ЛЕКЦИЯ

ПРОЦЕССИНГ РНК

##### Процессинг РНК у эукариот

Итак у эукариотов первоначальный «транскрипт» с ДНК значительно больше, чем зрелая РНК. Наряду со «значащими» участниками рибонуклеотидной последовательности транскрипта, так называемыми «экзонами», которые войдут в готовую молекулу РНК, в нем имеются и лишние, «молчащие» участки — «интроны», подлежащие удалению (прозрачка 18). Заметим, что у эукариотов соотношение интроны/экзоны (по длине) равно 9:1. Для прокариотов —соотношение обратное, 1:9.

Все интроны транскрибируются в составе РНК-предшественника и впоследствии удаляются в процессе разрыва-воссоединения – сплайсинга. Сплайсинг происходит еще в ядре, перед выходом РНК в цитоплазму. При этом должна быть сохранена (или установлена) правильная рамка считывания. Явление сплайсинга у эукариотов не позволяет по аминокислотной последовательности белка восстановить последовательность нуклеотидов в кодирующем его участке ДНК. У прокариотов, к счастью, явление сплайсинга наблюдается редко, и соответствие последовательностей РНК и ДНК, как правило, сохраняется.

Выделяют четыре вида интронов, и, соответственно, четыре механизма сплайсинга

Виды интронов

1. Интроны генов ядерных мРНК.

Первыми были обнаружены интроны в ядерных генах, кодирующих белки. Их размер варьирует от 100 п.н. до 10 т.п.н. и более. Наиболее характерной отличительной чертой всех этих интронов является наличие специфических последовательностей вблизи их 5`- (левой, или донорной) и 3`-(правой, или акцепторной) концов (т.е. на стыках интронов и экзонов или в сайтах сплайсинга).

Нуклеотидные последовательности в местах соединения экзонов и интронов весьма консервативны и практически одинаковы во всех генах ядерных мРНК почти у всех изученных видов (прозрачка 20). 5`-сайт сплайсинга чаще всего фланкирует последовательность ЦRГ (где R - пурин), а 3`-сайт – всего один остаток Г. тем не менее последовательности фланкирующие интроны извне могут значительно варьировать, а мутации в них никогда не предотвращают сплайсинг, хотя и могут влиять на его скорость. Первыми двумя нуклеотидами на 5`-конце интрона в РНК почти всегда являются ГУ (исключение, ГЦ, встречается всего в двух случаях); следующие четыре нуклеотида могут немного варьировать, но, по-видимому, канонической является последовательность АГАГУ. Замена остатка Г или У в месте сочленения обычно блокирует сплайсинг, а замена соседних оснований влияет на сплайсинг по-разному. Указанные шесть нуклеотидов на 5`-конце интрона и определяют специфическую функцию 5`-сайта сплайсинга. На 3`-конце интрона всегда находится пара АГ. Мутации, приводящие к замене константных А и Г на другие основания, также блокируют сплайсинг в этом сайте.

Остаток А вблизи 3`-конца интрона играет важную роль в сплайсинге ядерных промРНК. В интронах млекопитающих этот остаток не находится в фиксированном положении или в какой либо определенной последовательности, поскольку его роль вероятно, может играть любой из нескольких остатков А, расположенных на участке от 18 до 37 нуклеотида перед 3`-сайтом сплайсинга. Однако мутации, которые затрагивают соседствующие с указанным остатком А последовательности, приводят к существенному уменьшению эффективности сплайсинга in vitro; следовательно, хотя этот остаток и не принадлежит какой-то определенной последовательности его окружение влияеть на сплайсинг.

В интронах могут содержаться разные генетические элементы, например энхансеры, другие гены, возможно, сигналы репликации и упаковки хромосомы или последовательности, необходимые для упаковки промРНК в рибонуклеотидные частицы.

Сплайсинг ядерной про мРНК.

Сплайсинг ядерной про мРНК осуществляется в ядре, возможно, одновременно с транскрипцией для одних генов, и лишь после завершения транскрипции для других.

Цис-сплайсинг. Первым этапом сплайсинга является сборка комплекса сплайсинга. Самые ранние продукты, обнаруживаемые в процессе сплайсинга in vitro образуются в результате точного расщепления в 5`-сайте сплайсинга один из них содержит 5`-экзон, а другой – интрон и 3`-экзон (прозрачка 22). Расщепление в 5`-сайте должно предшествовать расщеплению в 3`-сайте. В ходе реакции накапливаются два продукта: правильно лигированные экзоны и свободный целый интрон. Как продукт начального расщепления, так и вырезанный интрон содержат структуры типа лассо.

