

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

академик НАН РК *БЕРСИМБАЙ Р.І.***Современное состояние и тенденции развития мировой и отечественной науки.**

Выдающиеся достижения последних десятилетий и стремительные темпы развития *современной генетики* дали исключительно важную информацию не только для понимания фундаментальных основ жизни, но и быстро нашли практическое применение в фармакологии и медицине, сельском хозяйстве и экологии. Осуществление крупномасштабных проектов по секвенированию геномов человека, животных, растений, бактерий и вирусов привело к лавинообразному росту объема информации о нуклеотидных последовательностях, открытию новых генов и регуляторных последовательностей, появлению принципиально новых технологий на основе знания геномов (ПЦР-диагностика, геномная дактилоскопия, ДНК- и РНК-микрочипы, молекулярно-генетическая паспортизация ценных сортов растений, пород животных, штаммов микроорганизмов и вирусов и др.). Сейчас существуют десятки мощных баз данных, в которых аккумулирована гигантская информация о структуре не только генома человека, но и геномов около тысячи низших и высших организмов и вирусов [1-4].

Многие достижения генетики тесно связаны с использованием методов и подходов генетической инженерии. *Генетическая инженерия* значительно расширила экспериментальные границы *молекулярной биологии*, поскольку позволила вводить в различные типы клеток чужеродную ДНК и исследовать ее функционирование в гетерологичном окружении. Это дало возможность выявлять общебиологические закономерности организации и выражения генетической информации в различных организмах. Данный подход открыл перспективы создания принципиально новых микробных продуцентов биологически активных веществ, а также животных и растений, несущих функционально активные чужеродные гены. С разработкой методов молекулярного клонирования и изучением на их основе структуры и функции многих эукариотических генов удалось выявить новые неожиданные особенности строения эукариотических генов и

их регуляции. Сегодня практически мы уже полагаем полной последовательностью человеческого генома и имеем потенциальный доступ к каждому из генов.

В данном обзоре рассмотрены научные достижения, которые вывели генетику на современной уровень и обсуждены некоторые развивающиеся геномные технологии в медицине, которые уже сейчас имеют практическое применение и могут обеспечить в будущем новые прорывы.

РНК-интерференция. Использование РНКі в фундаментальной науке.

В настоящее время установлено, что в регуляции экспрессии генов у эукариот исключительно важную биологическую роль играет **РНК интерференция** (RNA interference, РНКі). Открытие РНКі и ее дальнейшее изучение на протяжении последних 10 лет привело к революции в биологии вообще, и в молекулярной генетике, в частности [5].

С открытием РНК-интерференции стало ясно, что этот феномен может иметь не только теоретическое, но и огромное практическое значение, поскольку создает специфическое временное подавление экспрессии гена – knockdown-эффект – без изменения структуры ДНК. Оказалось, что использование подходов и методов РНК-интерференции, идентификация молекулярных мишеней при фармакологическом скрининге новых теоретических соединений играет ключевую роль не только в определении стратегии лечения многих социально-значимых заболеваний человека, но и в понимании общего патогенеза заболевания [6,7].

Суть РНК-интерференции заключается в разрушении молекул РНК, несущих информацию о структуре гена, после присоединения к ним малых комплементарных РНК, циркулирующих в цитоплазме клетки. Клеточный механизм РНК-интерференции был, очевидно, выработан в процессе эволюции в большинстве эукариотических клеток в качестве превентивного средства защиты от РНК-содержащих вирусов.

Изначальным и пусковым механизмом в РНКi, изначально известной как пост-транскрипционное молчание генов (post-transcriptional gene silencing, PTGS) в растениях, является генерация/синтез длинных двухцепочечных молекул РНК (дцРНК). Как следующий функциональный шаг РНКi включает в себя действие ферментов Dicer. Этот фермент является эндонуклеазой семейства РНКазы III, специфичной в отношении дцРНК. Dicer катализирует образование коротких интерферирующих РНК (short interfering RNAs, siРНК) или микро РНК (microРНК, miРНК) 20-30 нуклеотидов (нт) длиной с 2 нт липкими 3'-концами и свободным фосфатом на 5'-конце. Данные небольшие молекулы РНК могут образовываться в результате энзиматического гидролиза длинных репликативных форм вирусных РНК, а также трансгенов и транспозонов. У млекопитающих дцРНК в клетке вызывает интерфероновый ответ, поэтому активация РНКi осуществляется с помощью siРНК. Dicer образует комплекс с РНК-связывающими белками TRBP (TAR-RNA binding protein, TAR-лидерная РНК вируса иммунодефицита человека типа 1), PACT и Ago [8,9].

