Белки группы поликомб (PcG) представляют собой семейство эпигенетических регуляторов, которые, модифицируя гистоны, подавляют активность генов, отвечающих за клеточную дифференциацию. У млекопитающих найдены две основные группы, содержащие комплексы белков группы polycomb - это ингибиторные комплексы 1 и 2 (PRC1 и PRC2). Комплекс PRC1 включает до 8 субъединиц, в том числе белки, катализирующие метилирование лизина-9 гистона H3 (*histone-lysine N-methyltransferase*), моноубиквитинирование гистона H2A (*RING1*), что ингибирует экспрессию генов за счет перевода хроматина в компактную форму – гетерохроматин. Комплекс PRC2 также вызывает репрессию транскрипции путём метилирования гистонов и негистоновых белков. Аналогичный эффект возможен при действии деацетилаз гистонов (*histone deacetylases*, HDACs) - ферментов, катализирующих удаление ацетильной группы ε-N-ацетил-лизина гистонов, внесенные ферментами гистонацетилазами (*histone acetylases*, HATs) в остатки лизина-3,14 гистона H3 и лизина-5,8,12,16 гистона H4, а также остатки некоторых лизинов гистонов H2A и H2B. Модифицируя гистоны и изменяя конформацию хроматина, гистондеацетилазы играют важную роль в регуляции экспрессии. В то время как гиперацетилирование гистонов под действием гистонацетилаз обычно связано с повышением транскрипционной активности, гистондеацетилазы вызывают гипоацетилирование и вследствие этого - репрессию генов. Гипоацетилирование приводит к уменьшению промежутка между нуклеосомой и намотанной на неё ДНК. Более плотная упаковка ДНК уменьшает её доступность для транскрипционных

факторов, что приводит к транскрипционной репрессии. АТФ-зависимое ремоделирование хроматина, сопряженное с регуляцией экспрессии генов, осуществляет белок CHD7 (Chromodomain-Helicase-DNA-binding protein 7) известный также как АТФ-зависимая хеликаза CHD7 – фермент, который у человека кодируется геном *CHD7*.

Общим механизмом регуляции экспрессии генов для прокариот и эукариот является действие коактиваторов, корепрессоров и индукторов. Коактиватор – это белок, который увеличивает экспрессию генов путём связывания с активатором (или фактором транскрипции), который содержит ДНК-связывающий домен. Коактиватор стабилизирует холофермент РНК-полимеразы, управляет сплайсингом РНК, может проявлять активность гистонацетилтрансферазы, увеличивая через ацетилирование гистонов доступ к ДНК. Белки СВР и р300 являются примерами коактиваторов с гистонацетилтрансферазной активностью. Один и то же коактиватор, вероятно, может использоваться для усиления транскрипции многих генов, поскольку специфичность связывания с конкретной последовательностью обеспечивает не он сам, а белок-активатор. Коактиваторы могут действовать как «управляющие гены», регулируя основные клеточные и метаболические процессы роста. В организме человека известно от нескольких десятков до нескольких сотен коактиваторов. Корепрессор – вещество, которое ингибирует экспрессию генов. Для прокариот корепрессорами являются низкомолекулярные вещества, тогда как в эукариотах, корепрессорами являются белки. Корепрессоры непосредственно не связывают ДНК, но вместо этого косвенно регулируют экспрессию гена путём связывания с репрессорами и усиливают или модулируют их действие. Корепрессор подавляет (репрессирует) экспрессию генов путём связывания с репрессором, который по сути своей является фактором транскрипции. Репрессор, в свою очередь связывает промотор соответствующего гена и блокирует транскрипцию гена. Индуктор представляет собой молекулу, которая регулирует экспрессию генов. Индуктор может связываться с репрессором или активатором. Индукторы функционируют при отключённых репрессорах. Ген экспрессируется тогда, когда индуктор связывается с репрессором. Связывание индуктора с репрессором предохраняет репрессор от привязки к оперону. После этого РНК-полимераза может начать транскрипцию генов оперона. Индукторы также могут функционировать путём связывания с активаторами. В отсутствие индуктора активаторы, как правило, слабо связываются с ДНК. Индуктор образует комплекс с активатором и активирует целевой ген, запуская его транскрипцию. Удаление индуктора останавливает транскрипцию. Поскольку необходима малая молекула индуктора, повышение экспрессии целевого гена называется индукцией. Оперон лактозы является одним из примеров индуцированной системы.