Вырезанию интрона в форме лассо и лигированию двух экзонов для сплайсинга ядерных про мРНК требуется множество ядерных факторов-белков и рибонуклеопротеидных комплексов (мяРНП). Комплекс, состоящий из множества субъединиц, который катализирует сплайсинг, называют сплайсингосомой. Сплайсингосома состоит из интрона, связанного по меньшей мере с пятью разными мяРНП и некоторыми вспомогательными белками, обычно не связанными с этими мяРНП. Сплайсингосомы образуются путем спаривания молекул РНК, присоединения белков к РНК и связывания этих белков друг с другом (прозрачка 23). Конечный результат сплайсинга в случае про мРНК: интрон вырезается, а фланкирующих его экзона соединяются.

Транс-сплайсинг. До сих пор, говоря о сплайсинге, мы рассматривали внутримолекулярные, или цис-реакции. А существует ли межмолекулярный или транс-сплайсинг? Иными словами, может ли происходить легирование двух экзонов, находящихся в разных молекулах РНК, с одновременным удалением фланкирующих их интронов? Транс-сплайсинг является важным этапом внутриклеточного образования всех мРНК у Tripanosoma (прозрачка 25). Кроме того, возможность межмолекулярного сплайсинга продемонстрирована в опытах in vitro (прозрачка 24).

1. Интроны в генах тРНК. Размер интронов в генах тРНК колеблется от 14 до примерно 60 нуклеотидов, но они локализуются всегда в одном и том же месте: через один нуклеотид от 3`-конца антикодона (прозрачка 26). Как правило, если ген данной тРНК имеет интрон, то все другие гены в пределах вида кодирующие эту тРНК тоже содержат такой же интрон. Однако у генов, кодирующих разные тРНК внутренний и фланговый участки интронов заметно различаются. Установлено, что удаление интрона гена супрессора тРНКтир при помощи направленного мутагенеза не влияет на способность к экспрессии при введении в клетки. И все же, весмотря на то, что эта тРНК транскрибируется и процессируется нормально, остаток У в антикодоне не модифицируется как обычно с образованием ψ. Является ли это указанием на роль интронов в посттранскрипционной модификации тРНК или мы имеем дело с уникальным свойством тРНКтир – не ясно.

Сплайсинг тРНК. Механизм удаления интронов в тРНК лучше всего изучен у дрожжей, но некоторая информация есть в опытах с другими низшими эукариотами и растениями.

Задача состоит в том, что нужно вырезать интрон в антикодоновой петле. У дрожжей (прозрачка 26) здесь включаются специфические ферменты – эндонуклеазы, которые узнают эти последовательности и расщепляют про-тРНК в обоих сайтах сплайсинга с образованием указанных концов, полифункциональный белок, который катализирует все реакции кроме фосфатазной, 2`фосфатазы, лигазы и АТФ (в этом случае в месте сочленения обоих экзонов находится фосфатная группа, которая до этого была концевым фосфатом АТФ ). У позвоночных (прозрачка 27) три указанные реакции катализируют отдельные ферменты. При этом каждый фермент участвует только в сплайсинге тРНК. Отметим, что фосфат в месте соединения двух экзонов ранее находился в месте сочленения экзона и интрона.

1. Особые типы интронов: группа I.

Гены ядерных рРНК некоторых низших эукариот содержат особые интроны и имеют уникальный механизм сплайсинга. Подобные интроны обнаружены во многих генах, но ни один из них не был выявлен в генах позвоночных.

Интроны группы I отличаются друг от друга по размеру, они имеют ряд общих свойств:

А) они сами катализируют свой сплайсинг, который может протекать in vitro в отсутствии каких-бы то ни было белков;

Б) информация, необходимая для сплайсинга, содержится во множестве относительно коротких внутренних последовательностей внутри интрона, которые обеспечивают укладку молекулы с образованием характерной пространственной структуры.

В) сплайсинг инициируется свободным гуанозином или любым из его 5`-фосфорелированных производных

Г) конечными продуктами сплайсинга являются рРНК и линейная РНК, размер которых несколько меньше, чем размер интрона.

Самосплайсинг интронов группы I . про-рРНК, прототип интрона группы I осуществляется при участии последовательных реакций трансэтерификации, в которых акты фосфодиэфирного обмена не сопровождаются гидролизом. (прозрачка 28).

1. Особые типы интронов: группа II.

Интроны группы II распространены менее широко. Они обнаружены в двух митохондриальных генах дрожжей, кодирующих одну из субъединиц цитохромоксидазы и цитихром b; интересно, что в этих генах присутствуют также интроны группы I.

Сплайсинг интронов группы II.

Интроны группы II также подвергаются самосплайсингу in vitro, но в этом случае реакция инициируется не экзогенным гуанозином, а остатком входящим в состав самого интрона (прозрачка 29) Интроны группы II, высвобожденные после сплайсинга представляют собой лассоподобные структуры, в которых 5`-концевой фосфат РНК интрона соединен фосфодиэфирной связью с 2`-гидроксильной группой внутреннего нуклеотида.

