

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК КЛЕТКИ И ПАТОЛОГИЯ ОРГАНИЗМА

Козлов В.А.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, кафедра клинической иммунологии НГМУ, г. Новосибирск

Резюме. Несмотря на устоявшиеся представления о существовании явных различий в патогенезе основных заболеваний (рак, атеросклероз, аутоиммунные и аллергические заболевания), имеются основания думать о существовании неких фундаментальных процессов, лежащих в основе развития всех этих заболеваний, составляющих общую, единую часть их патогенеза. К таким процессам следует отнести процессы метилирования и деметилирования ДНК, ацетилирования и деацетилирования гистонов, процесс укорочения теломер, связанный с активностью теломеразы. Оказывается, что, по крайней мере, рак, атеросклероз, аутоиммунные заболевания характеризуются процессами тотального гипометилирования ДНК в различного рода клеточных элементах на фоне возвратного гиперметилирования отдельных генов. Предполагается, что данные об этих единых механизмах развития различных патологических процессов могут ставить вопрос о разработке единых методов терапии данных заболеваний, естественно, на фоне совершенствования методов лечения, специфических для отдельно взятой патологии.

Ключевые слова: метилирование, ДНК, гистоны, ацетилирование, гены.

Kozlov V.A.

METHYLATION OF CELLULAR DNA AND PATHOLOGY OF THE ORGANISM

Abstract. In spite of stable opinions concerning clear pathogenetic differences in main disease states (i.e., cancer, atherosclerosis, autoimmune and allergic diseases), there are sufficient reasons to assume some fundamental processes, that are common to development of these diseases, and represent a general factor of their pathogenesis. Such processes include, e.g., DNA methylation and demethylation events, acetylation and deacetylation of histones, the processes of telomere shortening connected with telomerase activity. It proves that, at least, cancer, atherosclerosis, and autoimmune diseases are characterized by total hypomethylation of different cellular elements, against «recurrent» DNA hypermethylation of single specific genes in the background. It is assumed that information about such common developmental mechanisms for different disease states may evoke an issue of a search for some common approaches to treatment of these diseases, along with elaboration of conventional treatment modalities, being specific to individual pathology. (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 4-5, pp 307-318)

Если признать правильность постулата П.К. Анохина «...что уже начальные процессы формирования самой «управляющей системы» находятся полностью под управлением будущего, необходимого в данный момент организму результата», перенося его на оплодотворенную яйцеклетку, то, возможно, начальными процессами формирования этой системы управления активности генома клетки и будут являться совокупность процессов метилирования ДНК и модификации

гистонов, процессов поддержания длины теломер. Так или иначе, но именно нарушение этих трех основных процессов, если не касаться мутационного, и лежат в основе формирования нестабильности генома со всеми вытекающими отсюда последствиями, включая, например, процесс репликативного старения клетки и заканчивая индукцией того или иного патологического процесса на различных стадиях онтогенеза организма.

«Рак — это болезнь генов», по мнению генетиков, и «рак — это болезнь регуляции генов», по мнению «эпигенетиков». Все это так, но все же рак как заболевание — это болезнь иммунной системы, которая не смогла «справиться» с болезнями генов и нарушениями регуляции генов. В принципе, все это может касаться и других

Адрес для переписки:

Козлов Владимир Александрович
630090, г. Новосибирск-91, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 222-26-74, 222-67-27.
Факс: (383) 222-70-28.
E-mail: v_kozlov@online.nsk.su

основных заболеваний современного человека (атеросклероз, аутоиммунные и аллергические заболевания, вторичные иммунодефициты). Можно оспаривать правильность данной сентенции, можно и согласиться с ней, но следует подумать о возможности объединения всех этих трех возможных причин в одно изначально целое, в одну объединяющую цепь событий, которая и приводит к развитию того или иного заболевания. По крайней мере, надо четко знать, что там где «болезнь генов», там мутации, там изменение последовательности ДНК, а там где «болезнь регуляции генов», там нет изменений в последовательности ДНК, там имеются изменения в механизмах регуляции экспрессии генов.