У млекопитающих в процессе транскрипции часто образуются длинные некодирующие РНК, в том числе и двухспиральные. Фрагменты некодирующих РНК могут играть важную роль в регуляции трансляции.

К молекулам РНК, участвующим в регуляции экспрессии генов на этапе трансляции, относятся несколько типов:

МикроРНК (microRNA, miRNA) - малые некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов участвуют в регуляции экспрессии генов путем РНК-интерференции. МикроРНК кодируются ядерной ДНК растений и животных и вирусной ДНК у некоторых ДНК-содержащих вирусов. В настоящее время известно около 2000 микроРНК человека. Считают, что мишенями микроРНК являются от 30 до 60 % генов человека, кодирующих белки. МикроРНК участвуют в подавлении активности генов: 1) путем комплементарного спаривания с участками мРНК и ингибирования трансляции; 2) посредством быстрой деградации комплексов микроРНК с мРНК; 3) через прямое взаимодействие микроРНК с ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК (например, в области промоторов генов). Интересно, что каждая микроРНК позвоночных может связываться с нуклеотидными последовательностями до 200 транскриптов-мишеней. Причем одна микроРНК может умеренно репрессировать до сотни белков.

Антисмысловые РНК (antisense RNA) - это одноцепочечные РНК, которые комплементарны мРНК, образуемой в клетке. Антисмысловые РНК вводят в клетки для ингибирования трансляции комплементарных мРНК. Этот эффект достигается тем, что антисмысловые РНК стехиометрически спариваются с мРНК-мишенью и физически препятствуют формированию трансляционного комплекса.

Малые интерферирующие РНК, или короткие интерферирующие РНК (*siRNA, small interfering RNA*) - это двухцепочечные РНК, длиной 20-25 пар нуклеотидов (чаще 21 нуклеотид) с двумя неспаренными выступающими 2-3 нуклеотидами (оверхенг в 2-3 нуклеотида) на 3-концах. Каждая из двух цепей РНК имеет фосфатную группу на 5-конце и гидроксильную группу на 3-конце. Малые интерферирующие РНК и микроРНК образуются при «разрезании» длинных двухцепочечных РНК или коротких РНК, содержащих шпильки, рибонуклеазой типа III (фермент Dicer). Этот фермент инициирует образование РНК-индуцируемого комплекса выключения гена, комплекса RISC (*RNA-induced silencing complex*). Каталитическим компонентом комплекса RISC служит белок Аргонавт (*Argonaute*), являющийся эндонуклеазой, разрушающей участки мРНК, комплементарные ведущей цепи малой интерферирующей РНК. Деградация мРНК предотвращает трансляцию мРНК на рибосомах в кодируемый ею белок. Этот тип РНК часто образуются в результате расщепления вирусных РНК.

Малые РНК, образующие шпильки, или *короткие РНК, образующие шпильки (shRNA, small hairpin RNA, short hairpin RNA)* - короткие молекулы РНК, образующие во вторичной структуре плотные шпильки (структуры типа «стебель-петля»). Малые РНК, образующие шпильки, синтезируются с помощью РНК-полимеразы III. Малые интерферирующие и образующие шпильки РНК могут быть искусственно введены в

клетки для нокдауна определённого гена (*Gene knockdown*), т.е. снижения экспрессии одного или нескольких генов. Аналогичный эффект может быть получен посредством участия микроРНК в метилировании нуклеотидов ДНК в области промотора гена.

Малые ядерные РНК (мяРНК, snRNA) непосредственно не участвуют в синтезе белка, но могут оказывать влияние на процессинг РНК, в частности на этапе вырезания неинформационных участков пре-мРНК, регуляции факторов транскрипции и поддержании целостности теломер. Они транскрибируются РНК-полимеразой II или РНК-полимеразой III. Малые ядерные РНК содержат большое количество уридиловых нуклеотидов. Важной группой мяРНК являются малые ядрышковые РНК (snoRNA), участвующие в процессинге рРНК и тРНК и самих мяРНК.