Альтернативный сплайсинг

При сплайсинге большей части про-мРНК каждый интрон вырезается в соответствующих 5`-и 3`-сайтах сплайсинга. В результате все экзоны и порядок их расположения в транскрипте сохраняются в зрелой мРНК и образуют непрерывную последовательность (конститутивный сплайсинг). Однако сплайсинг некоторых про-мРНК протекает по-разному с образованием семейства близких по строению мРНК, каждая из которых состоит из специфического набора экзонов и кодирует одну из изоформ белков одного семейства. Такой способ процессинга РНК называется альтернативным сплайсингом (прозрачка 30). Растет число генов из разных организмов, от Drosophila до человека и их вирусов, о которых известно, что при созревании их про-мРНК используется альтернативный сплайсинг. Эти гены кодируют многие белки, в том числе некоторые белки, участвующие в формировании цитоскелета, мышечном сокращении, сборке мембранных рецепторов, пептидных гормонов, в промежуточном метаболизме и транспозиции ДНК (перемещение некоторых сегментов ДНК в другие геномные локусы).

ЛЕКЦИЯ

ТЕЛОМЕРЫ И ТЕЛОМЕРАЗА. РИБОЗИМЫ.

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

С помощью метода культивирования клеток животных и растений in vitro клетки самых разнообразных тканей человека можно выращивать на специально подобранных питательных средах, подобно бактериям или другим одноклеточным организмам. Множество клеточных культур человека изначально получено из клеток раковых опухолей. Эти клетки могут делиться в культуре неограниченное число раз (поэтому их называют бессмертными, или иммортализованными). Биологи долгое время пребывали в уверенности, что в оптимальных условиях бесконечно долго могут делиться и нормальные клетки человека и животных (как в культуре, так и в организме).

Однако в начале 1960-х годов Леонард Хейфлик установил, что в клеточных культурах нормальные диплоидные (соматические) клетки человека способны делиться лишь ограниченное число раз. При этом предельное число делений (Ограничение на число клеточных делений и называют лимитом Хейфлика.) сильно зависит от возраста индивидуума, которому эти клетки изначально принадлежали. Так, клетки, которые брали у новорожденных, делились в культуре 80-90 раз, а у 70-летнего человека - только 20-30 раз. Достигнув "лимита Хейфлика", клетки переходят в состояние одряхления (которое в англоязычной, а теперь зачастую и в русской литературе называется сенесенсом, senescence), которое характеризуется резким изменением метаболизма, и в первую очередь нарушением репликации ДНК. Вслед за этим состоянием обычно следует гибель клеток.

В январе 1998 года средства массовой информации во всем мире буквально взорвались сообщениями о том, что группе американских ученых удалось заставить нормальные клетки человека преодолеть "лимит Хейфлика" почти вдвое. Вместо того чтобы состариться и умереть, клетки продолжали делиться и выглядели юными. При этом превращения их в раковые клетки (то есть злокачественной трансформации) не происходило: по всем признакам клетки, потерявшие способность стариться, были нормальными. В газетах немедленно появились статьи с заголовками вроде "Генетики уткнулись в бессмертие", "Лекарства от старения будут доступны, как аспирин", "Таблетки от старости становятся реальностью" и т.п.

Что же произошло на самом деле? Ученые из лабораторий Джерри Шейя, Вудринга Райта, работающие под патронажем фирмы "Джерон корпорейшн" ("Geron Corporation"), с помощью изящных генетических манипуляций заставили в нормальных клетках человека работать фермент теломеразу, активность которой до этого была нулевой. Теломераза участвует в образовании теломер-специальных структур, расположенных на концах линейных хромосом эукариот. Таким образом, обновление теломер и стало причиной спасения клеток от одряхления.

**ТЕЛОМЕРЫ**

Теломеры – это

- специализованные концевые районы линейной хромосомной ДНК,

- состоят из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей.

- В состав теломер входят также многие белки, специфически связывающиеся с теломерными ДНК-повторами.

- Таким образом, теломеры (так же, как и все другие районы хромосомы эукариот) построены из дезоксинуклеопротеидов (ДНП), то есть комплексов ДНК с белками.

- Существование таких участков было постулировано в 1938 году классиками генетики, лауреатами Нобелевской премии Барбарой Мак-Клинток и Германом Мёллером. Независимо друг от друга они обнаружили, что фрагментация хромосом (под действием рентгеновского облучения) и появление у них дополнительных концов ведут к хромосомным перестройкам и деградации хромосом. В сохранности оставались лишь области хромосом, прилегающие к их естественным концам. Лишенные концевых теломер, хромосомы начинают сливаться с большой частотой, что ведет к тяжелым генетическим аномалиям.

- они заключили, что естественные концы линейных хромосом защищены специальными структурами. Г. Мёллер предложил называть их теломерами (от греч. телос - конец и мерос - часть).

- В последующие годы выяснилось, что теломеры не только предотвращают деградацию и слияние хромосом (и тем самым поддерживают целостность генома хозяйской клетки),

- но и, по-видимому, ответственны за прикрепление хромосом к специальной внутриядерной структуре (своеобразному скелету клеточного ядра), называемой ядерным матриксом (рис. 1).