В случае с вирусами растений, siРНК могут образовываться непосредственно из вирусного генома, однако последние доказательства указывают также на участие РНК-зависимых РНК полимераз (RNA dependent RNA polymerases, RDRP) в амплификации данных ключевых РНК молекул. Многократная амплификация siРНК при помощи RDRP отчасти обеспечивает логическое объяснение высокой эффективности РНКi в живых организмах [10,11]. В последующем шаге РНКi, двухцепочечные siРНК расплетаются, и одна из цепей встраивается в многокомпонентный эффекторный комплекс (RNA-induced silencing complex, RISC). Включаясь в RISC, siРНК функционирует в качестве «поисковой матрицы» для распознавания комплементарных нуклеотидных последовательностей специфических транскриптов с их последующим ферментативным гидролизом или трансляционной репрессией [8,10,11]. Комплементарное спаривание между нуклеотидами siРНК и заданной РНК обеспечивает эффективное и высокоспецифичное обнаружение нужной цели. Экспериментальные данные дают основание полагать, что siРНК и белки семейства Argonaute (Ago) представляют

универсальные компоненты RISC [12]. Ago-белки характеризуются наличием специфических консервативных доменов, которые носят название PAZ и PIWI [13]. Структурные исследования показали, что PAZ-домен в Ago напрямую взаимодействует с siРНК [14]. Более того, было установлено, что PAZ-домен взаимодействует с 3'-концами siРНК. PIWI-домен в Ago-белках представляет собой ключевой каталитический центр, так как он обладает эндонуклеазной активностью. После связывания двухцепочечной siРНК с комплексом RISC при участии Ago-2 идет АТФ-зависимое расщепление и удаление из комплекса так называемой «пассажирской цепи» (“passenger” strand). В результате активированный комплекс содержит одноцепочечную «молекулу-гид» (guide), которая определяет специфичность узнавания последовательности на мРНК-мишени за счет комплементарного взаимодействия между основаниями [5-8].

Несмотря на то, что два типа малых РНК-эффекторов каскада имеют разное происхождение (siРНК образуются из дцРНК, а miРНК из оцРНК, содержащих шпильки), у млекопитающих они загружаются в один и тот же RISC. Отличие заключается в том, что в случае miРНК выбор цепей происходит без расщепления сопровождающей цепи, так как комплементарность между гидовой и сопровождающей цепями в дуплексе miРНК неполная, что препятствует его расщеплению с помощью Ago-2. Недавно показано, что белок Ago-2 содержит «кеп»-связывающий домен, который препятствует связыванию фактора инициации трансляции eIF4E с мРНК и, следовательно, подавляет инициацию трансляции [15].

Неполная комплементарность между miРНК и целевой последовательностью в мРНК и/или связывание miРНК с каталитически неактивным белком Argonaute приводит к репрессии инициации трансляции и/или ускорению деградации мРНК-мишени. Третьим механизмом, с помощью которого малые РНК подавляют экспрессию генов, является транскрипционный генный сайленсинг. В этом случае регуляция экспрессии генов осуществляется путем ремоделирования хроматина [16]. В клетках млекопитающих транскрипционный генный сайленсинг и последующее метилирование хроматина происходит в ответ на введение экзогенных siРНК, комплементарных генным промоторам [17,18].

Установлено, что РНКi также является защитным молекулярно-иммунным механизмом, направленным против вирусных заболеваний. В ответ на действие РНКi, вирусы выработали специфические стратегии для противодействия молекулярному механизму иммунной устойчивости растений. Наиболее эффективной и действенной контрмерой против РНКi является вирусная супрессия молекулярного иммунного механизма. Для этого многие вирусы кодируют специфические белки-супрессоры (viral suppressors of RNAi, VSR), которые способны эффективно блокировать РНКi. Экспрессия VSR вирусами для противодействия защитной системе растений выдвигает вполне резонное предположение, что изначальной функцией РНКi в растениях было противодействие вирусным патогенам [19,20].

К настоящему моменту обнаружено множество вирусных белков, которые обладают супрессорной активностью. Последние молекулярные, биохимические и структурные исследования различных VSR позволили детально рассмотреть механизмы супрессии РНКi. Общим свойством всех вирусных супрессоров является их способность противодействовать защитной системе РНКi на различных ее этапах.