Молекулярные технология исследования экспрессии генов. Основными способами определения экспрессии генов в настоящее время являются секвенирование РНК, содержащих поли-А на 3-конце молекулы (мРНК), а также применение экспрессионных ДНК-микрочипов. Секвенирование РНК позволяет определить не только уровень экспрессии каждого белок-кодирующего гена в геноме, но и различать варианты мРНК, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга.

Первые работы по секвенированию транскриптомов появились в 2008 году. Основные этапы: 1) удаление наибольшей части суммарной РНК клетки (рРНК) селективным методом зондовой гибридизации (остаются матричные и некодирующие РНК); 2) синтез кДНК по матрице РНК с помощью обратной транскрипции; 3) фрагментация кДНК и секвенирование фрагментов кДНК с получением множества коротких прочитанных фрагментов («ридов»); 4) восстановление структуры транскриптов путём сопоставления полученного набора ридов с геном. При секвенировании коротких РНК (например миРНК) производят отбор по длине молекулы (электрофорез, магнитные бусы). Поскольку этап обратной транскрипции дает ошибки и артефакты, разрабатывается технология мономолекулярного прямого секвенирования РНК (*Direct RNA Sequencing, DRSTM*).

Основная проблема секвенирования РНК связана с частым альтернативным сплайсингом у высших эукариот и присутствием в геноме большого числа паралогов - гомологичных генов (продуктов генов), дублированных и эволюционировавших в геноме данного вида. Для ее решения используют картирование на геном отдельных прочитанных фрагментов или восстановление структуры транскрипта заново с последующим картированием полноразмерного транскрипта на геном. Для исследования экспрессии генов в срезах тканей получил распространение метод флуоресцентного секвенирования (FISSEQ). В настоящее время РНК-секвенирование позволяет исследовать однонуклеотидные полиморфизмы в генах по их транскриптам, а также оценивать альтернативный сплайсинг по альтернативным формам транскриптов.

Для практических целей (медицина, онкология) получают все более широкое распространение методы секвенирования нового поколения

(СНП), позволяющие определять нуклеотидные последовательности ДНК и РНК с целью описания их первичных структур. СНП осуществляется с помощью повторяющихся циклов удлинения цепи, катализируемого полимеразы. Технологии СНП базируются на секвенировании ДНК-чипов, циклических ферментативных реакциях (эмульсионная ПЦР) и доступной для понимания визуализации экспрессии генов. В технологии эмульсионной ПЦР используют парамагнитные шарики одинакового размера, покрытые стрептавидином и несущие биотинилированные форвардные праймеры. Стрептавидин обладает очень сильным сродством к биотину, поэтому праймер прочно связан с поверхностью шарика. Водная фаза реакции содержит парамагнитные шарики, смесь компонентов для ПЦР, прямой и обратный праймеры, и библиотеку парных концевых тегов. Водная фаза перемешивается и взбалтывается с масляной фазой для получения эмульсии. В идеальной ситуации каждая капля воды в масляной эмульсии содержит один шарик и одну молекулу матрицы ДНК, что позволяет в миллилитровом объеме проводить миллионы невзаимодействующих реакций ПЦР-амплификации.

Этапы секвенирования: 1) создание библиотеки случайных последовательностей ДНК, которые соединяют с общедоступными адаптерными последовательностями; 2) накопление ДНК с помощью ПЦР (создание ампликонов); 3) определение первичной структуры всех фрагментов ДНК. Одна из технологий включает сочетание метода эмульсионной ПЦР и пиросеквенирования. Накопление (амплификация) ДНК проходит в каплях воды в масляной эмульсии. В каждой капле воды находится одноцепочечная матрица ДНК, связанная с праймером на бусинке. Далее, каждая бусина помещается на чип, представляющий собой оптическое волокно. Туда же помещаются необходимые для секвенирования ферменты: ДНК-полимераза, люцифераза, АТФ-сульфурилаза. В другой технологии SOLiD при секвенировании фрагменты ДНК лигируются на олигонуклеотидные адаптеры, прикрепленные к шарикам, далее они амплифицируются с помощью эмульсионной ПЦР. В методе одномолекулярного секвенирования в реальном времени (SMRT, *Single molecule real time sequencing*) наблюдают за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы. Использование четырех флуоресцентно-меченных нуклеотидов позволяет определить, какой нуклеотид присоединяет ДНК-полимераза в данный момент. В методе нанопорового секвенирования измеряют ток ионов через единичную нанопору в непроводящей мембране. При прохождении через эту пору нуклеотидов ток падает. Время, на которое изменяется ток ионов, и величина этого падения зависят от того, какой нуклеотид в данный момент находится внутри поры.