- Таким образом, теломеры играют важную роль в создании специфической архитектуры и внутренней упорядоченности клеточного ядра. Более того, мы покажем, что наличие на концах хромосом специальной теломерной ДНК позволяет решить так называемую проблему концевой недорепликации ДНК.

- Первыми объектами исследования были одноклеточные простейшие (ресничная инфузория тетрахимена, в частности), поскольку из-за особенностей строения ядерного и хромосомного аппарата они содержат несколько десятков тысяч очень мелких хромосом и, следовательно, множество теломер в одной клетке (для сравнения: у высших эукариот на клетку приходится менее ста теломер).

Многократно повторяющиеся блоки в теломерной ДНК простейших состоят всего лишь из шести-восьми нуклеотидных остатков. При этом одна цепь ДНК сильно обогащена остатками гуаниловой кислоты (G-богатая цепь; у тетрахимены она построена из блоков TTGGGG), а комплементарная ей цепь ДНК соответственно обогащена остатками цитидиловой кислоты (С-богатая цепь).

У дрожжей повторяющиеся блоки в теломерной ДНК заметно длиннее, чем у простейших, и зачастую не столь регулярные.

Каково же было удивление ученых, когда оказалось, что теломерная ДНК человека построена из TTAGGG-блоков, то есть отличается от простейших всего лишь одной буквой в повторе. Более того, из TTAGGG-блоков построены теломерные ДНК (вернее, их G-богатые цепи) всех млекопитающих, рептилий, амфибий, птиц и рыб. Столь же универсален теломерный ДНК-повтор у растений: не только у всех наземных растений, но даже у их весьма отдаленных родственников - морских водорослей он представлен последовательностью TTTAGGG. Впрочем, удивляться здесь особенно нечему, так как

-в теломерной ДНК не закодировано никаких белков (она не содержит генов), а у всех организмов теломеры выполняют универсальные функции, речь о которых шла выше. Правда, как это часто бывает в живой природе, из этого общего правила есть редкие, но важные исключения. Наиболее известное из них - теломерная ДНК плодовой мухи дрозофилы. Она представлена не короткими повторами, а ретротранспозонами - подвижными генетическими элементами (подробнее о подвижных генетических элементах и роли ретротранспозонов в образовании теломер см. в статьях В.М. Глазера "Гомологичная генетическая рекомбинация" и "Генетическая рекомбинация без гомологии: процессы, ведущие к перестройкам в геноме" и В.А. Гвоздева "Подвижная ДНК эукариот. Ч. 1-2" в "Соросовском Образовательном Журнале" (1998. № 7, 8).

- Очень важная характеристика теломерных ДНК - их длина. У человека она колеблется от 2 до 20 тыс. пар оснований (т.п.о.), а у некоторых видов мышей может достигать сотен т.п.о.

- Было замечено, что у многих видов двуспиральная теломерная ДНК на самом конце содержит однотяжевой "хвост". Этот однотяжевой район теломерной ДНК представлен ее G-богатой цепью и заканчивается свободной 3'-гидроксильной группой. Соответственно белки теломер принято подразделять на две группы: белки, которые связаны с однотяжевой теломерной ДНК, и белки, связанные с двутяжевой ДНК теломеры. Эти белки изучаются весьма интенсивно, но знаем мы о них еще мало. Нет сомнений в том, что теломерные белки участвуют во всех функциях теломер, поддерживая их структуру и регулируя длину теломерной ДНК (как мы увидим ниже, длина теломер - чрезвычайно важный параметр). Установлено, что некоторые из белков, ассоциированных с двуспиральной теломерной ДНК, регулируют активность определенных генов, повышая или подавляя их экспрессию. В качестве примера можно привести дрожжевой белок Rap1p. Этот ДНК-связывающий белок, несомненно, принимает участие в регуляции длины теломерной ДНК. В то же время, даже будучи в составе теломеры, он участвует в активации и репрессии транскрипции. Это означает, что изменения или нарушения в структуре теломер могут затрагивать не только их собственные функции, но и экспрессию жизненно важных генов, находящихся в других районах хромосом. Кроме того, важные для поддержания общей структуры хромосом белки располагаются на ДНК, непосредственно примыкающей к теломерной (иногда ее называют субтеломерной ДНК).

Известно, что ДНК-полимеразы, синтезируя дочернюю цепь ДНК, прочитывают родительскую цепь в направлении от ее 3'-конца к 5'-концу. Соответственно дочерняя цепь синтезируется в направлении 5' 3'. В противоположном направлении синтез цепи ДНК фермент катализировать не может (рис. 2). Кроме того, ДНК-полимераза начинает синтез только со специального РНК-праймера - короткой РНК-затравки, комплементарной ДНК. После окончания синтеза ДНК РНК-праймеры удаляются, а пропуски в одной из дочерних цепей ДНК заполняются ДНК-полимеразой. Однако на 3'-конце ДНК такой пропуск заполнен быть не может, и поэтому 3'-концевые участки ДНК остаются однотяжевыми, а их 5'-концевые участки - недореплицированными. Отсюда ясно, что каждый раунд репликации хромосом будет приводить к их укорочению. Понятно, что прежде всего должна сокращаться длина теломерной ДНК.

