**Маленькие да удаленькие**

Игорь ЛАЛАЯНЦ, кандидат биологических наук

Изучение микроРНК может открыть новую страницу в медицине

Совсем недавно увидели свет две книги - биография Ф.Крика, сооткрывателя двойной спирали ДНК, и «Жизнь от РНК-мира: предок внутри» - о возникновении жизни, в начале которой стояла РНК. Во второй книге на современном уровне излагается в общем-то старая идея о том, что вначале была РНК, а отнюдь не ДНК. Ф.Крик был первым, кто постулировал центральную догму молекулярной биологии: ДНК - РНК - белок (имелась в виду иРНК, в открытии которой они принимали самое деятельное участие). Догма претерпела судьбу мириадов других. К чести Крика он спокойно признал в 1970 г. крушение своего идеала, когда у вирусов был открыт фермент обратная транскриптаза (ОТ, или ревертаза). К сожалению, он не дожил до открытия РНК-интерференции, осуществляемой короткими молекулами РНК длиной не более 23-24 нуклеотидов. Именно этот древнейший механизм регуляции активности генов явился очередным доказательством реальности существования некогда РНК-мира, который намного старше привычного нам ДНК-ового...

**Вирус и иммунитет: кто кого?**

Говоря о «внежизненных» формах носителей генетической информации, имеют в виду прежде всего вирусы, которые возникли еще в первичном РНК-мире. РНК - «младшая сестра» ДНК - в силу квантово-физических ограничений не может быть длинной, поскольку при достижении определенного лимита длины цепочки попросту ломается. Для ее защиты вирусы «придумали» белковые оболочки самых разнообразных форм, богатство которых поражает воображение. Но вирус потому и нежизненная форма, что не имеет собственного обмена, а для репликации должен проникнуть в клеточное ядро, в котором имеются не только ферменты синтеза нуклеиновых кислот, но также и запас тех самых нуклеотидов, из которых строятся последние. Вирус не может беспрепятственно проникнуть в клетку через ее мембрану. Он, прежде всего, должен связаться с особыми белковыми молекулами - рецепторами. После этого начинается процесс эндоцитоза, или втягивания молекулярного комплекса в цитоплазму. В эндоцитной капсуле ферменты начинают буквальным образом «раздевать» вирус, постепенно высвобождая его нуклеиновокислотный геном. Только нуклеиновая кислота с небольшим количеством ферментного белка может проникнуть в цитоплазму клетки. У ВИЧ энзимный груз представлен сложным энзимным комплексом ро1, выполняющим как минимум три функции. Этот протеин синтезирует ДНК-копию на матрице РНК, то есть осуществляет «обратный» синтез, затем перемещает ДНК в ядро, где встраивает ее в клеточный геном (ДНК-копия ВИЧ может находиться в лимфоците в покоящемся состоянии на протяжении нескольких лет, а вируса гепатита - и десятков лет; то же справедливо и в отношении вируса гриппа).

Иммунная противовирусная защита, как известно, включается довольно поздно, в результате чего, например, мы каждые весну и осень переболеваем новой формой гриппа. Дело в том, что при всей своей высокой специфичности иммунные Т-лимфоциты включают клеточный и антительный ответ лишь после «ознакомления» Т-хелперов с вирусными антигенами, представляемыми им мечниковскими макрофагами (и так называемыми дендритными клетками, о фагоцитной роли которых еще не так давно не подозревали). Макрофаги же дают неспецифический иммунный ответ, то есть они реагируют на вирусные белки как на всякое чужеродное вещество. Вирусы для осуществления своего «жизненного» цикла вынуждены встраивать в клеточную мембрану свои белки, на которые и реагируют макрофаги. Специфичность вирусных антигенов «оценивают» лишь Т-хелперы, а действующим клеточным началом иммунной системы являются В-лимфоциты, синтезирующие протеиновые антитела, и клетки, получившие название «натуральные киллеры» (NK - Natural Killers) - эдакие прирожденные убийцы, которые убивают клетки, инфицированные вирусами (в процессе принимают также участие и цитотоксические лимфоциты CTL). О столь радикальном решении проблемы свидетельствует мокрота с миллиардами погибших клеток слизистой дыхательных путей, которая отделяется при кашле при том же гриппе. На выработку специфического иммунного ответа уходит примерно 2 недели, в течение которых человек испытывает дискомфорт и недомогание. Иммунитет к данному вирусу сохраняется в течение десятилетий, и считается, что носителями иммунной памяти являются упомянутые клетки. С гриппом вся проблема заключается в том, что геномы его вирусов мутируют каждые полгода, поэтому «старая» защита оказывается неэффективной. Столь быстрые изменения в геноме РНК-овых вирусов связаны как раз с одноцепочностью их носителя ген-информации. Ферменту РНК-полимеразе очень трудно сохранить пространственную стабильность, связываясь лишь с одной цепью, в результате чего при копировании вместо «нужных» нуклеотидов включаются совсем иные, тем самым определяя высокую мутабельность РНК-овых геномов. Достаточно сказать, что частота мутаций генома ВИЧ как минимум в 1000 раз превышает скорость мутирования определенных участков иммунных генов в Т-лимфоцитах, в результате чего те в большинстве случаев проигрывают вирусу и в конечном итоге погибают, следствием чего является развитие иммунодефицита...