Антивирусная РНКi инициируется с генерации коротких интерферирующих siРНК, которые используются в последующем распознавании и деградации вирусных молекул РНК. В ответ на защитную реакцию растений, большинство вирусов кодируют специфические белки, способные противодействовать РНКi, и данный процесс общеизвестен как супрессия РНКi. Вирусные супрессоры действуют на различных этапах РНКi и обладают биохимическими свойствами, которые позволяют им эффективно противодействовать защитной системе растений. Современные молекулярные и биохимические исследования нескольких вирусных супрессоров значительно расширили наше понимание сложной природы супрессии РНКi, а также заметно расширили наше понимание всей сложности взаимодействия между вирусами и растениями.

Прикладное использование достижений геномной технологии. РНК-интерференция, рибозимы и антисмысловые олигонуклеотиды.

Технологии рекомбинантной ДНК и геномики

активно используются в различных областях медицины. Сегодня с помощью ДНК технологий можно манипулировать с генами практически любых интересующих нас организмов.

Как известно, причина большинства хронических заболеваний человека – недостаточное или избыточное производство того или иного белка в клетке. С генетической точки зрения, стратегия лечения заболеваний, связанных с недостаточным уровнем белка, предусматривает коррекцию уровня его синтеза либо путем прямого введения этого белка в организм, как, например, инсулина, либо восстановления экспрессии поврежденного гена с помощью метода *генной терапии*. Для подавления избыточного производства белка, в основном, используют широкий спектр фармпрепаратов, однако постепенно внедряются и *ген-специфические технологии антисмысловой терапии*.

В настоящее время известно три варианта антисмысловых технологий: *РНК-интерференция, рибозимы и антисмысловые олигонуклеотиды*. Несмотря на различные механизмы работы, их всех объединяет общий принцип: антисмысловый препарат работает после связывания с РНК-мишенью с образованием дуплекса. Все три варианта сегодня активно используются в экспериментах *in vivo*.

Рибозимы впервые были открыты в 1982 г. Томасом Чек при исследовании сплайсинга РНК у реснитчатого простейшего *Tetrahymena thermophila* [21], который обнаружил каталитические свойства РНК. Оказалось, что РНК может катализировать разрезание и сплайсинг самой себя, в результате чего из нее выщепляется небольшой фрагмент. Так как ферментативные свойства проявляла молекула РНК, то ее назвали “рибозим” (от англ. RIBOnucleic enZYME, ribozyme). В 1989 г. за “обнаружение каталитических свойств РНК” Чек и Альтман получили Нобелевскую премию. С тех пор описано множество рибозимов, катализирующих различные реакции и имеющих реальное практическое применение. Среди них есть рибозимы, осуществляющие реакции аминокислотирования РНК, формирования амидной, пептидной и гликозидной связей, алкилирования РНК, фосфорилирования, полимеризации и многие другие [22].

После открытия природных рибозимов были предприняты попытки создания искусственных

активных молекул РНК. Широкую известность получил так называемый “метод молекулярной селекции”, использование которого позволило отобрать множество рибозимов, катализирующих различные реакции, и положило начало их практическому применению [23]. Наибольший интерес привлекали рибозимы, расщепляющие РНК. Наряду с поиском природных и конструированием подобных им искусственных рибозимов, ученые стали уходить от встречающихся в природе вторичных структур каталитических РНК, пытаясь получить нуклеиновые кислоты, обладающие заданными свойствами при иной вторичной структуре [24, 25].

Несмотря на широкое использование различных вариантов рибозимов в экспериментах *in vivo*, успехи практического применения технологии рибозимов на сегодняшний день невелики. Но разработки в этой области ведутся активно, предлагая новые перспективные варианты каталитических нуклеиновых кислот [23-27].

Первые эксперименты по подавлению экспрессии генов с использованием антисмысловой технологии проведены более 30 лет назад. Бурный расцвет технологии **антисмысловых олигонуклеотидов** (АСОН) пришелся на 80-90-е годы. Было показано, что после проникновения в клетку антисмысловой олигонуклеотид гибридуется на мРНК-мишени или геномной ДНК, что может привести к разрушению ДНК и/или подавлению транскрипции, сплайсинга, трансляции. Создав стерическое препятствие для движения белковых комплексов, осуществляющих транскрипцию или трансляцию, или для сборки сплайсинга, можно снизить уровень транскрипции, трансляции или сплайсинга.

