

*Все дело в рибосомах
Лев Овчинников*

ЭПИГЕНЕТИКА ГЕНОВ РИБОСОМНЫХ РНК

©2022 г.

О. ДЕНИСЕНКО

*Департамент медицины, Университет Вашингтона, Сиэтл,
штат Вашингтон, США*

I. Введение. II. Структурная организация рДНК. III. Значение нетранскрибируемых повторов рДНК. IV. Связь рДНК с заболеваниями человека и старением. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Производство рибосом начинается с синтеза рибосомных РНК (рРНК), который происходит в ядерных органеллах, ядрышках. Там же рРНК упаковываются в рибосомные субъединицы. Этот процесс требует участия множества вспомогательных факторов и расходуют приличную часть клеточных ресурсов. В этом обзоре мы обсудим эпигенетические механизмы регуляции генов рРНК. В широком смысле под эпигенетикой понимают долговременные изменения в экспрессии генов, которые сохраняются при клеточных делениях и даже могут передаваться от поколения к поколению. Эпигенетические изменения, отражающиеся на экспрессии генов, связаны с измененными профилями модификаций гистонов (в основном ацетилирования и метилирования лизинов) и метилирования ДНК (5-метилцитозин, 5мЦ) в области промотора, вдоль кодирующей части гена и удаленных регуляторных элементов. В этом контексте

Принятые сокращения: рРНК – рибосомная РНК; рДНК – ген рибосомной РНК; 5мЦ – 5-метилцитозин; ЯО – ядрышковый организатор; FISH – флуоресцентная гибридизация in situ; WRN – синдром Вернера; ChIP-seq – хроматиновая иммунопреципитация с последующим секвенированием; IGS – межгенное пространство в рДНК; DNMT – ДНК метилтрансфераза; UBF – фактор транскрипции РНК полимеразы I; HDAC – гистон-деацетилаза; 5hmC – 5-гидроксиметилцитозин; Hi-C – метод для анализа контактов между удаленными участками ДНК; HGPS – синдром ускоренного старения Хатчинсона – Гилфорда; DONaD – концепции о связи внутриутробного развития со здоровьем и болезнями в дальнейшей жизни.

Адрес для корреспонденции: Олег Денисенко: odenis@uw.edu

мы также обсудим неканонические функции локусов рДНК в эпигенетической регуляции других клеточных генов и поддержании целостности генома.

II. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ рДНК

Количество генов рДНК на геном варьирует у разных видов, от нескольких штук (7 у *Escherichia coli*) до тысяч (около 12000 у *Zea mays*) [1]. В геномах млекопитающих содержится 300–500 генов рДНК, которые организованы в несколько доменов, которые также содержат последовательности, функции которых по большей части неизвестны. Количество (доза) генов рДНК на геном варьирует между особями одного вида, например, у разных людей оно может отличаться в два-три раза. В ядре кластеры рДНК находятся в особых хромосомных компартментах, известных как ядрышковые организаторы, ЯО (англ. Nucleolar Organizer Regions, NORs). Первоначально они были обнаружены как участки хромосом, окрашивающиеся нитратом серебра, и в интерфазном ядре находящиеся в пределах ядрышек – компартментов, в которых происходит синтез рРНК и биогенез рибосом. На метафазных хромосомах, домены, которые в интерфазе принимают участие в формировании ядрышка, ЯО выглядят как темные области. У человека, например, повторы рДНК собраны в ЯО, расположенных на р-плечах пяти акроцентрических хромосом (хромосомы 13, 14, 15, 21 и 22) (рис. 1А) [2]. Анализ рДНК последовательностей показал, что между указанными плечами хромосом происходит обмен, и обнаружил выраженную структурную вариабельность рДНК между людьми и между хромосомами внутри одного человека. Распределение копий рДНК между хромосомами неравномерно, в частности, наименьшее количество повторов несет хромосома 21 человека [4, 5]. Похожая организация повторов рДНК имеет место и у других животных, например, мыши [6]. Количество хромосом, содержащих ЯО, отличается у разных видов животных. Из-за того, что ЯО состоят из повторяющихся последовательностей, они остаются плохо изученными и неаннотированными участками в опубликованных геномах млекопитающих. Современные инструменты для работы с геномными последовательностями отфильтровывают повторы, поэтому рДНК выпадают из анализа в эпигенетических исследованиях, основанных на методах ChIP-seq или секвенирования метилированной ДНК. Поэтому роль эпигенетических модификаций и генетических вариантов рДНК в развитии организма и патогенезе заболеваний мало изучена.

В каждом кластере гены рДНК располагаются в одном направлении, например, у человека на всех пяти хромосомах (рис. 1А) их транскрипция идет по направлению к центромере. Направленность транскрипции рДНК от теломеры к центромере у человека вряд ли имеет функциональное значение, так как у шимпанзе, ближайшего к человеку вида, рДНК ориентирована в противоположном направлении – навстречу теломере [3]. Возможно, такая однонаправленность рДНК отражает частую рекомбинацию между кластерами рДНК, которая поддерживает однородность их ориентации. Оказалось, что ориентация индивидуальных генов рДНК тоже динамична, так анализ единичных молекул ДНК с помощью FISH показал, что существенная доля (более 30%) человеческой рДНК находится в неканонической ориентации (не голова к хвосту, а палиндромы) [7]. Мутации в гене WRN, входящего в семейство хеликаз RecQ, которые вызывают ускоренное старение у людей, значительно повышают долю переориентированных повторов рДНК (до 50%) по сравнению со здоровыми братьями и сестрами, и с контролями того же возраста.