В 1984 году Э. Блэкберн и Э. Грайдер выделили фермент, который с помощью механизма, отличного от механизма реакций, лежащих в основе репликации ДНК, синтезирует теломерную ДНК. Этот фермент был назван теломеразой.

**КАК РАБОТАЕТ ТЕЛОМЕРАЗА**

Теломераза – это фермент‚ синтезирующий тандемно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит G-цепь теломерной ДНК.

- она относится к классу ДНК-полимераз

- теломераза - это РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза.

- Ферменты этого класса, синтезирующие ДНК на РНК-матрицах, очень хорошо известны молекулярным биологам. Они закодированы и содержатся в ретровирусах (например, в вирусе иммунодефицита человека, вызывающем заболевание СПИДом) и служат для синтеза ДНК-копий их геномов, который в ретровирусе представлен РНК.

- В клеточном геноме обратные транскриптазы закодированы в ретротранспозонах.

- РНК, используемая теломеразой для синтеза теломерной ДНК в качестве матрицы, входит в состав этого фермента. В этом уникальность теломеразы: на сегодня это единственная известная РНК-содержащая обратная транскриптаза.

- Теломеразные РНК у разных организмов сильно различаются по длине и структуре.

- Теломеразы простейших содержат РНК длиной в 150-200 нуклеотидных остатков (н.о.),

- длина теломеразной РНК человека - 450 н.о.,

- теломераза дрожжей содержит аномально длинную РНК (около 1300 н.о.).

- Как и любая другая РНК клетки, теломеразная РНК обладает специфической вторичной и третичной структурой. Вторичная структура изолированной теломеразной РНК достоверно установлена только для теломераз простейших. Пространственная структура теломеразной РНК в составе ферментативного комплекса пока еще неизвестна.

- Матричный участок представлен в теломеразной РНК только один раз. Его длина не превышает длину двух повторов в теломерной ДНК, которые он кодирует и которым он, разумеется, комплементарен.

- Так как теломераза синтезирует сегменты ДНК, повторяющиеся много раз, используя только один сегмент своей РНК, она должна обладать способностью периодически (после завершения синтеза каждого повтора) перемещать (транслоцировать) матричный участок в район 3'-конца синтезируемой теломерной ДНК. Источником энергии для такого перемещения, по-видимому, служит сама реакция синтеза цепи теломерной ДНК, поскольку дезоксинуклеозидтрифосфаты - субстраты этой реакции - высокоэнергетические вещества.

Такое удлинение возможно, потому что концы хромосом содержат повторы из нескольких нуклеотидов (например, у человека ТТАGGG), которым комплементарен участок РНК - компонента теломеразы. Таким образом, теломераза узнает выступающий 3'-конец и удлиняет его. В таком случае удается, снова с использованием ДНК-затравки и РНК-матрицы, достроить конец ДНК (см. рис. 3). Теломеразная машина устроена таким образом, что конец хромосомы может не только сохраняться, но и удлиняться в ряду поколений. Действительно, последнее нетрудно себе представить, если достраиваемый 3'-конец будет достаточно длинным. Одна из причин старения видится в том, что при отсутствии теломеразы в некоторых тканях происходит укорачивание хромосомы с потерей важных генов. Наоборот, бессмертие ряда клеток в культуре вне организма, свойственное, как правило, клеткам из опухолей, объясняется реактивацией теломеразы. Мы кратко рассмотрели эту интересную проблему, связанную с активностью теломеразы и вечными проблемами биологического старения и опухолевого роста, поскольку оказалось, что иногда в борьбу с укорочением концов хромосом вступают мобильные элементы. У плодовой мушки дрозофилы отсутствует теломеразная машина, но концы ДНК удлиняются за счет перемещений ретротранспозонов. На этом примере впервые показана важная структурная и функциональная роль ретротранспозонов. Они выступают как компоненты генома, спасающие хромосому от укорачивания. В качестве спасателей выступают ретротранспозоны, относящиеся к семействам, без длинных концевых повторов. Ретротранспозоны перемещаются, образуя повторяющуюся структуру, в которой элементы соединены друг с другом по типу "голова к хвосту" (см. рис. 3). Сначала на РНК-транскрипте как на матрице с помощью ревертазы строится комплементарная нить ДНК, а затем после удаления РНК-матрицы достраивается другая. Таким образом, если эти ретротранспозоны и существовали когда-то как элементы-паразиты, то впоследствии геном хозяина приспособил их для выполнения столь важной функции, как сохранение концевых участков хромосом. Эти ретротранспозоны стали уже не эгоистами, а бесценными помощниками, спасающими хромосому от потери генов.