Так или иначе, весь процесс онтогенеза организма, начиная с момента оплодотворения яйцеклетки сперматозоидом и заканчивая естественной смертью, все заболевания и *de facto* и *de jure* связаны с нормальным или нарушенным функционированием многочисленных генов в клетках различных тканей и органов индивидуума. Следует напомнить, что человеческий геном содержит 23 000 генов, которые должны быть экспрессированы в клетках разных специфичностей точно в определенное время. Последнее во многом (если не во всем) будет зависеть от структуры хроматина, организованного из нуклеосом ДНК и гистонов: если хроматин конденсирован, то гены находятся в инактивированном состоянии, если хроматин открыт (деконденсирован) и активен, то это определяет активацию экспрессии генов. В свою очередь, динамика состояния хроматина определяется (контролируется) такими обратимыми процессами, как метилирование ДНК и модификация гистонов. Последняя состоит из трех, как бы, субпроцессов: метилирования, ацетилирования и фосфорилирования.

Указанные процессы обеспечиваются рядом ферментов: ДНК метилтрансферазой, гистоновой деацетилазой, гистоновой ацетилазой, гистоновой метилтрансферазой и белками метилсвязывающих доменов. Считается, что изменение активности этих процессов будет обуславливать дерегулирование экспрессии генов и являться индуктором развития многих и многих патологических процессов.

В принципе, регуляция экспрессии гена состоит из двух компонентных систем. К первой можно отнести непосредственный контроль со стороны активаторов и репрессоров транскрипции, которые характеризуются различными ядерными концентрациями, ковалентными модификаторами и ассоциациями субъединиц. Здесь влияние на экспрессию гена осуществляется через процесс транскрипции и стабильность мРНК, связанными с геномной последовательностью ДНК

и с возможными изменениями в ней. Вторая компонента базируется на эпигенетической регуляции экспрессии гена, обусловленной изменениями в структуре хроматина путем ковалентной модификации ДНК и гистонов. Естественно, что метилирование ДНК оказывает существенное влияние на структуру хроматина [47].

Геном клетки испытывает на себе мощное регуляторное влияние со стороны эпигенома. При этом, если первый идентичен в различных типах клеток и на протяжении жизни клетки, то второй, что принципиально важно, является динамичным по своей сути, варьирует от одного клеточного типа к другому и от одной стадии онтогенеза клетки к другой. Именно эпигеном отвечает за формирование сигналов, связанных с развитием клетки, с ее физиологией, с ее реакцией на окружение и с развитием патологических изменений. С активностью эпигенома связаны программы экспрессии генов, действующие в определенных типах клеток в данный конкретный момент времени. Можно сказать, что фенотип является результатом кооперативного взаимодействия генотипа — специфической последовательности ДНК — и эпигенотипа. Предполагается, что в силу значительно большей пластичности именно эпигенотип, а не генотип может быть основным индуктором возникновения болезни.

Главными составляющими эпигенома являются хроматин с его модификациями и ковалентные модификации цитозинового кольца, найденные в динуклеотидных последовательностях CG. N-терминальные хвосты гистонов, являющиеся основным строительным блоком хроматина, активно модифицируются с помощью таких процессов, как метилирование, фосфорилирование, ацетилирование. Специфические факторы и репрессоры транскрипции привлекают гистон-модифицирующие ферменты к специфическим генам, таким образом, определяя профиль модификации гистонов вокруг генов.

Предполагается, что ацетилирование гистонов является ведущим регуляторным сигналом для формирования конфигурации хроматина. Деацетилирование гистонов приводит к инактивации хроматина. Ацетилирование хвостовой части гистона обуславливает повышение чувствительности генов к взаимодействию с факторами транскрипции, в то время как деацетилирование хвостов в значительной степени ограничивает чувствительность ДНК к факторам транскрипции.

Метилирование ДНК, как эпигеномный механизм регуляции гена, повышается факторами, которые отвечают за структуру неактивного хроматина, в то время как деметилирование индуцируется факторами, которые индуцируют активацию хроматина. Метилирование ДНК,