Требования к современным АСОН включают следующие условия: 1) устойчивость к деградации нуклеазами; 2) высокое сродство к комплементарной им мРНК; 3) высокая специфичность связывания с комплементарной РНК; 4) способность активировать РНКазу H, разрушающую РНК-цепь в составе АСОН-мРНК дуплекса; 5) эффективность проникновения в клетку; 6) хорошие фармакокинетические и фармакодинамические свойства. По сравнению с традиционными фармакологическими подходами преимущества АСОН стали очевидны: избирательное связывание с внутриклеточными мишенями, устойчивость и длительность действия в клет-

ке (около недели), быстрое проявление эффекта (в течение нескольких часов). Кроме того, АСОН легко подвергаются биодegradации и удаляются из организма, а их синтез прост и доступен.

Необходимо отметить, что до открытия явления РНКi для подавления экспрессии генов использовали метод нокаутирования (*knockout*). При этом исследуемый ген либо делетировали прямо в геноме, либо в него вносили мутации, а затем оценивали эффект отсутствия этого гена на клетку или организм. Этот метод позволил выявить наиболее важные гены, например, такие как гены «домашнего хозяйства», без которых развитие клетки/организма невозможно. В большинстве же случаев полный нокаут гена редко приводит к выраженному изменению фенотипа. Метод РНКi произвел настоящую революцию в области функциональной геномики. Этой технологии по аналогии с нокаутом дали название «нокдаун» (*knockdown*), она проста в использовании и обладает огромным спектром возможностей. Уже разработаны системы, которые способны проводить нокдаун гена, как в отдельных тканях, так и на определенных стадиях развития организма.

На сегодняшний день, по данным miRBase [28], для человека описано 701 miРНК, которые участвуют в регуляции от 1/3 до 1/2 всех генов, причем почти каждая из этих miРНК потенциально может регулировать сотни мишеней. Поэтому неудивительно, что нарушение экспрессии некоторых miРНК приводит к возникновению рака. Причем гены miРНК выступают либо как онкогены, либо как опухолевые супрессоры [29]. Для подавления сверхэкспрессированных miРНК используют комплементарные антисмысловые олигонуклеотиды, получившие название антагомиры. В настоящее время коммерческие компании активно разрабатывают этот подход для использования в лечении различных заболеваний [30,31] и сейчас уже не вызывает сомнений, что генетические методы могут быть основой для разработки новых стратегий создания лекарственных препаратов [32].

Анализ рынка разрабатываемых лекарств показывает, что технология РНК-интерференции в настоящее время широко используется для создания терапевтических препаратов к уже известным мишеням. Сейчас уже близки к завершению исследования в таких областях, как он-

кология, нейродегенеративные заболевания, иммунология [32,33]. По подсчетам экспертов объем средств, вкладываемых в этот сектор медицины, к 2012 г. достигнет 580 млн. долларов [34].

Выше мы отмечали, что крупномасштабные проекты по секвенированию геномов человека, животных, растений, бактерий и вирусов привели к лавинообразному росту объема информации о нуклеотидных последовательностях, открытию новых генов и регуляторных последовательностей, появлению принципиально новых технологий на основе знания геномов. Результаты, полученные в постгеномную эру биологических исследований, можно сгруппировать [35] следующим образом:

в **фундаментальных** исследованиях – идентификация всех генов; установление карты тканеспецифичности их экспрессии; построение глобальной регуляторной карты генома; классификация генов по биохимическим функциям их продуктов; идентификация всех потенциальных белков и доменов; анализ распределения полиморфизма и мутаций; определение эволюционных и популяционных взаимосвязей; создание коллекции генетического материала и мн.др.;

в **прикладных** направлениях: геновая терапия; фармакогеномика; эндогенные биорегуляторы, вакцины нового поколения, диагностика предрасположенности к болезням; геномная диагностика болезней; идентификация генетических признаков пород и сортов для селекции; животные с улучшенными свойствами на основе рационально направленного изменения геномов; использование новых технологий для развития производства пищевых продуктов; использование геномных технологий для контроля и улучшения экологической ситуации.