1. На первой стадии теломераза находит 3'-конец теломерной ДНК, с которым часть матричного участка теломеразной РНК образует комплементарный комплекс. При этом теломераза использует 3'-конец хромосомной ДНК в качестве праймера.
2. Далее наступает очередь РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности теломеразы. Она обеспечивается специальной субъединицей теломеразы, которая по устройству своего каталитического центра во многом сходна с обратными транскриптазами ретровирусов и ретротранспозонов.
3. Когда синтез ДНК-повтора заканчивается, происходит транслокация, то есть перемещение матрицы и белковых субъединиц фермента на заново синтезированный конец теломерной ДНК, и весь цикл повторяется вновь.

Знакомство даже с весьма схематичным описанием механизма теломеразной реакции (см. рис. 3) приводит к заключению, что двумя компонентами - обратной транскриптазой и теломеразной РНК - для ее осуществления обойтись нельзя.

Нет сомнений в том, что в его составе должны быть субъединица, отвечающая за поиск и связывание 3'-конца хромосомы (и выполняющая таким образом своеобразную якорную функцию); субъединица, ответственная за транслокацию; субъединицы, связывающие продукт реакции (однотяжевую ДНК). В составе теломеразы обычно обнаруживается и белковая субъединица с нуклеазной активностью, которая, по-видимому, отщепляет от 3'-конца теломерной ДНК один за другим несколько нуклеотидов до тех пор, пока на этом конце не окажется последовательность, комплементарная нужному участку матричного сегмента теломеразной РНК. Эти субъединицы теломеразы, выполняющие разнообразные функции в ходе синтеза G-цепи теломерной ДНК, изображены на рис. 4, на котором приведена гипотетическая структура теломеразы дрожжей. Нужно еще раз подчеркнуть, что полный белковый состав фермента не известен до сих пор ни в одном случае. Поэтому в табл. 1 приведены характеристики только хорошо изученных белковых субъединиц нескольких теломераз.

Широкое распространение теломераз среди эукариот говорит о том, что механизм синтеза теломерной ДНК, который мы наблюдаем у современных организмов, возник очень давно. Более того, эволюционно-генетический сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов каталитических субъединиц теломераз и других обратных транскриптаз показывает, что этот механизм мог существовать еще до появления первых эукариотических клеток.

С-цепь теломерной ДНК синтезируется с помощью обычной ДНК-полимеразы (см. рис. 2). Поэтому 3'-концевой участок G-цепи, на котором, по-видимому, первоначально была РНК-затравка, в конечном итоге остается в однотяжевом состоянии (то есть в принципе он готов к тому, чтобы теломераза нарастила на нем новый повтор).

Активность теломеразы у высших эукариот обнаружена лишь в трех типах клеток:

- генеративных,

- раковых

- линиях иммортализованных клеточных культур.

половых и стволовых клетках. В остальных типах клеток синтез этого фермента прекращается еще в эмбриональный период развития

В организме при дифференцировке клеток теломераза репрессируется. Экспрессию теломеразы считают фактором иммортализации клеток.

В соматических клетках, культивируемых in vitro, теломераза не работает и теломеры постепенно укорачиваются. Длина теломер достоверно коррелирует с пролиферативным потенциалом (например, в фибробластах человека). Укорочение теломер может играть роль митотических часов, отсчитывающих число делений клетки. По достижении критической длины теломерной ДНК запускаются процессы остановки клеточного цикла [5]. Блок клеточных делений наступает еще до того, как теломера исчезла вовсе. Существует некоторая минимальная длина теломеры, когда деление еще разрешено. Иными словами, прекращение деления наступает до того, как начал разрушаться смысловой текст генома. Таким способом эукариоты страхуют себя от появления монстров вследствие недорепликации ДНК.

Опубликованная в 1998 году в журнале "Science" статья американских исследователей благодаря средствам массовой информации привлекла внимание не только ученых (а в первую очередь не ученых) в связи с проблемами старения и "клеточного бессмертия". В этой прекрасной работе коллектива, возглавляемого Джерри Шеем, удалось на 40% увеличить число делений нормальных соматических клеток человека в культуре. С помощью генно-инженерных методов в клетки был введен ген каталитической белковой субъединицы теломеразы и прилегающий к нему участок ДНК, регулирующий его работу. При активной работе гена увеличивался как размер теломерной ДНК, так и продолжительность жизни клеточных культур. Сверх обычных 50 делений клетки прошли дополнительно 20 делений.

Укорочение теломер можно рассматривать как молекулярный индикатор количества делений, но не старения клетки. Так, на культуре нормальных фибробластов человека, взятых от доноров в возрасте от 0 до 93 лет, выявили корреляцию между начальной длиной теломер и пролиферативной способностью клетки во всем диапазоне возрастов. А размер теломерной ДНК сперматозоидов не уменьшался в соответствии с возрастом мужчины, что говорит об экспрессии теломеразы в линии половых клеток. Прекращение работы теломеразы, отмечаемое в подавляющем большинстве дифференцированных соматических клеток животных, является свидетельством их зрелости, а стало быть, и неизбежно следующих затем процессов увядания и гибели.