По сравнению с другими генами рДНК – один из наиболее нестабильных участков генома, где рекомбинация между повторами приводит не только к обмену участками между хромосомами, но и к динамическим изменениям числа копий рДНК на геном, как это было показано у дрожжей [8]. В клетках млекопитающих схожие динамические изменения в количестве копий генов рДНК не были описаны, тем не менее, у человека частота геномных перестроек (делеций/инверсий) в этих генах в 50 раз превышает среднюю частоту перестроек по геному (неопубликованные данные).

Нетранскрибируемая часть единицы рДНК называется межгенным пространством (англ. Intergenic Spacer, IGS). В его состав входят несколько относительно консервативных участков, такие как промотор и терминаторы (T_{1-11} у человека) РНК-полимеразы I, в то время как остальные участки его последовательности существенно различаются между собой у разных видов млекопитающих. Известно, что с IGS транскрибируются некодирующие РНК (англ. ncRNAs), которые задействованы в регуляции транскрипции рДНК [9]. Например, ncRNA, считываемая с промотора, ингибирует транскрипцию гена рДНК за счет привлечения ДНК метилтрансферазы DNMT3b к промотору [10] (см. ниже). Анализ участков IGS, кодирующих ncRNAs с подтвержденными регуляторными функциями, показал наличие в этих регионах большого количества гистоновых модификаций, ассоциированных с активной транскрипцией [11].

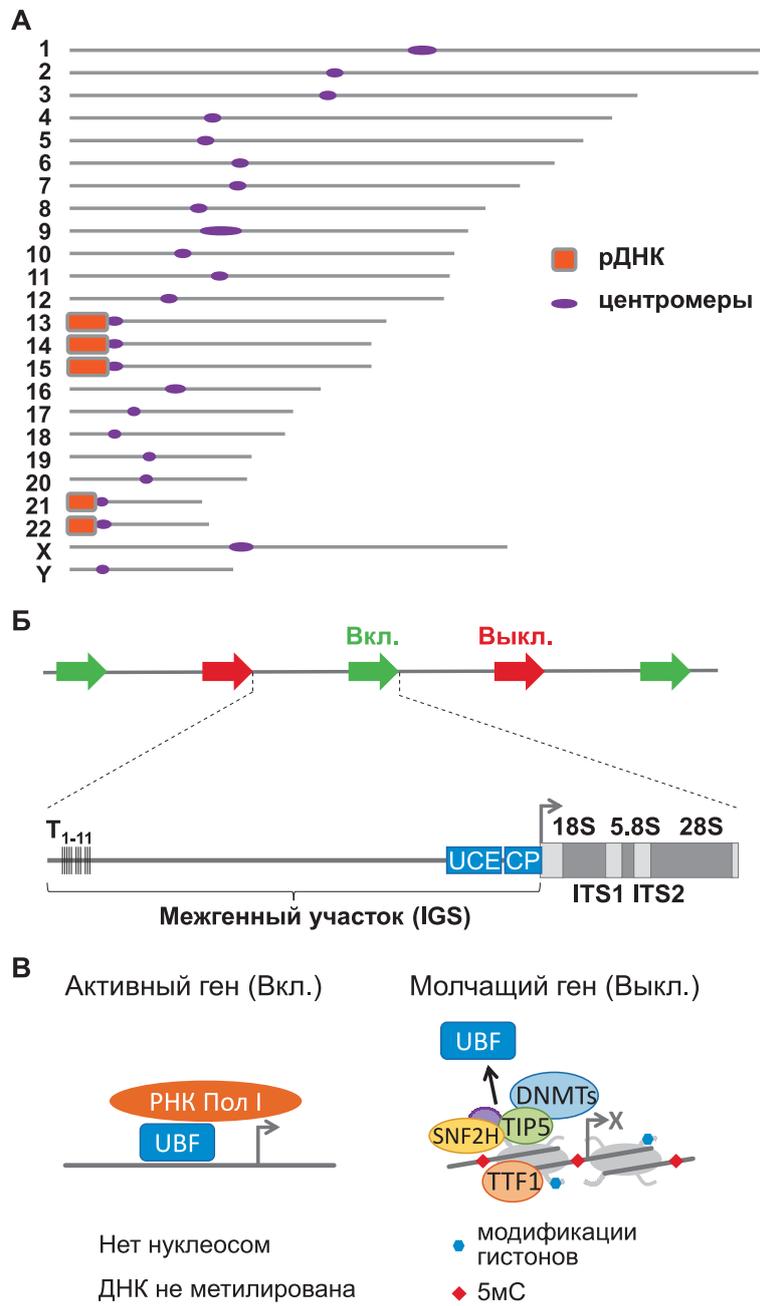


Рис. 1. Повторы рДНК. Пояснения к рисунку см. сл. стр.

Рис. 1. Повторы рДНК.

А. геномная организация рДНК: короткие плечи пяти хромосом человека содержат рДНК (оранжевые прямоугольники).

Б. кластер повторов рДНК с активными (зеленые стрелки) и молчащими (красные стрелки) генами. *Ниже*: строение одной единицы рДНК. Показано расположение IGS, области, кодирующей рРНК (серый прямоугольник), вышележащих регуляторных элементов (англ. upstream control elements, UCE), и промотора (core promotor, CP). T₁₋₁₁ – терминаторы транскрипции.

С. на активных копиях рДНК (слева) Pol I через UBF связывается со свободной от нуклеосом матрицей. Молчащее состояние гена (справа) поддерживается факторами, которые конденсируют хроматин и препятствуют связыванию UBF с ДНК.