по-видимому, является ведущим событием в индукции состояния молчания экспрессии генов путем инактивации хроматина, и однонаправленное отношение между метиляцией ДНК и подавлением хроматина предполагает, что ДНК метиляция определяет структуру хроматина. Однако становится ясно, что взаимоотношения между хроматином и метиляцией ДНК являются двунаправленными и что хроматин играет существенную роль в определении образца (пути) метиляции ДНК. Показано, что ацетиляция гистонов, индуцированная TSA, ингибитором HDAC (деацетилаза гистонов), обуславливает деметиляцию эктопически помещенных метилированных генов, свидетельствуя о том, что ацетиляция гистонов является критическим событием для процесса деметиляции. Кроме того, белки, ингибирующие ацетиляцию гистонов блокадой НАТ (гистоновая ацетилтрансфераза) к гистоновым хвостам, также ингибируют деметиляцию, индуцированную TSA. Также, например, стабилизирующий настраивание препарат valproate, который также ингибирует гистоновую деацетилазу, индуцирует деметиляцию, независимую от активной репликации. Коротко можно обозначить, что конформационно релаксированный хроматин (эухроматин) является критерием потенциально активированных генных регионов и ассоциирован с гипометилированной ДНК и ацетилированными гистонами, в то время как компактный хроматин (гетерохроматин) является транскрипционально безмолвным, гиперметилированным и связанным с неацетилированными гистонами.

Сам процесс метилирования ДНК заключается в добавлении метильной группы к цитозину в положении 5 с образованием 5-метилцитозина в пределах CpG (цитозин/гуанин) пары, изменяя при этом ряд характеристик ДНК в виде увеличения шага спирали ДНК и увеличения ее гидрофобности, что может иметь решающее значение для эффективного взаимодействия белков с соответствующими участками ДНК. В норме эти островки сохраняются, как правило, в неметилированном состоянии и являются мишенями для белков, которые связываются с неметилированными CpG и инициируют транскрипцию гена [37]. Влияние метилирования на транскрипцию осуществляется либо непосредственно через изменение эффективности связывания позитивных и негативных факторов транскрипции, либо опосредованно через формирование участков хромосом, неактивных в отношении процесса транскрипции. Предполагается, что в гаплоидном геноме человека имеется ~45 000 CpG островков в расчете на 23 000 экспрессирующихся генов и что промоторы многих, если не всех, консти-

тутивных генов или генов «домашнего хозяйства» содержат неметилированные CpG островки. По-видимому, есть биологическая целесообразность в активной экспрессии именно этих генов, обеспечивающих функционирование жизненно необходимых для клетки процессов, таких как гликолиз, биосинтез аминокислот и нуклеотидов, катаболизм белков и т.п. Другое дело гены «роскоши», осуществляющие специализированные функции в процессах пролиферации и дифференцировки клеток. Здесь гены просто не могут, не имеют право находиться постоянно в состоянии экспрессии. Они должны отработать «свое» на определенной стадии клеточного цикла в процессах пролиферации и дифференцировки и затем замолчать, т.е. подвергнуться метилированию. Возможно, именно поэтому только 40% из них имеют CpG островки, а у 60% этих генов присутствуют одиночные CpG-динуклеотиды. Можно ожидать, что если ген «домашнего хозяйства» будет инактивирован через механизм метилирования CpG островков (феномен MAGI – methylation-associated gene inactivation), то это вполне может оказаться летальным событием для клетки, без особых последствий для организма. Но если будет инактивирован какой-либо тканево-специфический ген (ген «роскоши»), здесь будет нанесен ущерб дифференцировочному клеточному пути без видимого вреда для общей жизнеспособности отдельной клетки. Пока не понятен феномен разной чувствительности динуклеотидных островков к метилированию, который заключается в том, что, например, в условиях искусственно созданной избыточной экспрессии в клетках ДНК метилтрансферазы одни CpG островки становятся гиперметилированными, а другие, и их большинство, не метилируются вообще [10]. Возможно, это имеет отношение к различиям между клетками разных тканей или разных стадий дифференцировки в эпигеномной регуляции генома клеток.

Предполагается, что процесс метилирования осуществляется в первые минуты после репликации ДНК, т.е. пострепликативно и является по своей сути событием эпигенетическим, т.к. нуклеотидная последовательность ДНК при этом не меняется. Можно думать о том, что метилируются здесь те гены, работа которых была необходима клетке на предыдущей стадии дифференцировки, т.е., очевидно репрессируются отдельные представители семейства генов роскоши. Следует всегда иметь в виду, что метилирование, хотя и является стабильной и наследуемой модификацией, в принципе обратимо под воздействием деметилирующих агентов или ферментов. В этом также заключается одно из принципиальных отличий данного процесса от мутаций в ДНК. По-