Старение особи - это нормальная биологическая функция, способствующая прогрессивной эволюции вида, размножающегося половым путем. Давление естественного отбора ослабевает после достижения животным репродуктивного успеха, поскольку существование особи после этого имеет меньшее значение для вида. Смерть от старости удаляет из популяции выполнивших свою роль предков и дает простор потомкам - носителям новых полезных признаков. Как любая важная биологическая функция, старение обусловлено параллельным действием нескольких молекулярных механизмов [6]. Выключение теломеразы - лишь один из них.

Не стоит рассматривать гены, кодирующие белковые субъединицы теломеразы и входящую в ее состав РНК, как "гены бессмертия". Поддержание длины теломерной ДНК на определенном уровне зависит не только от взаимодействия с ней теломеразы и теломерсвязывающих белков, но и некоторых, пока неизвестных факторов, регулирующих образование самих компонентов теломеробразующего комплекса.

Вряд ли бессмертие, достигнутое раковыми клетками, размножающимися в культуре десятилетиями без укорочения теломер, - это то, к чему нужно стремиться. Лекарства от смерти нет. Но тот факт, что введение в такие клетки препаратов, связывающих РНК-компонент теломеразы, приводит к укорочению теломер с последующей гибелью клеток, вселяет надежду на появление новых средств борьбы с раком.

Понимание механизма работы теломеразы, а главное, регуляции экспрессии ее в клетке приблизит нас к пониманию процессов и злокачественной трансформации и старения.

**ТЕЛОМЕРАЗА, РАК И СТАРЕНИЕ**

Вопрос о том, в какой мере теломерный механизм участвует в старении многоклеточных организмов. Вполне возможно, что они изобрели совсем иные программы старческого феноптоза. Однако несомненно, что у людей - рекордсменов по долгожительству уменьшение длины теломер уже приближается к той роковой черте, за которой наступает запрет на размножение клеток. Так, по данным группы К. Сасаджимы из Японии, теломеры в клетках печени стариков старше 80 лет оказываются почти вдвое короче, чем у детей до 8 лет. По-видимому, продлить жизнь тем, кому за 100, можно лишь при условии, что удастся нарастить их теломеры, включив на какое-то время теломеразу в печени и других тканях, где этот фермент выключился еще во время эмбрионального развития.

Рассмотрим данные о длине теломерной ДНК и активности теломеразы в различных клетках человека, приведенные в табл. 2.

Высокая теломеразная активность наблюдается в половых клетках человека в течение всей его жизни. Соответственно их теломеры состоят из наибольшего числа ДНК-повторов и содержат все необходимые белки для нормальной пролиферации клеток. Аналогичная ситуация наблюдается и для стволовых клеток. Напомним, что стволовые клетки делятся неограниченно долго. Однако у стволовой клетки всегда есть возможность дать две дочерние клетки, одна из которых останется стволовой ("бессмертной"), а другая вступит в процесс дифференцировки. Благодаря этому стволовые клетки служат постоянным источником разнообразных клеток организма. Например, стволовые клетки костного мозга дают начало гемопоэзу - процессу образования клеток крови, а из базальных клеток эпидермиса происходят разнообразные клетки кожного покрова. Как только потомки половых или стволовых клеток начинают дифференцироваться, активность теломеразы падает и их теломеры начинают укорачиваться. В клетках, дифференцировка которых завершена, активность теломеразы падает до нуля, и, как мы уже отмечали, с каждым клеточным делением они с неизбежностью приближаются к состоянию сенесенса (перестают делиться). Вслед за этим наступает кризис, и большинство клеток погибают (рис. 5). Эта картина характерна для подавляющего большинства известных культур клеток эукариот. Однако и здесь есть редкие, но важные исключения: теломеразная активность обнаруживается в таких "смертных" клетках, как макрофаги и лейкоциты.

Недавно было установлено, что нормальные соматические клетки потому лишены теломеразной активности, что в них полностью подавлена экспрессия гена ее каталитической субъединицы (обратной транскриптазы). Другие же составляющие теломеразы, включая теломеразную РНК, образуются в этих клетках, хотя и в меньших количествах, чем в их "бессмертных" прародителях, но постоянно (или, как говорят, конститутивно). Открытие этого важного факта Дж. Шеем, В. Райтом и их сотрудниками и стало основой для той сенсационной работы по преодолению "лимита Хейфлика". Действительно, все остальное было уже делом техники (хотя и очень непростой).

В нормальные соматические клетки были внесены гены теломеразной обратной транскриптазы с помощью специальных векторов, сконструированных из вирусных ДНК. Уровень экспрессии гена в эукариотической клетке зависит от многих факторов, в том числе от белков - факторов транскрипции, связывающихся со специализированными участками ДНК, расположенными в хромосоме по соседству с этим геном. Геномы вирусов, которым нужно быстро размножиться в клетке-хозяине, несут в себе участки ДНК, способные во много раз усилить экспрессию того или иного гена. Исследователи позаботились о том, чтобы в их конструкциях ген теломеразной обратной транскриптазы человека оказался в окружении именно таких участков вирусной ДНК. Результаты их экспериментов можно суммировать кратко: клетки, в которых теломераза поддерживала длину теломер на уровне, характерном для молодых клеток, продолжали делиться и тогда, когда контрольные клетки (без теломеразы) дряхлели и умирали.