ЭКСПРЕССИЯ рДНК

На долю рРНК приходится около 80% всей клеточной РНК. Чтобы удовлетворить потребность клетки в большом количестве рибосом во время пролиферации, в этот период синтез рРНК занимает существенную часть всех транскрипционных ресурсов клетки. У эукариот транскрипцию рДНК осуществляет специализированная РНК-полимераза I (Pol I), которая, как принято считать, транскрибирует только рДНК. В то же время Pol I не является абсолютно необходимой для синтеза рРНК, чтобы поддерживать рост клеток, как показали эксперименты со штаммами дрожжей, у которых весь синтез рРНК осуществляла РНК-полимераза II с конструкций, содержащих рДНК, под контролем промотора GAL7, индуцируемого галактозой [12]. Pol I синтезирует транскрипт-предшественник 45S (35S у дрожжей), который затем процессируется в зрелые рРНК 18S, 5,8S и 28S (у дрожжей – 25S). 5S РНК синтезируется отдельно. Гены, кодирующие рРНК, очень консервативным в эволюции, однако у человека и мыши в рДНК были зафиксированы отдельные внутри- и межвидовые однонуклеотидные вариации [13]. Некоторые из этих полиморфизмов последовательностей рРНК располагаются в функциональных участках рибосомы. Тканеспецифичная экспрессия некоторых вариантных аллелей рРНК свидетельствует, что полиморфизмы в РНК могут играть функциональную роль в развитии человека и функционировании тканей.

Одним из важнейших транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию рРНК, является UBF (от англ. upstream binding factor). UBF относится к семейству белков HMG (от англ. high mobility group) и он не участвует ни в каких клеточных процессах, помимо транскрипции, опосредуемой РНК-полимеразой I. UBF связывается с промотором гена рРНК и распространяется по всей кодирующей

последовательности гена [14], что подтверждает участие UBF в формировании активного состояния хроматина не только в районе промотора, но и вдоль всего гена рДНК [15, 16]. Помимо UBF в регуляции транскрипции рРНК принимают участие и другие транскрипционные факторы (см. обзор [17]), в том числе RRN3, который передает сигнал о наличии питательных веществ во внешней среде, чтобы изменить состояние хроматина в генах рРНК и как следствие, уровень транскрипции [18, 19].

Только часть генов рДНК транскрибируется в клетке. Количество активных повторов рДНК определяется внешними и внутренними сигналами (см. ниже), а также зависит от количества транскрипционного фактора UBF [16]. Нетранскрибируемые повторы могут быть в неактивном, но готовом для транскрипции, или молчащем (сайленсированном от английского silenced) состояниях недоступных для транскрипции, и для поддержания этих состояний требуются разные факторы. В клетках млекопитающих сайленсинг рДНК опосредуется метилированием ДНК в области промотора, которое препятствует образованию транскрипционного комплекса Pol I, мешая связыванию UBF с промотором [20]. Сайленсированное состояние инициирует фактор перестройки ядрышка NoRC, в состав которого входят белки TIP5 (от англ. TTF-I interacting protein 5) и SNF2H, также известный как SMARCA5. SNF2H имеет АТФазную активность и является членом подсемейства ISWI [21–23]. Этот комплекс меняет структуру хроматина на более компактную. Считается, что NoRC прочно связывается с промотором рДНК при участии некодирующей RNA, транскрибированной с IGS. Эта РНК связывается с фактором терминации транскрипции TTF-1, который взаимодействует с участком T₀ в составе промотора (рис. 1В) [24–26]. NoRC привлекает ДНК-метилтрансферазы (DNMTs) и ферменты, модифицирующие гистоны, такие как PARP1 (АДФ-рибозилтрансфераза) и HDAC1 (гистон-деацетилаза), что дополнительно усиливает состояние репрессии транскрипции [21, 23, 27]. Помимо метилирования ДНК, у млекопитающих сайленсинг рДНК тесно связан с внесением репрессивных модификаций гистонов, таких как ди- и триметилирование гистона H3 по остатку лизина 9 (H3K9me_{2/3}) и лизина 27 (H3K27me₃), и H4K20me₃. В отличие от молчащего хроматина с плотно упакованного нуклеосомами, в активных повторах рДНК нет нуклеосом.

III. ЗНАЧЕНИЕ НЕТРАНСКРИБИРУЕМЫХ ПОВТОРОВ рДНК

Клетки поддерживают высокий уровень транскрипции рРНК чтобы обеспечить необходимое количество рибосом, что может служить объяснением наличия большого количества копий рДНК в геномах млекопитающих. Однако, как отмечено выше, даже в быстро делящихся клетках транскрибируется только часть рДНК, а все остальные повторы рДНК находятся в сайленсированном состоянии. Транскрипционно молчащие и активные участки рДНК на хромосомах соседствуют друг с другом (рис. 1А) [5], что свидетельствует о том, что отдельные повторы, а не кластер повторов рДНК целиком, независимо друг от друга могут переходить из одного состояния в другое. Из-за этих наблюдений возникает вопрос: почему клетка даже при быстром росте поддерживает значительную долю повторов рДНК в молчащем состоянии, в котором с них не считывается рРНК? К примеру, у дрожжей количество копий повторов рДНК динамически изменяется, и, казалось бы, ничего не препятствует потере части копий, которые клеткой никогда не используются. Однако молчащие повторы стабильно сохраняются, что указывает на то, что они могут выполнять какие-то важные функции. Для изучения этого вопроса были созданы штаммы дрожжей, содержащие различное количество генов рДНК в геноме. Хотя клетки с небольшим количеством повторов (25 генов) демонстрировали тот же темп роста, что и контрольные клетки со 150 генами, они оказались более уязвимыми к агентам, повреждающим ДНК, таким как метилметансульфонат (MMS) и ультрафиолетовое (UV) излучение. Чувствительность к действию указанных агентов была обратно пропорциональна количеству генов рДНК в геноме [28]. Авторы работы предположили, что неактивные повторы рДНК предоставляют пространство («точку опоры») для накопления ферментов, обеспечивающих клеточный ответ на повреждения ДНК и устраняющие их. В поддержку этого предположения показано, что неактивные повторы рДНК ассоциированы с комплексами конденсина, который физически приближает сестринские хроматиды друг к другу и способствует репарации ДНК по пути гомологичной рекомбинации. В клетках штамма с небольшим количеством генов рДНК они все заняты белками транскрипционного аппарата, поэтому конденсин там нет и любое повреждение ДНК, которое может возникнуть, будет репарироваться с трудом. Предполагается, что в клетках млекопитающих «молчащие» повторы рДНК играют схожую роль в поддержании стабильности генома [29]. Например, перестройки ДНК, часто встречающиеся в злокачественных клетках, в некоторых случаях рака ассоциированы с уменьшением копийности