Сегодня наряду с методами классической (“прямой”) генетики, направляющими логическую цепочку исследования от фенотипа к гену, используется и противоположный путь – от генома (гена) к фенотипу, получившей название “обратной генетики”. Это название обусловлено тем, что определение функций гена в терминах “обратной генетики” происходит в направлении, противоположном подходам классической генетики. “Обратная генетика” основывается на поиске неизвестного фенотипа, кодируемого геном с уже известной нуклеотидной последовательностью. При этом как в методах прямой, так и об-

ратной генетики основная задача состоит в поиске нового фенотипа, появляющегося вследствие изменения или нарушения функции конкретного гена. Различия состоят в том, что знание нуклеотидной последовательности в методах обратной генетики позволяет легко модифицировать структуру гена, изменять или полностью исключать его экспрессию. Методы обратной генетики сейчас применяются, как правило, в исследованиях на моделях различных заболеваний человека и являются первым этапом создания новых терапевтических препаратов. Подытоживая изложенное выше, сегодня можно с уверенностью утверждать, что достижения современной молекулярной генетики активно используются в различных прикладных областях, и особенно ярко прогресс в научных исследованиях проявляется в медицине.

Исследования в области функциональной организации и направленной модификации хромосом эукариот. Искусственные хромосомы.

Разработка технологий получения клеток, тканей и, в конечном итоге, целых организмов с заданными свойствами является одной из приоритетных целей современной биологии. Среди множества подходов, направленных на реализацию этой цели, к весьма перспективным относятся исследования как по *анализу и моделированию отдельных структур хромосом*, так и, в более общем виде, по *направленной (искусственной) модификации целых хромосом*.

Идея преднамеренной модификации хромосом у эукариот далеко не нова и используется уже многие десятилетия. Как правило, для этого применяют гамма-облучение, приводящее к многочисленным разрывам хромосом, что, помимо желаемого результата, часто приводит к накоплению мутации и гибели организма. Кроме того, в экспериментах такого рода всевозможное разнообразие признаков ограничено составом генома, что не позволяет целенаправленно создать принципиально новые свойства для организма.

Разработка методов *трансгенеза*, особенно с применением различных *сайт-специфичных систем рекомбинации*, открыла новые возможности по созданию организмов с новыми признаками. Сайт-специфичные системы рекомбинации или интеграции, которые в последнее время ши-

роко используются в молекулярной генетике, часто просто незаменимы при изучении структуры и функций хромосом и особенностей регуляции конкретных генов. Наиболее широко применяются системы рекомбинации Cre/loxP бактериофага P1 и FLP/FRT 2 мкм-плазмиды дрожжей, а также интегразу бактериофага phiC31. Использование систем основано на способности рекомбиназ, дрожжевой FLP (flipase) и фаговой Cre (causes recombination), с высокой специфичностью узнавать короткие, в несколько десятков пар нуклеотидов, однонаправленные последовательности-мишени, FRT (FLP recombination target) и loxP, соответственно, а затем проводить по ним обратимую гомологичную рекомбинацию (процессы вырезания-встраивания). При этом процесс, как правило, сдвинут в сторону удаления (вырезания) расположенных между ними последовательностей и формирования кольцевой молекулы ДНК с одной копией сайта-мишени, FRT или loxP. Интегразу phiC31 специфично узнает сайты attP и attB и необратимо проводит по ним рекомбинацию молекул ДНК.

Известно, что все эти системы высокоспецифичны и активны в гетерологичных системах, что с успехом используется в многочисленных молекулярно-генетических исследованиях на растениях и животных [36-38].

Однако часто взаимное влияние генетического окружения и внедренных генов в составе конструкта вызывает негативный эффект на организм. Во многом снять эти проблемы позволит получение и использование **искусственных хромосом (ИХ)**.

Под ИХ понимают, как правило, незначительные по размерам хромосомы, содержащие целенаправленно подбираемые гены или наборы генов и такие функционально необходимые элементы хромосом как центромеры, теломеры и сайты инициации репликации ДНК, определяющие основные свойства природных хромосом – корректную репликацию и разделение в дочерних клетках.

Известно два способа получения ИХ: **образование хромосом de novo и манипуляции с эндогенными хромосомами**. *Первый способ* основан на использовании искусственных бактериальных или дрожжевых хромосом (BAC и YAC), содержащих маркерные гены и ДНК альфа-повторов человека, которые, как это показа-

но ранее, связывают центромерные белки и способствуют эффективной и устойчивой репликации и сегрегации ИХ. *Второй способ* связан либо с использованием нативно существующих микрочромосом, либо с получением микрочромосом через формирование нецентромер, случайное или направленное внедрение в состав исходных хромосом теломерных последовательностей с последующей фрагментацией модифицированных хромосом радиацией [39,40].