Редактирование РНК это процесс пост- или ко- транскрипционной модификации рибонуклеотидов в молекуле РНК. В большинстве случаев редактирование РНК приводит к замене аденозина на инозин. Но в процессе трансляции инозин распознаётся как гуанозин, что приводит к возникновению различий между закодированной в геноме информацией и её

реализацией в белке. При компьютерном выравнивании геномной ДНК и соответствующей кДНК, полученной с помощью обратной транскриптазы выявляются отличия в 1-2 процента. Вследствие значительного прогресса в развитии методов массового параллельного секвенирования стало технически возможным проводить расшифровку полного транскриптома исследуемого организма с целью выявления связанных с редактированием РНК событий.

Проект ENCODE и экспрессия генов. Секвенирование РНК является одним из основных методов исследований, проводимых в рамках проектов ENCODE и modENCODE, направленных на создание базы данных элементов генома человека и основных модельных объектов молекулярной биологии. Проект ENCODE (*Энциклопедия элементов ДНК, The Encyclopedia of DNA Elements*) международный исследовательский консорциум, организованный и финансируемый Национальным институтом исследований генома человека (*National Human Genome Research Institute, NHGRI*) в сентябре 2003 года после успешного завершения тринадцатилетней программы «Геном человека». Цель его работы — произвести полный анализ функций элементов генома человека. Считают, что геном человека содержит примерно 20-30 тысяч белок-кодирующих генов (все вместе они составляют экзом), и на их долю приходится всего около 1,5% ДНК генома человека. Экзом – это часть генома, представляющая экзоны, то есть последовательности, которые транскрибируются в мРНК после того, как интроны удаляются в процессе сплайсинга РНК. Таким образом, экзом отличается от транскриптома, включающего в себя всю совокупность транскриптов. Экзом человека содержит приблизительно 180 тысяч экзонов, или 30-40 миллионов пар нуклеотидов. Мутации в экзоте составляют до 85 % от всех мутаций, связанных с болезнями.

В рамках проекта ENCODE планируется определить функцию остальной части генома, большая часть которой традиционно рассматривалась как «мусорная ДНК». Активность и экспрессия белок-кодирующих генов может регулироваться регулоном, т.е. различными элементами ДНК (промотор, регуляторные последовательности, модификации гистонов и др.). Изменения в регуляторных областях ДНК могут нарушать экспрессию генов и инициировать развитие патологических процессов.

Одним из важных результатов проекта явилось положение о том, что некодирующие гены 80% человеческого генома связаны хотя бы с одной биохимической функцией. Большинство этой некодирующей ДНК участвует в регуляции экспрессии кодирующих генов. Кроме того, экспрессия каждого кодирующего гена контролируется множеством регуляторных участков, расположенных как вблизи, так и на большом расстоянии от гена. К 2010 году проектом ENCODE было получено более 1000 полногеномных наборов данных. Взятые вместе эти данные демонстрируют: 1) какие участки ДНК транскрибируются; 2) какие участки ДНК контролируют экспрессию генов; 3) какие участки взаимодействуют с белками. Основ-

ными методами в ENCODE являются ChIP-seq, RNA-seq, поиск ДНКазы-гиперчувствительных областей, и исследование метилирования ДНК.