рДНК. Таким образом, можно предположить, что неактивные повторы рДНК обеспечивают пространство для накопления ферментов репарации у эукариот от дрожжей до человека. Тем не менее, остается неясным, что удерживает белки репарации ДНК на неповрежденных «молчащих» повторах рДНК. В качестве альтернативного объяснения роли рДНК в поддержании стабильности генома можно предположить, что сайленсинг рДНК – это временное состояние, вызванное повреждениями ДНК, индуцированными транскрипцией [32, 33], т.е. интенсивная транскрипция вносит разрывы в ДНК из-за торсионного стресса, вносимого работающей РНК полимеразой. Торсионный стресс и разрывы в ДНК приводят к остановке транскрипции. Кроме того, многочисленные модификации ДНК вроде гидроксиметилцитозина (5hmC) усиливают блокировку транскрипции, обусловленную торсионным стрессом [34]. Для устранения такой блокировки топоизомеразы и ферментами репарации нуклеотидов требуется время. С этой точки зрения транскрипция приводит к повреждениям ДНК, которые переводят ее во временное молчащее состояние, в котором повреждения восстанавливаются. Подобно тому, как в земледелии поля на один-два вегетационных цикла оставляют незасеянными, чтобы дать им время восстановиться, сайленсинг повторов рДНК может быть необходим для восстановления повреждений ДНК после цикла интенсивной транскрипции.

Помимо предполагаемого участия в поддержании стабильности генома, молчащие копии рДНК могут быть задействованы в регуляции экспрессии других генов, как напрямую, так и опосредованно. Было показано, что у дрозофилы делеции, затрагивающие кластер рДНК на Y-хромосоме и приводящие к уменьшению числа копий рДНК, приводили к изменениям в экспрессии несвязанных с Y-хромосомой генов вследствие глобальной утраты гетерохроматина (молчащего хроматина). Эти изменения были похожи на те, что происходят при утрате факторов поддержания гетерохроматина [35]. Важно отметить, что эти наблюдения опровергают модель «гетерохроматинового склада», согласно которой повторы рДНК выступают в роли хранилища для факторов поддержания гетерохроматина, а делеции рДНК приводят к высвобождению этих факторов и к появлению дополнительных зон гетерохроматина по всему геному. Поскольку делеции рДНК не отражаются на способности клеток осуществлять трансляцию [35], авторы исследования предположили, что ядрышко важно не только для образования рРНК (и количества рибосом, произведенных для трансляции), но и для поддержания гетерохроматина. В качестве возможного сценария, иллюстрирующего способность рДНК влиять на

образование гетерохроматина в других локусах, было показано, что неактивная X-хромосома (Xi) у самок мышей физически связывается с ядрышком в ходе клеточного цикла, причем предотвращение этого взаимодействия приводило к активации Xi-хромосомы [36]. Согласно предполагаемой модели, гетерохроматинизированные (молчащие) участки рДНК непосредственно взаимодействуют с Xi, за счет чего поддерживается ее неактивное состояние. Гены, расположенные на аутосомах (не половых хромосомах), также могут быть подвержены влиянию рДНК. На модельной системе эмбриональных стволовых клеток было установлено, что формирование гетерохроматина в генах рДНК запускает изменения состояния хроматина в различных областях генома, содержащих гены, вовлеченные в дифференцировку клеток и утрату плюрипотентности. Наблюдения, касающиеся физического и/или функционального взаимодействия между рДНК и другими генами, дополнительно подкрепляются данными анализа физических контактов рДНК с другими областями генома с помощью Hi-C [38]. Это исследование позволило выявить тысячи контактов рДНК с рДНК-ассоциированными участками и генами, разбросанными по всем хромосомам. Анализ контактов рДНК с другими участками генома в клетках разных линий позволил выявить как консервативные контакты, так и контакты, специфичные для отдельных клеточных линий. Все эти данные поддерживают идею о том, что рДНК может быть непосредственно вовлечена в регуляцию экспрессии множества генов.

IV. СВЯЗЬ рДНК С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА И СТАРЕНИЕМ

Заболевания человека, такие как рак или диабет, являются комплексными патологиями, которые включают изменения в экспрессии генов, а также метаболические и физиологические изменения. Поскольку рибосомы являются самыми многочисленными молекулярными комплексами в клетке, они сами и их образование неизбежно оказывают влияние на возникновение и развитие болезней по механизмам, описанным выше. Во-первых, транскрипция рРНК и биогенез рибосом потребляют до 70% ресурсов клетки [39], из-за чего они оказываются в центре контроля потребления энергии и питательных веществ клеткой – процессов, которые лежат в основе метаболических заболеваний, таких как ожирение и диабет. Во-вторых, количество молчащих копий генов рДНК в клетке играет важную роль в поддержании целостности генома, и обусловленная рДНК утрата геномной стабильности может привести к раку и старению. В-третьих, с

помощью прямых или опосредованных механизмов рДНК может влиять на экспрессию генов, связанных с развитием заболеваний. Ниже мы обсудим данные, свидетельствующие о связи между рДНК и болезнями человека.

ХРОНИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Риск развития хронических заболеваний могут усиливать различные факторы окружающей среды, воздействующие на организм на ранних стадиях его развития [40]. Одним из наиболее известных наблюдений, подтверждающих это утверждение, является изучение последствий голодной зимы в 1944 году в Нидерландах (англ. Dutch Famine Study). Осенью 1944 года в ответ на забастовки на голландских железных дорогах Германия временно заблокировала поступление продовольствия на территорию Нидерландов, что привело к страшному голоду зимой и весной. В течение того периода взрослые люди получали ежедневно лишь 400–800 калорий (в два-три раза меньше, чем до него). Людей, которые в этот промежуток времени подверглись воздействию голода *in utero*, сравнивали с людьми, рожденными до и после голодной зимы в той же стране. Младенцы, рожденные во время голодной зимы, имели меньший вес, и спустя примерно 50 лет эти люди обладали пониженной толерантностью к глюкозе, повышенным индексом массы тела, а также имели высокий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Подобные исследования, проведенные на когортах людей, а также схожие исследования на животных моделях легли в основу концепции о связи внутриутробного развития со здоровьем и болезнями в дальнейшей жизни (англ. Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD) [42], согласно которой риск развития хронических заболеваний во взрослом возрасте закладывается на ранних этапах развития организма. Поиск молекулярных механизмов, связывающих воздействие стрессовых факторов в начале жизни с предрасположенностью к хроническим болезням во взрослом возрасте, не смог выявить конкретные гены или эпигенетические модификации, которые были бы общими для всех экспериментальных моделей и видов животных. Общим является другое, в ответ на неблагоприятные воздействия, такие как нехватка кислорода или питательных веществ, наблюдается глобальное подавление экспрессии генов в тканях эмбриона [43, 44]. Этот эффект оказался таким сильным, что сказывался на общем содержании РНК в клетках зародыша, что указывает на участие рРНК, которая составляет ~80% от всей клеточной РНК. Описанный феномен удалось продемонстрировать на различных животных

моделях, таких как недоедание у беременных свиней и мышей, а также на модели плацентарной недостаточности у овец [43, 44]. Эти изменения оказались связанными с изменениями в метилировании рДНК, причем, что особенно важно, гипометилирование рДНК, вызванное неблагоприятными внутриутробными условиями, сохранялось и во взрослой жизни [44, 45]. Согласно указанным исследованиям, метилирование рДНК может быть потенциальной основой для зародышевого программирования предрасположенности к хроническим заболеваниям во взрослом возрасте. Предполагается, что гипометилирование рДНК, вызванное неблагоприятными внутриутробными условиями увеличивает базовый уровень транскрипции рДНК в клетках взрослого организма, что приводит к последствиям, описанным выше, таким как усиленному потреблению энергии и дестабилизации генома.

Связь между транскрипцией рДНК и ожирением описана на мышинной модели ожирения, вызванного потреблением богатой жирами пищи [46]. Было показано, что у мышей, страдающих от ожирения, по сравнению с контрольными мышами ядрышковый репрессор транскрипции NML был сильнее связан с рДНК. Чтобы изучить связь между ожирением и транскрипцией рДНК, исследователи убрали ген NML. Как и ожидалось, у мышей, лишенных NML, уровень экспрессии рДНК был выше, а концентрация АТФ в клетке понижена. Более того, накопление жира у мутантных мышей было значительно снижено по сравнению с мышами дикого типа. Авторы исследования предположили, что при ожирении NML-опосредованное подавление экспрессии рДНК высвобождает энергию, которая запасается в виде жира. Описанные наблюдения указывают на то, что транскрипция рДНК и развитие ожирения связаны через интенсивность экспрессии рДНК. Интересно было бы посмотреть, как поведут себя мутанты по NML в модели внутриутробного программирования, описанной выше.

РАК

Изменения в рДНК выявляются во многих типах рака как изменения в морфологии ядрышка и повышение уровня транскрипции рРНК и биогенеза рибосом [47–49]. В злокачественных клетках повышены размер и/или количество ядрышек, что служит индикатором активной пролиферации клеток – процесса, который служит диагностическим маркером в некоторых видах рака [50]. Не удивительно, что транскрипция рДНК и биогенез рибосом вошли в список процессов, которые могут быть мишенями потенциальных противоопухолевых препаратов [51, 52].

Как отмечалось выше, эпигенетика рДНК сравнительно плохо изучена, так как почти всегда исключается из анализа в полногеномных эпигенетических исследованиях, поскольку она представляет из себя повторы, которые невозможно локализовать в описанном геноме. Тем не менее, в раковых клетках профили метилирования рДНК изменены, что согласуется с изменениями в экспрессии рДНК. Однако изменения характерны не для всех типов опухолей. В некоторых опухолях повышение экспрессии рДНК ассоциировано с гипометилированием промотора рДНК [53], в то время как в других подобной связи не выявляется [54], то есть промотор рДНК, экспрессирующейся на повышенном уровне в определенном типе рака, не гипометилирован.

Повреждения ДНК, в том числе точечные мутации и хромосомные перестройки небольшого и крупного масштаба, способствуют патогенезу опухоли. В соответствии с предполагаемой ролью рДНК в поддержании стабильности генома, в некоторых видах рака количество повторов рДНК сокращено [30, 31], что коррелирует с повышенным накоплением повреждений в геномной ДНК. Причинно-следственная связь между этими явлениями пока не установлена.