В этой и аналогичной ей работах особенно тщательно контролируется отсутствие в культуре клеток раковых клеток. Известно, что клетки большинства исследованных на сегодня раковых опухолей характеризуются достаточно высокой активностью теломеразы, которая поддерживает длину теломер на постоянном уровне (см. табл. 2). Этот уровень заметно ниже, чем, например, у эмбриональных клеток, но он достаточен, чтобы обеспечить безграничное деление раковых клеток в культуре. Существует гипотеза, у которой немало сторонников, предполагающая, что потеря теломеразной активности соматическими клетками современных организмов есть благоприобретенное в процессе эволюции свойство, уберегающее их от злокачественного перерождения.

Сравнительно небольшая длина теломер у большинства раковых клеток наводит на мысль о том, что они происходят из нормальных клеток, достигших предкризисного состояния. Как мы уже отмечали, это состояние характеризуется нарушением регуляции многих биохимических реакций. В таких клетках происходят многочисленные хромосомные перестройки, которые в том числе ведут и к злокачественной трансформации (более подробно о происхождении злокачественных опухолей см. в статье Г.И. Абелева "Что такое опухоль": Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 10). Большинство этих клеток погибают, но в части из них в результате случайных мутаций может активироваться постоянная экспрессия генов теломеразы, которая будет поддерживать длину теломер на уровне, необходимом и достаточном для их функционирования (см. рис. 5).

Некоторое время вызывал недоумение тот факт, что примерно пятая часть проанализированных раковых опухолей и клеток вообще не содержала активной теломеразы. Оказалось, однако, что длина теломер в них поддерживается на должном уровне. Таким образом, в этих клетках действует другой (не теломеразный, а скорее рекомбинационный) механизм образования теломерной ДНК (см. статью В.М. Глазера "Гомологичная генетическая рекомбинация": Соросовский Образовательный Журнал. 1998. № 7). Иными словами, такие клетки находятся в том же ряду исключений из правила, что и дрозофила.

**ВМЕСТО ЗАКЛЮЧЕНИЯ**

Какие же практические выводы следуют из того, что на сегодняшний день удалось узнать о связи между активностью теломеразы, раковым ростом и старением клеток. Казалось бы, они лежат на поверхности: не хочешь стареть - активируй теломеразу; хочешь убить раковую опухоль - убей в ней сначала теломеразу.

Легковесность первого вывода (а именно его подхватили средства массовой информации) очевидна: между культурой клеток и клеточной тканью, а тем более организмом дистанция огромного размера. Еще не пришло время всерьез обсуждать проблему получения трансгенных органов человека для пересадки их больным людям (хотя теоретически это, конечно, возможно). А главное, процесс старения не только организма, но и клетки - это исключительно сложный комплекс изменений во множестве биохимических реакций, и его вряд ли можно повернуть вспять, воздействуя только на какую-то одну из них. В то же время существуют вполне реальные планы активировать теломеразу в клетках кожи, которую пересаживают пациентам с сильными ожогами, и тем самым активировать их рост. Или попытаться тем же путем "омолодить" клетки сетчатки глаза, взяв их у пациента, страдающего помутнением сетчатки (а это широко распространенное заболевание у пожилых людей, ведущее к слепоте), и затем вернуть назад.

Что же касается разработки методов избирательного подавления теломеразной активности в раковых опухолях, то сейчас это важное направление в поиске новых средств борьбы со злокачественными заболеваниями. Пока большинство работ связано с испытанием ингибиторов обратных транскриптаз (каталитических субъединиц теломераз). Опыт борьбы со СПИДом, где пытаются решить аналогичную задачу, говорит о том, что определенные надежды найти такое лекарство есть. Главная трудность заключается в том, что каталитическая субъединица теломеразы - это одна из ДНК-полимераз и искомый ингибитор должен быть направлен именно на теломеразную ДНК-синтезирующую активность. В противном случае он будет токсичен для нормальных клеток.

Более перспективными кажутся недавно появившиеся работы, в которых описано избирательное подавление теломеразной РНК, вызывающее гибель раковых клеток в культуре. В нормальных клетках, как это мы отмечали выше, теломеразная РНК синтезируется, но эти клетки лишены теломеразной активности и, скорее всего, теломеразная РНК им не нужна.

Изучение тонкой структуры теломер и механизма действия теломераз находится еще только в начальной стадии. Однако они привлекают к себе огромный интерес исследователей, работающих в самых разных областях биологии и медицины, и здесь уже в ближайшее время можно ждать новых интересных открытий.