ChIP-seq – это метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанный на иммунопреципитации хроматина ChIP-seq и высокоэффективном секвенировании ДНК. Метод может быть использован для определения места связывания любого изучаемого белка по всему геному. Основным вариантом использования ChIP-seq является изучение влияния транскрипционных факторов и других ДНК-связывающих белков на фенотип. Типичная методика включает в себя следующие стадии: образование обратимых сшивок между ДНК и взаимодействующими с ней белками; выделение ДНК и расщепление на фрагменты ультразвуком или эндонуклеазами; осаждение специфическими к исследуемому белку антителами, пришитыми к бусинам; разрушение сшивок между белком и ДНК, очистка ДНК. В результате удается специфически выделить те фрагменты ДНК, с которыми был связан исследуемый белок. Дезоксирибонуклеаза I (ДНКазы I) - эндонуклеаза, кодируемая геном *DNASE1* в геноме человека, катализирует разрыв фосфодиэфирной связи вблизи пиримидиновых нуклеотидов ДНК, образуя при этом полинуклеотиды с концевым-5-фосфатом и свободной гидроксильной группой на 3-конце. Обычно расщепление идет до тетрануклеотидов. Субстратами ДНКазы I являются одноцепочечная ДНК и двуцепочечная ДНК. Современное полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq) основано на прямом секвенировании фрагментов кДНК. Метилирование ДНК - это модификация молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности ДНК, что можно рассматривать как часть эпигенетической составляющей генома. Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца. Метилированный цитозин может затем ферментативно деметилироваться. При некоторых опухолевых заболеваниях обнаруживается начальное аномальное гипометилирование ДНК с последующим гиперметилированием CpG-островков в промоторных областях генов, что приводит к устойчивой репрессии транскрипции. Репрессия транскрипции в этом случае опосредована белками, которые способны связываться с метилированными CpG-динуклеотидами. Эти белки, называемые метилцитозин-связывающими белками, действуют синхронно с деацетилазой гистонов (HDAC) и другими факторами, участвующими в ремоделировании хроматина. Сформировавшийся комплекс может модифицировать гистоны, формируя конденсированную транскрипционно неактивную структуру гетерохроматина.

Вывод проекта о том, что основная часть генома «функциональна» было раскритиковано, поскольку в проекте ENCODE принимают, что любые продукты транскрипции ДНК имеют определенную функцию. Такое заключение было высказано, несмотря на общепринятую точку зрения, что множество элементов ДНК, которые транскрибируются, например, псевдогены не являются функциональными. В ответ на эту критику было

высказано мнение, что транскрибирование большей части генома и альтернативный сплайсинг, которые наблюдаются у человека, являются более точным индикатором генетической функции, чем консервативность последовательности. Кроме того, большая часть «мусорной ДНК» участвует в эпигенетической регуляции.

По аналогии с проектом ENCODE был также начат проект картирования функциональных элементов генома модельных объектов – *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans: Model Organism Encyclopedia Of DNA Elements (modENCODE)*. Проект охватывает исследование следующих областей: генная структура; профайлинг экспрессии мРНК и яРНК (профайлинг происходит от английского «profile», что в переводе означает профиль, а точнее профилирование); участки связывания транскрипционных факторов; структура хроматина; инициация и длительность репликации ДНК; анализ количества копий.

Известно, что у диплоидных организмов каждый аутосомный ген представлен двумя копиями, аллелями, полученными от материнского и отцовского организмов в результате оплодотворения. Обычно экспрессия идёт с обеих аллелей одновременно. Однако у млекопитающих 1-5% генов импринтированы, то есть экспрессируется только один аллель. Как правило, этот эффект зависит от пола родительского организма, предоставившего аллель. Например, для гена *IGF2* (инсулиноподобного фактора роста) экспрессируется только аллель, наследуемый от отца. Наследование признаков, определяемых импринтируемыми генами, происходит не по законам Менделя. Импринтинг осуществляется посредством метилирования азотистых оснований ДНК в промоторных зонах, в результате чего транскрипция гена блокируется. Обычно импринтируемые гены образуют кластеры в геноме.