СТАРЕНИЕ

Старение определяют как постепенную утрату функций органами организма и увеличение вероятности смерти с возрастом. Старение это главный фактор риска для многих заболеваний, включая рак. Например, средний возраст пациентов, у которых диагностируют рак, составляет 66 лет по данным Национального института рака (англ. National Cancer Institute), США. Неудивительно, что исследователи во многих лабораториях пытались установить роль рДНК в процессе старения. В 1970-х годах в лаборатории Стрелера (англ. Strehler) было показано, что во время старения в постмитотических тканях животных происходит утрата генов рРНК [55]. Однако этот результат никогда не был воспроизведен в других лабораториях. В 1990-х годах в лаборатории Гуаренете было показано, что появление и накопление внехромосомных колец из рДНК является первопричиной старения у дрожжей [56]. Это открытие вернуло интерес к рДНК в сфере исследований старения. С тех пор, однако, у других видов не удалось обнаружить накопление внехромосомных колец рДНК при старении, и энтузиазм сошел на нет.

Более поздние исследования показывают, что рДНК все же может играть роль и в старении организмов, отличных от дрожжей. Во-первых, уровень метилирования рДНК постепенно меняется с возрастом, и этот показатель может быть использован для определения возраста

образца ДНК у животных и человека. Однако, хотя это явление и можно использовать в качестве часов, изменения в метилировании ДНК не свидетельствуют о том, что рДНК играет какую-то роль в прогрессах старения. Во-вторых, в исследованиях на *C. elegans* было установлено, что основные способы увеличения продолжительности жизни у этого животного, такие как снижение количества калорий в питании и мутации в факторах передачи сигнала от питательных веществ в ядро, ингибируют функционирование ядрышка [58]. Авторы исследования показали, что размер ядрышка обратно связан с долголетием и что молодые животные, у которых маленькие ядрышки, живут дольше, чем их сверстники с крупными ядрышками. Все ранее описанные мутации, увеличивающие продолжительность жизни у *C. elegans*, такие как *eat-2*, *daf-2*, *glp-1*, *isp-1* и нокаун TOR, приводят к уменьшению размера ядрышка и сокращению продукции рРНК и рибосом. Важно отметить, что мутации, затрагивающие фибрилларин (FIB-1, метилтрансфераза, участвующая в процессинге и модификациях пре-рРНК, один из главных функциональных компонентов ядрышка), приводят к уменьшению размеров ядрышка и увеличению продолжительности жизни, что указывает на функциональную роль рДНК в процессах старения. Более того, малый размер ядрышка связан с долголетием и у других организмов, включая дрозофилу, мышь и человека [58]. Интересно, что у старых людей, которые ограничивают потребление калорий и умеренно занимаются физическими упражнениями, ядрышки меньше, чем у людей из контрольной группы того же возраста, которые не ограничивают себя в пище и не занимаются физкультурой. В-третьих, мутации, которые у человека вызывают ускоренное старение, синдром прогерии Хатчинсона–Гилфорда (англ. Hutchinson–Gilford Progeria syndrome, HGPS), также нарушают функционирование рДНК [59]. В клетках пациентов с HGPS промотор рДНК гипометилирован, ядрышки увеличены и образуется повышенное количество пре-рРНК, что приводит к повышению производства зрелых 18S и 28S рРНК, что, в свою очередь, связано с усиленной трансляцией. Все перечисленные наблюдения свидетельствуют о том, что интенсивность экспрессии рДНК влияет на скорость старения и что, в отличие от дрожжей, у млекопитающих нет перестроек рДНК, которые накапливаются с возрастом и способствуют старению. Если быстрая экспрессия рДНК ускоряет старение, то для того, чтобы прожить долгую и здоровую жизнь, неплохо бы замедлить скорость транскрипции рДНК и прижать трансляцию.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие исследования указывают на то, что функции рДНК не ограничиваются канонической ролью в образовании рРНК. К числу неканонических функций рДНК можно отнести поддержание стабильности генома и регуляцию разных генов через непосредственный физический контакт рДНК с ними. Означает ли это, что у эукариот рДНК стала выполнять дополнительные функции, которых нет у бактерий? Необязательно. С точки зрения «фермера», в ходе эволюционного перехода к эукариотам рДНК не приобрела новых функций. Скорее ключевым изменением, произошедшим во время этого перехода, стало появление гистонов и других белков хроматина, которые упаковывают ДНК и благодаря которым длинные молекулы ДНК стало возможным втиснуть в маленькое пространство клеточного ядра. Вследствие этого у РНК-полимеразы I появилось больше топологических препятствий во время транскрипции, из-за чего возросла вероятность появления повреждений (разрывов) в ДНК. Как следствие, после интенсивной транскрипции Pol I поврежденная ДНК привлекает специальные белковые факторы, осуществляющие репарацию повреждений, которые на время переводят матрицу в молчащее состояние, подобно истощенному участку земли, который фермер оставляет в покое на некоторое время и не засеивает вновь. Поскольку участки гетерохроматина склонны слипаться друг с другом, крупные домены молчащей рДНК могут агрегировать с другими участками генома, также находящимися в молчащем состоянии, и регулировать экспрессию ассоциированных генов, поддерживая их «молчание». В этой модели поступление снаружи питательных веществ и другие сигналы ускоряют транскрипцию рДНК и уменьшают время для репарации поврежденных копий генов рРНК, тем самым вызывая накопление мутаций в ДНК. Сокращение размеров доменов молчащей рДНК, вызванное активной транскрипцией, приводит к дерепрессии тех генов, которые в норме располагаются в околосдрышковом гетерохроматине, который и поддерживает их молчание. Накопление мутаций в ДНК и нарушения в регуляции экспрессии генов могут способствовать возникновению и патогенезу заболеваний у человека и ускорять старение. К счастью, большинство из описанных изменений, затрагивающих рДНК, обусловлены обратимыми эпигенетическими механизмами, которые могут быть мишенью для малых молекул – возможных препаратов для лечения болезней и замедления старения.