Решение теоретических и технических проблем по созданию, поддержанию и переносу ИХ позволило бы решать широчайший круг задач в медицине, фармакологии и сельском хозяйстве. Примером может служить возможность применения ИХ в генотерапии наследственных заболеваний с помощью трансформации стволовых клеток. В отличие от традиционных подходов, которые основаны на встраивании генов-мишеней в геном реципиента, использование ИХ может значительно снизить риск канцерогенеза. В долгосрочной перспективе ИХ будут являться ключевым звеном при создании синтетических живых систем.

Несмотря на активные исследования последних лет, многие вопросы, касающиеся состава и стабильности ИХ в ряду клеточных делений, особенностей функционирования отдельных элементов (теломер, центромер, репликонов) этих структур до конца не ясны.

Центромеры и теломеры традиционно рассматриваются как специализированные районы хромосом, т.е. занимают некое особое положение. Это объясняется прежде всего тем, что эти районы выполняют крайне важные, но одни и те же функции в хромосомах всех видов эукариот. Центромера ответственна за правильное расхождение хромосом в дочерние клетки в процессе клеточного деления. Теломеры во всех организмах выполняют две фундаментальные функции, которые заключаются в защите концов хромосом от различных вредных воздействий и в поддержании длины и целостности хромосом. Таким образом, две основные характеристики специализированных районов хромосом заключаются: 1) в общих, универсальных функциях, выполняемых этими районами у самых разных видов эукариот и 2) в общих принципах молекулярной организации.

Многочисленные исследования пока не дали ясного ответа на вопрос, какие молекулярные

структуры ответственны за выполнение этих функций и как они их осуществляют, но очевидный прогресс в этом направлении в последние годы достигнут. Установлено, что специализированные районы хромосом представляют собой многокомпонентные ДНК-белковые комплексы. Ярким примером является теломера, которая представляет собой узловую станцию, где переплелись пути и компоненты (гены и белки), вовлеченные в поддержание размеров хромосом, репарацию хромосомных разрывов, передачу сигналов о разрывах. Структура и функции многих белков теломер и центромер достаточно хорошо изучены. Структура ДНК специализированных районов определена у многих видов эукариот. Оказалось, что у подавляющего большинства организмов основным типом последовательностей ДНК, составляющих центромерные и теломерные районы хромосом, являются **тандемно организованные мономеры относительно короткой длины**. Очевидно, что столь короткая последовательность обладает крайне ограниченной кодирующей способностью в первичной структуре. Обнаружение этого удивительно-го факта ставит вопрос: какова роль молекул ДНК – носителей генетической информации – в формировании структуры и функционировании столь важных районов хромосом?

Длинные тяжи, состоящие из огромного числа идентичных мономеров, являются основным классом ДНК не только теломер и центромер, но и прилегающих к ним районов хромосом. Они образуют огромные области генома, не несущие кодирующую информацию для синтеза белков. Какова функция этих районов генома, как происходило их формирование в хромосомах, почему они сохраняются в процессе эволюции? Несмотря на огромное количество исследований, проведенных в течение последних нескольких десятилетий, на все эти вопросы нет определенных ответов.

В результате исследований молекулярной организации геномов различных видов злаков были выявлены многочисленные примеры, указывающие на принципиальные различия в эволюции двух основных типов повторяющейся ДНК, а именно: а) различные классы мобильных элементов изменяются между видами согласно законам “нейтральной эволюции”; б) для тандемно организованных последовательностей ДНК

более характерен “скачкообразный”, взрывной характер изменений.

Хроматин теломерных районов хромосом ржи характеризуется специфической нуклеосомной организацией, характеризующейся более короткими межнуклеосомными линкерами относительно хроматина основной части хромосомы. Теломерные повторы ДНК не всегда организованы как монотонные гомогенные тяжи мономеров, но могут прерываться другими последовательностями ДНК и могут быть рассеяны в виде коротких кластеров. Изучение терминальных участков хромосом показало отсутствие резкой границы в молекулярной организации теломер и прилегающих к ним субтеломерных районов хромосом.