Экспрессия генов и протеом. Подсчитано, что альтернативный сплайсинг характерен не менее чем для половины генов человека. Полагают, что в среднем с одного гена человека за счет альтернативного сплайсинга может образовываться три разных пептида. Но некоторые гены имеют до 10 альтернативно сплайсируемых экзонов, что позволяет теоретически получать более 1000 различных вариантов белков всего лишь на одном гене. В реальности число разных белков, кодируемых одним геном, достигает 10. Поэтому оценка экспрессии генов по функциональному продукту-белку, т.е. по протеому, может оказаться более сложной задачей по сравнению с оценкой транскриптома. Высокая сложность протеома - полного набора функциональных белков в клетке, обеспечивается не просто за счет крупного размера генома или большого числа генов, а благодаря разнообразным механизмам, связанным с функционированием генов и формированием белков: большее число доменов-модулей, более высокая комбинаторика (перемешивание) этих модулей в белках, активное использование альтернативного сплайсинга, посттрансляционная модификация белков и др. В рамках данной статьи наиболее адекватным определением протеома может быть - совокупность экспрессирован-

ных белков в анализируемом типе клеток или в организме, в определенный период времени при известных условиях. Протеом намного больше и сложнее генома. Так, Р. Поллак писал «гены - это линейный текст, а белки - трехмерная скульптура», а академик Л. Л. Киселев подчеркивал «протеом - понятие динамическое, а геном, напротив, статическое». Пять лет назад академик А.И. Арчаков предположил, что 26 тысячам генов может соответствовать до 2 миллионов белков. И тогда же он сообщил, что его сотрудники способны обнаружить 1 молекулу белка в 1 мкл жидкости. Согласно программе кафедры биохимии БГУ преподаются следующие методы анализа протеома: 1) электрофоретические методы (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; изоэлектрическое фокусирование; двумерный электрофорез, сочетающий разделение белков по молекулярной массе и по изоэлектрической точке; иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг), сочетающий одномерный или двумерный электрофорез с идентификацией белков с помощью антител); 2) хроматографические методы (гель-хроматография, применяемая для разделения белков и пептидов по заряду, молекулярной массе, степени гидрофобности и другим признакам; аффинная хроматография, основанная на специфическом взаимодействии белка с носителем); 3) масс-спектрометрические методы (масс-спектрометрия, позволяющая с высокой чувствительностью проводить идентификацию отдельных белков в их смеси); 4) методы анализа белковой структуры (инфракрасная спектроскопия, применяемая для исследования структурных характеристик белков; рентгеновская кристаллография и ядерно-магнитный резонанс, применяемые для характеристики трехмерной структуры пептидов и белков); 5) методы анализа белок-белковых взаимодействий (дрожжевая двугибридная система, белковые микрочипы и другие); 6) Развитие биоинформационных технологий обработки данных протеомных экспериментов (исследования *in silico* – компьютерное моделирование). В «рутинной» практике для анализа протеома обычно используют два основных подхода: 1) комбинация двумерного электрофореза с MALDI-TOF (ионизация лазерной десорбцией матрицы) в сочетании с масс-спектрометрическим анализом (времени полета ионов белка); варианты - масс-спектрометрия-ESI, получение ионов белка из растворов и масс-спектрометрия-SELDI, ионизация лазерным импульсом белка, сорбированного на различных поверхностях; 2) сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемной масс-спектрометрией. Расшифровка протеома, кодируемого генами 18 хромосомы, в ИБМХ (г. Москва) была осуществлена с помощью атомно-силовых микроскопических технологий: комбинация зондовой микроскопии с различными вариантами спектроскопии: масс-, терагерцевой, инфракрасной, люминесцентной, спектроскопией комбинационного рассеяния.

Факторы транскрипции (транскрипционные факторы) являются белками, контролирующими процесс транскрипции путём связывания со специфичными участками ДНК. Транскрипционные факторы обеспечи-