ПОСТСКРИПТУМ

Я выражаю благодарность Льву Овчинникову, моему учителю и наставнику, который привил мне интерес к рибосомам и молекулярной биологии в целом. Я счастлив, что начал свою карьеру в его лаборатории, атмосфера которой соответствовала высочайшим академическим стандартам и при этом давала широкий простор для самостоятельного выбора.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Елизавете Мининой за неоценимую помощь в подготовке русскоязычной версии манускрипта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Long, E.O. and Dawid, I.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, **49**, 727–764.
2. Henderson, A.S., Warburton, D. and Atwood, K.C. (1972) Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **69**, 3394–3398.
3. van Sluis, M., Gailin, M.O., McCarter, J.G.W., Mangan, H., Grob, A. and McStay, B. (2019) Human NORs, comprising rDNA arrays and functionally conserved distal elements, are located within dynamic chromosomal regions. *Genes & Development*, **33**, 1688–1701.
4. Heliot, L., Mongelard, F., Klein, C., O'Donohue, M.F., Chassery, J.M., Robert-Nicoud, M. and Usson, Y. (2000) Nonrandom distribution of metaphase AgNOR staining patterns on human acrocentric chromosomes. *J Histochem Cytochem*, **48**, 13–20.
5. Sullivan, G.J., Bridger, J.M., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Bickmore, W.A. and McStay, B. (2001) Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *The EMBO Journal*, **20**, 2867–2874.
6. Kurihara, Y., Suh, D.S., Suzuki, H. and Moriwaki, K. (1994) Chromosomal locations of Ag-NORs and clusters of ribosomal DNA in laboratory strains of mice. *Mamm Genome*, **5**, 225–228.
7. Caburet, S., Conti, C., Schurra, C., Lebofsky, R., Edelstein, S.J. and Ben-simon, A. (2005) Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Res*, **15**, 1079–1085.
8. Kobayashi, T. (2014) Ribosomal RNA gene repeats, their stability and cellular senescence. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **90**, 119–129.
9. Audas, T.E., Jacob, M.D. and Lee, S. (2012) Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA. *Molecular Cell*, **45**, 147–157.
10. Schmitz, K.M., Mayer, C., Postepska, A. and Grummt, I. (2010) Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes & Development*, **24**, 2264–2269.
11. Zentner, G.E., Saiakhova, A., Man-naenkov, P., Adams, M.D. and Sca-cheri, P.C. (2011) Integrative genomic analysis of human ribosomal

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

- DNA. *Nucleic Acids Research*, **39**, 4949–4960.
12. Nogi, Y., Yano, R. and Nomura, M. (1991) Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **88**, 3962–3966.
 13. Parks, M.M., Kurylo, C.M., Dass, R.A., Bojmar, L., Lyden, D., Vincent, C.T. and Blanchard, S.C. (2018) Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. *Science Advances*, **4**, eaao0665.
 14. O'Sullivan, A.C., Sullivan, G.J. and McStay, B. (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 657–668.
 15. Chen, D., Belmont, A.S. and Huang, S. (2004) Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **101**, 15106–15111.
 16. Sanij, E., Poortinga, G., Sharkey, K., Hung, S., Holloway, T.P., Quin, J., Robb, E., Wong, L.H., Thomas, W.G., Stefanovsky, V. *et al.* (2008) UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *Journal of Cell Biology*, **183**, 1259–1274.
 17. Russell, J. and Zomerdijk, J.C. (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends in Biochemical Sciences*, **30**, 87–96.
 18. Blattner, C., Jennebach, S., Herzog, F., Mayer, A., Cheung, A.C., Witte, G., Lorenzen, K., Hopfner, K.P., Heck, A.J., Aebersold, R. *et al.* (2011) Molecular basis of Rrn3-regulated RNA polymerase I initiation and cell growth. *Genes & Development*, **25**, 2093–2105.
 19. Grummt, I. and Voit, R. (2010) Linking rDNA transcription to the cellular energy supply. *Cell Cycle*, **9**, 225–226.
 20. Santoro, R. and Grummt, I. (2001) Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription. *Molecular Cell*, **8**, 719–725.
 21. Santoro, R., Li, J. and Grummt, I. (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nature Genetics*, **32**, 393–396.
 22. Strohner, R., Nemeth, A., Jansa, P., Hofmann-Rohrer, U., Santoro, R., Langst, G. and Grummt, I. (2001) NoRC - a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *The EMBO Journal*, **20**, 4892–4900.
 23. Zhou, Y., Santoro, R. and Grummt, I. (2002) The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *The EMBO Journal*, **21**, 4632–4640.
 24. Leone, S., Bar, D., Slabber, C.F., Dalcher, D. and Santoro, R. (2017) The RNA helicase DHX9 establishes nucleolar heterochromatin, and this activity is required for embryonic stem cell differentiation. *EMBO Reports*, **18**, 1248–1262.
 25. Mayer, C., Schmitz, K.M., Li, J., Grummt, I. and Santoro, R. (2006) Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Molecular Cell*, **22**, 351–361.
 26. Savic, N., Bar, D., Leone, S., Frommel, S.C., Weber, F.A., Vollenweider, E., Ferrari, E., Ziegler, U., Kaech, A., Shakhova, O. *et al.* (2014) lncRNA maturation to initiate heterochromatin formation in the nucleolus is required for exit from pluripotency in ESCs. *Cell Stem Cell*, **15**, 720–734.
 27. Guetg, C., Scheifele, F., Rosenthal, F., Hottiger, M.O. and Santoro, R. (2012) Inheritance of silent rDNA