**Старение как защита от рака**

Внедрение вируса - лишь один весьма демонстративный пример необходимости клеточной защиты против внешних вызовов. Другим примером сугубо клеточных «забот», связанных с повторяющейся необходимостью «перезагрузки» геномных программ, является развитие организма, в ходе которого плод обходится без необходимости дышать атмосферным кислородом. В частности, первой функцию кроветворения берет на себя эмбриональная печень, синтезирующая очень важный альфа-фетопротеин (от fetus - плод). Для «изымания» кислорода, растворенного в материнской крови, эритроциты плода несут фето-гемоглобин (НЬ F - от fetus, плод), квантовые свойства иона железа в котором отличаются большим сродством к кислороду. После рождения ребенка экспрессия генов обоих указанных белков выключается, подвергаясь замалчиванию, или сайленсингу (англ. silence - тишина, молчание). Но это вовсе не значит, что они выкидываются из клеточного генома. При раке они в результате общего геномного дисбаланса вновь могут работать. В известный период развития организмов начинает работать огромное количество генов, в результате чего включается функция половых желез и появляются вторичные признаки. Во второй половине жизни гены, отвечающие, в частности, за деление клеток, постепенно «отключаются», чтобы не допустить опухолевой трансформации, что достигается у трех четвертей согласно закону Менделя. Отсюда такой важный биологический процесс старения можно рассматривать как защиту от рака. Долгие десятилетия ученые не могли понять природы сайленсинга, строя на этот счет самые фантастические предположения.

В связи с этим можно вспомнить начало 50-х, когда изучение ДНК шло буквально «на коленке». Это сегодня разрешение рентгеноструктурного анализа благодаря бурному развитию компьютерной техники достигло чуть ли не одного ангстрема (диаметра атома водорода)! Розалинд Франклин получила некие туманные размытые картинки некоего ДНК-ового «креста» и ничего не знала о комплементарности пар азотистых оснований. Неудачник Ф.Крик пытался как-то применить законы любимой физики к биологии ДНК, не забивая себе голову тем, что она может быть носителем генетической информации. Лишь юным американцем Дж.Уотсоном владела одна, но пламенная страсть - доказать, что это именно так! Он привез в Кембридж с другого берега Атлантики результаты «фаговой школы» М.Дельбрюка и С.Луриа и американского микробиолога О.Эйвери, говорившие о том, что по крайней мере у пневмококков, вызывающих пневмонию, и у бактериофагов роль носителя наследственной информации исполняет ДНК.

Однажды туманным утром Ф.Крик ворвался в кембриджский паб «Орел» ^gle) со словами "Мы разгадали тайну жизни»! Примерно через месяц в апрельском номере журнала Nature появилось их совместное с Дж.Уотсоном письмо редактору, в котором было всего 900 слов. Ученые писали, что ДНК, по всей видимости, представляет собой двуцепочную спираль, рисунок которой сделала Одиль, жена Крика, занимавшаяся дизайном букетов. В письме указывалось, что двуцепочность возможного носителя генетической информации хорошо объясняет принцип самовоспроизведения всего живого на Земле. Эта идея была затем более детально проиллюстрирована в учебнике Дж.Уотсона по молекулярной биологии гена: на картинке были представлены две расходящиеся нити ДНК, на которых идет одновременный синтез новых цепей. А ведь к моменту выхода книги в свет уже было доказано, что синтез вещества генов полуконсервативный, то есть синтезируется сначала лишь одна цепь, а затем уже другая в обратном направлении, поскольку фермент ДНК-полимераза может «читать» последовательность только в одном направлении. Иллюстрация подчеркивала принцип самовоспроизведения живого, но забыла о наследственности Дарвина, постулировавшего сохранность видов, эволюционирующих крайне медленно. Когда пытливые умы пытались упрекнуть Уотсона в том, что его схема воспроизведения (репликации) ДНК неверна, тот с усмешкой отвечал, что ошибки - суть истории.