вают снижение (репрессоры) или повышение (активаторы) константы связывания РНК-полимеразы с регуляторными последовательностями гена, подлежащего регуляции. Для факторов транскрипции характерно наличие одного или более ДНК-связывающих доменов, которые взаимодействуют с участками ДНК, расположенными в регуляторных областях генов. Другие регуляторные белки (ферменты, гистоны) не имеют ДНК-связывающих доменов. Поэтому существует строгое определение, согласно которому транскрипционный фактор - это белок, который после его перемещения в ядро клетки регулирует транскрипцию, специфически взаимодействуя с ДНК, либо стехиометрически взаимодействуя с другим белком, который может образовывать специфичный к последовательности ДНК комплекс «белок-ДНК». В рамках такого определения белки теплового шока HSP90, удерживающие транскрипционные факторы в цитозоле, не являются транскрипционными факторами. Транскрипционные факторы содержат домены трех типов: 1) ДНК-связывающий домен (DBD) взаимодействует со специфичными последовательностями ДНК в области промоторов и энхансеров; 2) трансактивирующий домен (TAD) — содержит участки связывания других белков, например, транскрипционных корегуляторов; 3) сигналраспознающий домен (SSD) (например, лиганд-связывающий домен), который чувствителен к внешним сигналам и отвечающим за передачу сигнала к другим компонентам транскрипционного комплекса, что вызывает повышение или понижение уровня экспрессии. По типу связывания белка с ДНК выделяют целый ряд ДНК-связывающих доменов: спираль-петля-спираль (helix-loop-helix), лейциновая молния, спираль-поворот-спираль (helix-turn-helix), гомеодоменные белки - связывают гомеобокс (особый участок ДНК), цинковые пальцы, Zn_2/Cys_8 цинковые пальцы ядерных рецепторов гормонов и др. У эукариотических организмов процессы транскрипции и трансляции пространственно разделены — они происходят в ядре и цитозоле, соответственно. После синтеза транскрипционные факторы должны проникнуть в ядро, преодолев двойную мембрану. Многие белки, функционирующие в ядре, имеют адрес ядерной локализации - специфичный участок полипептидной цепи, адресующий белок в ядро. Для многих транскрипционных факторов транслокация является ключевым фактором в регуляции их активности. Фоновая транскрипционная активность обеспечивается набором транскрипционных факторов, общим для всех генов. Важный класс эукариотических факторов транскрипции - GTFs (*general transcription factors*). Многие из его представителей не связывают ДНК непосредственно, а входят в состав комплекса инициации транскрипции (преиницирующего комплекса), который напрямую взаимодействует с РНК-полимеразой. Наиболее распространенными GTF являются TFPA, TFPB, TFPD, которые связываются с промотором в области ТАТА-бокса. Помимо транскрипционных факторов, необходимых для экспрессии всех генов, существуют также специфичные факторы транскрипции, обеспечивающие включение/выключение определенных генов в нужный момент.

В геноме чалавека обнаружено более 2600 белков, имеющих ДНК-связывающий домен, и большинство из них предположительно являются факторами транскрипции. Следовательно, около 10 % всех генов в геноме кодируют транскрипционные факторы, и они являются самым большим семейством белков чалавека.

Заклучение. В развитии технологий изучения экспрессии генов во второй половине XX века и начале текущего века условно можно выделить три периода: 1951-1970 гг.: рентгеноструктурный анализ белков и ДНК, первичная структура белка, жидкостный сцинтилляционный анализ радиоактивности, ультрацентрифугирование макромолекул, гибридизация нуклеиновых кислот, электрофорез в полиакриламидном геле, хроматографические методы анализа, исследование кинетики ферментов; 1971-1990 гг.: рестриционный анализ ДНК, клонирование генов, двумерный гелевый электрофорез, Саузерн-блот анализ, моноклональные антитела и иммуноферментный анализ, секвенирование белка и нуклеиновых кислот, сайт-специфический мутагенез, автоматизированный синтез олигонуклеотидов (зонды, праймеры), полимеразная цепная реакция, трансгенные растения и животные, электрофорез в пульсирующем электрическом поле, сканирующая туннельная микроскопия; 1991-настоящее время: проекты «Геном чалавека», «1000 геномов», «ENCODE» и др., атомно-силовая микроскопия, выключение генов, динамика одиночных молекул, анализ генов с помощью микрочипов, анализ протеома с помощью масс-спектрометрии, новые технологии секвенирования, плюрипотентные клетки, иммунопреципитационные технологии секвенирования хроматина, ЯМР *in vivo* и др.