- chromatin is mediated by PARP1 via noncoding RNA. *Molecular Cell*, **45**, 790–800.
28. Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H. and Kobayashi, T. (2010) Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science*, **327**, 693–696.
29. Stochaj, U. and Weber, S.C. (2020) Nucleolar Organization and Functions in Health and Disease. *Cells*, **9**, 526.
30. Udugama, M., Sanij, E., Voon, H.P.J., Son, J., Hii, L., Henson, J.D., Chan, F.L., Chang, F.T.M., Liu, Y., Pearson, R.B. *et al.* (2018) Ribosomal DNA copy loss and repeat instability in ATRX-mutated cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **115**, 4737–4742.
31. Xu, B., Li, H., Perry, J.M., Singh, V.P., Unruh, J., Yu, Z., Zakari, M., McDowell, W., Li, L. and Gerton, J.L. (2017) Ribosomal DNA copy number loss and sequence variation in cancer. *PLOS Genetics*, **13**, e1006771.
32. Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2006) A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*, **312**, 1798–1802.
33. Kim, N. and Jinks-Robertson, S. (2012) Transcription as a source of genome instability. *Nature Reviews Genetics*, **13**, 204–214.
34. Desai, R.V., Chen, X., Martin, B., Chaturvedi, S., Hwang, D.W., Li, W., Yu, C., Ding, S., Thomson, M., Singer, R.H. *et al.* (2021) A DNA repair pathway can regulate transcriptional noise to promote cell fate transitions. *Science*, **373**, 870.
35. Paredes, S. and Maggert, K.A. (2009) Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **106**, 17829–17834.
36. Zhang, L.F., Huynh, K.D. and Lee, J.T. (2007) Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell*, **129**, 693–706.
37. Feinberg, A.P. (2014) The nucleolus gets the silent treatment. *Cell Stem Cell*, **15**, 675–676.
38. Yu, S. and Lemos, B. (2016) A Portrait of Ribosomal DNA Contacts with Hi-C Reveals 5S and 45S rDNA Anchoring Points in the Folded Human Genome. *Genome Biology and Evolution*, **8**, 3545–3558.
39. Warner, J.R. (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**, 437–440.
40. Barker, D.J. and Clark, P.M. (1997) Fetal undernutrition and disease in later life. *Reviews of Reproduction*, **2**, 105–112.
41. Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Ravelli, A.C., Osmond, C., Barker, D.J. and Bleker, O.P. (2001) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **185**, 93–98.
42. Barker, D.J. (1992) The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. *Proceedings of the Nutrition Society*, **51**, 135–144.
43. Denisenko, O., Lin, B., Louey, S., Thornburg, K., Bomsztyk, K. and Bagby, S. (2011) Maternal malnutrition and placental insufficiency induce global downregulation of gene expression in fetal kidneys. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, **2**, 124–133.
44. Denisenko, O., Lucas, E.S., Sun, C., Watkins, A.J., Mar, D., Bomsztyk, K. and Fleming, T.P. (2016) Regulation of ribosomal RNA expression across the lifespan is fine-tuned by maternal diet before implantation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1859**, 906–913.

45. Holland, M.L., Lowe, R., Caton, P.W., Gemma, C., Carbajosa, G., Danson, A.F., Carpenter, A.A., Loche, E., Ozanne, S.E. and Rakyan, V.K. (2016) Early-life nutrition modulates the epigenetic state of specific rDNA genetic variants in mice. *Science*, **353**, 495–498.
46. Oie, S., Matsuzaki, K., Yokoyama, W., Tokunaga, S., Waku, T., Han, S.I., Iwasaki, N., Mikogai, A., Yasuzawa-Tanaka, K., Kishimoto, H. *et al.* (2014) Hepatic rRNA transcription regulates high-fat-diet-induced obesity. *Cell Reports*, **7**, 807–820.
47. Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Govoni, M., Sirri, V. and Chieco, P. (2000) Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *The Journal of Pathology*, **191**, 181–186.
48. Hein, N., Hannan, K.M., George, A.J., Sanij, E. and Hannan, R.D. (2013) The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, **19**, 643–654.
49. Montanaro, L., Trere, D. and Derenzini, M. (2013) The emerging role of RNA polymerase I transcription machinery in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and Therapy*, **6**, 909–916.
50. Derenzini, M., Montanaro, L. and Trere, D. (2009) What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology*, **54**, 753–762.
51. Bywater, M.J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Wall, M., Cluse, L., Drygin, D., Anderes, K. *et al.* (2012) Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell*, **22**, 51–65.
52. Drygin, D., Rice, W.G. and Grummt, I. (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **50**, 131–156.
53. Shao, F., Liu, X., Zhang, X., Wang, Q. and Wang, W. (2021) Methylation of 45S Ribosomal DNA (rDNA) Is Associated with Cancer and Aging in Humans. *International Journal of Genomics*, **2021**, 8818007.
54. Uemura, M., Zheng, Q., Koh, C.M., Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S. and De Marzo, A.M. (2012) Overexpression of ribosomal RNA in prostate cancer is common but not linked to rDNA promoter hypomethylation. *Oncogene*, **31**, 1254–1263.
55. Johnson, R. and Strehler, B.L. (1972) Loss of genes coding for ribosomal RNA in ageing brain cells. *Nature*, **240**, 412–414.
56. Sinclair, D.A. and Guarente, L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles – a cause of aging in yeast. *Cell*, **91**, 1033–1042.
57. Wang, M. and Lemos, B. (2019) Ribosomal DNA harbors an evolutionarily conserved clock of biological aging. *Genome Research*, **29**, 325–333.
58. Tiku, V., Jain, C., Raz, Y., Nakamura, S., Heestand, B., Liu, W., Späth, M., Suchiman, H.E.D., Müller, R.U., Slagboom, P.E. *et al.* (2017) Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nature Communications*, **8**, 16083.
59. Buchwalter, A. and Hetzer, M.W. (2017) Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nature Communications*, **8**, 328.