**«Народ безмолвствует»**

Но вернемся к сайленсингу генов и регуляции их активности. В хромосомах ядра клетки имеются многочисленные некодирующие участки, которые не отвечают за синтез белков. С этих последовательностей ДНК малой протяженности синтезируются короткие РНК, образующие двуцепочные структуры. Рентгеноструктурный анализ с разрешением менее 3 ангстрем позволил увидеть, что эти пре-микроРНК (miR) образуют комплекс с ядерным белком и ферментом, расщепляющим энергоноситель типа АТФ. Естественно, что белок, осуществляющий «экспорт» miR через поры ядерной оболочки, получил название экспортин. Для защиты коротких РНК в протеиновой молекуле имеется туннель, надежно укрывающий молекулу от «переваривания» ферментами РНКазами. Попав в цитоплазму, miR подвергаются действию РНК-азы - фермента, расщепляющего РНК, - получившей название «Дайсер» (Dicer - дословно «формователь»), действие которого аналогично действиям, произведенным папой Карло над поленом, из которого он вырезал симпатичного Буратино. Формообразование сырой заготовки miR необходимо для ее связывания с протеином «Аргонавт» ^go), на котором короткая РНК "вплывает» в РИСК (RISC - RNA-Induced Silencing Complex). Последний представляет собой большой протеиновый комплекс сайленсинга активности генов, функция которого включается РНК. Центральная роль Аргонавта в этом комплексе заключается в том, что именно этот протеин связывает воедино специфическую информационную РНК - копию данного гена-мишени - и распознающей ее miR. Сведение всех компонентов древней внутриклеточной защитной системы приводит к тому, что иРНК подвергаются ферментативному расщеплению и команды гена не доходят до рибосом. Функция гена таким образом «замалчивается», при этом сам ген из генома не элиминируется. Знаменитая ремарка Пушкина «Народ безмолвствует» наилучшим образом иллюстрирует суть работы коротких РНК, поскольку люди на самом деле голос не потеряли.

Сейчас это удивительное свойство нового класса РНК активно используется учеными в их исследованиях. Приведу содержание нескольких самых последних сообщений. Недавно стало известно, что процесс самообновления эмбриональных стволовых клеток регулируется «противоборствующими» семействами miR. Одни из них поддерживают деление клеток, а другие его приостанавливают, чтобы начался процесс дифференцировки специализированных клеток печени, мышц и т.д. МикроРНК помогают осуществлять скрининг генов-мишеней, в частности тех, белки которых необходимы для. заражения вирусом гриппа и его размножения в клетках (таких генов ни много ни мало почти три сотни!). В ходе подобных исследований открыта необычная роль и многочисленных участков ДНК, отвечающих за синтез рибосомальных РНК, о которых вроде было известно буквально всё. Утеря даже некоторых из них в эксперименте ведет к повышению чувствительности вещества жизни к ДНК-повреждающим агентам - ультрафиолету, рентгеновским лучам и перекиси водорода. Эти ДНК-овые сайты очень важны для взаимодействия хроматид отцовской и материнской хромосом при мейозе. Известно, что при перекресте происходят разрывы обеих цепей ДНК, после чего их необходимо восстанавливать.

Напоследок упомянем еще один класс РНК, а именно теломерные.

Теломера, что следует из ее греческого названия, представляет собой концевой участок хромосом (каждая из них имеет, следовательно, две теломеры). О роли теломер в поддержании целостности хромосом необходимо рассказывать особо, тем более что за ее открытие недавно вручили Нобелевскую премию. Длина одноцепочной теломерной ДНК укорачивается с каждым клеточным делением, и достижение критического лимита включает механизм апоптоза. Таким образом, теломеры представляют собой великолепные молекулярные часы, отсчитывающие продолжительность клеточной жизни. Естественно, что в раковых клетках теломеры при делении не укорачиваются, восстанавливаясь до эмбриональной длины. При одной из форм рака белой крови (СМL, или хроническая миелоидная лейкемия) на пике обострения обнаруживается снижение уровня коротких РНК, который довольно высок при хронической стадии болезни. Ген коротких РНК, введенный в опухолевые клетки, которые пересаживают мышам, «переводят» болезнь в хроническую стадию, чего не наблюдается без этого гена. Можно только добавить, что РНК регулирует активность клеточного фермента, «родственник» которого контролирует синтез белков в дендритах - древовидных отростках нервных клеток. Ведь у белых клеток крови тоже есть отростки, с помощью которых они сражаются с «врагами» организма. Раковым же клеткам отростки нужны для миграции и распространения...

Примерно такая же картина видна при выключении гена let (от лат. lethum - смерть), короткие РНК которого подавляют гены, ответственные за самообновление клеток и поддержание их в стволовом состоянии. Отсюда понятно, что в эмбриональных стволовых клетках, как и в раковых, активность let подавлена. Но короткие РНК проявляют себя и в других областях. Известно, что концевой кусок женской Х-хромосомы может отрываться, что приводит к умственной отсталости.

Сегодня мы бьемся над глобальной проблемой эволюции молекулярных процессов, лежащих в основе всего живого. И если раньше все были озадачены построением эволюционных древ с их отдельными ветвями и веточками, то мы пытаемся понять принципы интегративности всего живого, которое буквально нанизано на древнейшую молекулу, о некоторых свойствах которой мы до самого последнего времени и не подозревали. Это в общем-то понятно, поскольку науку делают люди, которым свойственно ошибаться и искать. Работая там, где светло, они открывают не то, что существует в живой природе, а то, что позволяет современный им уровень технологического развития. Когда-то нуклеиновые кислоты выделяли из гноя, дрожжей и тимуса. И никто не мог себе даже представить, что будет создана новая геномная индустрия, активно приближающая нас к моменту, когда геном человека будет прочитываться всего лишь за день! А сравнительный скрининг геномов будет осуществляться, в частности, и с помощью коротких микроРНК.

По материалам Nature, Science.

**Список литературы**

Медицинская газета № 74 29.9. 2010