Анализ отобранных учебников и учебных пособий показал, что обмен информацией между молекулярной биологией и биохимией недостаточен при изложении вопросов экспрессии генов, хотя последние десятилетия характеризовались привлечением к реализации прорывных научных проектов специалистов различных специальностей и отраслей науки [1-15]. Особенно это касается большого разрыва между практической подготовкой специалистов биохимиков и бурным ростом технологий исследования генома и протеома. Достаточно вспомнить, что за время обучения в школе нынешних студентов время определения генома чалавека сократилось с 13 лет до одного месяца, а стоимость такого анализа упала с 6 миллиардов долларов до 1000 долларов. Поэтому на повестке дня остается актуальным вечный вопрос: как оптимизировать фундаментальную и практическую подготовку студентов при изучении биохимии в условиях стремительного прогресса технологий изучения биологии и химии живого?

Список литературы

1. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия: Учебник / Под ред. акад. АМН СССР С. С. Дебова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1990. – 528 с.
2. Биохимия: Учебник / Под ред. Е. С. Северина. – М.: ГЕОТАР-МЕД, 2003. – 784 с.
3. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. – М.: Высшая школа, 1998. – 479 с.
4. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.

5. Комов В. П., Шведова В. Н. Биохимия. – М. : Дрофа, 2004. – 638 с.
6. Ленинджер А. Основы биохимии. В трех томах. М. : Мир, 1985. – 1150 с.
7. Таганович А. Д., Олецкий Э. И., Коневалова Н. Ю., Лелевич В. В. Биологическая химия: Учебник. – Минск: Вышэйшая школа, 2016. – 671 с.
8. Филиппович Ю. Б. Основы биохимии. – М. : «Агар», 1999. – 512 с.
9. Чиркин А. А., Данченко Е. О. Биохимия: Учебное руководство. – М. : Мед. лит., 2010. – 624 с.
10. Applng D. R., Anthony-Cahill S. J., Mathews C. K. Biochemistry. Concepts and connections. Pearson, 2015 – 912 p.
11. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. Biochemistry. N-Y: W. H. Freeman and Company, 2002. – 1514 p.
12. Champe P. C., Harvey R. A., Ferrier D. R. Biochemistry. – Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005. – 534 p.
13. Ganten D., Ruckpaul K. Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine. Vol. 1-2. – Berlin: Springer-Verlag, 2006. – 4180 p.
14. Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J., Rodwell V. W. Weil P. A. Harper's Illustrated Biochemistry, 28th Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2009. – 693 p.
15. Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger principles of biochemistry. – New York: Worth Publishers, 2000. – 1152 p.
16. Voet D., Voet J. G. Biochemistry – New York: John Wiley and Sons. Inc., 1995. – 1360 p.

А. Г. Чуйко, Т. А. Кукулянская

Белорусский государственный университет, Минск

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ НА ПЕРОКСИДАЗНОЕ И ПСЕВДОПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕНЗИДИНА

Окисление чужеродных веществ, поступающих в организм, часто сопровождается образованием радикальных продуктов реакции, которые и определяют токсическое действие метаболитов. Наиболее эффективным средством защиты организма от патологического действия активных форм кислорода (АФК) и других радикальных продуктов являются антиоксидантные вещества фенольной природы, к которым относятся и флавоноиды [1, 2]. Флавоноиды имеют в своей основе С6С3С6-скелет и отличаются между собой по степени окисленности пропановой цепочки, связывающей оба ароматических кольца. Биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Наряду с антиоксидантным действием, проявляющимся в способности захватывать активные формы кислорода и ингибировать ферменты, участвующие в генерации АФК, флавоноиды могут проявлять прооксидантную активность. [3, 4, 5]. Образующиеся при этом реакционно-способные радикалы и перекиси, взаимодействуя с эндогенными органическими молекулами, способствуют их аутоокислению, которое в организме чаще принимает форму перекисного окисления. Целью нашей работы было исследование влияния различных концентраций флавонона, флавонона и 3-гидроксифлавонона на окисление бензидина (БД) пероксидом водорода, в присутствии пероксидазы хрена и гемопротеинов, обладающих псевдопероксидазной активностью (гемоглобин, цитохром *c*).

Материалы и методы. Окисление БД проводили в 0,1 моль/л цитратно-ацетатном буфере (рН 5,5), $[H_2O_2]=0,4$ ммоль/л, [Пероксидазу хрена]= 10^{-11} моль/л, [БД] от 0,1 ммоль/л до 1 ммоль/л. В системах псевдопе-