Разнообразие тканей в многоклеточном организме достигается в процессе дифференцировки клеток. Под действием внешних и внутренних сигналов в дифференцирующейся клетке происходят *изменения экспрессии генов*, вызывающие, в свою очередь, изменение свойств самой клетки. Эти процессы образуют в организме сложную сеть взаимодействий, которые можно разделить на два основных типа. *Во-первых, это внутриклеточные генетические взаимодействия*, которые принято называть генными сетями. Их основными эффекторами являются белки – транскрипционные факторы [41]. *Во-вторых, межклеточные взаимодействия, обеспечиваемые специализированными сигнальными молекулами* [42]. Развитие ткани может сопровождаться многократными изменениями в работе генов по мере ее созревания.

Транскрипционные факторы обеспечивают регуляцию генов в клетке, связываясь с регуляторными последовательностями в геноме и оказывая *усиливающее* либо *ослабляющее* действие на экспрессию. При этом разные транскрипционные факторы могут конкурировать между собой за связывание с регуляторной последовательностью [41]. Исследование генных сетей осложняется также тем, что сами регуляторные последовательности обычно сильно вырождены, поэтому за редким исключением их положение не удается определить без привлечения экспериментальных данных [43,44].

Построение генных сетей, таким образом, требует сопоставления данных о связывании транскрипционных факторов и сопутствующих

изменениях транскрипционной активности генов в процессе дифференцировки клеток.

Для того чтобы проследить весь путь развития ткани, начиная с индивидуальной стволовой клетки, необходим способ, позволяющий пометить эту клетку и все клетки, от нее происходящие. Эта цель может быть достигнута при помощи ряда методов, позволяющих получать генетически модифицированную популяцию клеток внутри организма. В англоязычной литературе такие подходы называются lineage tracing (прослеживание клеточных поколений). Общий смысл этих подходов состоит в том, что клетки, экспрессирующие исследуемый ген, приобретают необратимое генетическое изменение, например, начинают нарабатывать репортерный флуоресцентный белок. Это изменение передается дочерним клеткам. Такие клетки могут быть отсортированы и использованы для изучения экспрессии генов [45]. Как правило, для внесения необратимых генетических изменений используют сайт-специфические рекомбиназы, такие как Flp или Cre, работающие под контролем промотора исследуемого гена [46]. В клетках, в которых нарабатывается один из этих белков, происходит рекомбинационное событие, которое приводит к запуску репортерного гена [44].

Этот подход позволяет исследовать изменения экспрессии генов в течение дифференцировки ткани, однако не дает прямой информации о том, какие механизмы ведут к этим изменениям. Для понимания этих механизмов необходимо получить информацию о том, какие транскрипционные факторы связываются с этими генами, и к каким изменениям их экспрессии это приводит. Сложность состоит в том, что для правильной интерпретации необходимо определять паттерн связывания транскрипционных факторов в тех же клетках, в которых измеряется активность генов.

Определение сайтов связывания транскрипционных факторов с ДНК проводится, как правило, при помощи хроматин-иммунопреципитации и требует большого количества однородного материала, поэтому обычно используются культуры клеток. Для исследования процессов, приводящих к специализации тканей, могут быть использованы методы искусственной дифференцировки клеток в культуре [47], однако такие методы доступны далеко не для любых тканей и интерпретация их результатов

затруднена тем, что неизвестна степень достигаемой дифференцировки.

Существует альтернативный оригинальный подход, позволяющий определять сайты связывания белков с ДНК. Этот метод основан на создании и экспрессии химерного белка, состоящего из изучаемого транскрипционного фактора и Dam (ДНК-аденин-метилтрансфераза *Escherichia coli*) и был назван Dam Identification (DamID) [48]. Такой химерный белок связывается с хроматином, а субъединица Dam метилирует ДНК в окрестности сайта связывания. Метилированные фрагменты ДНК могут быть выделены и проанализированы. Применение этого метода в значительной степени также ограничено культурами клеток, поскольку требует очень низкого уровня экспрессии химерных белков, который достигается за счет подтекания промотора гена теплового шока [48]. Тот же принцип может быть использован и на целом организме, однако в этом случае DamID будет происходить во всех клетках организма, даже в тех, в которых исследуемый ген не активен [49].

Регуляция экспрессии генов.

Экспрессия генетической информации зависит от регуляторных механизмов, влияющих на активацию или репрессию транскрипции генов. Анализ достижений современной генетики показывает, что прогрессивное эволюционное преобразование онто- и филогенеза осуществляется не за счёт изменений генного состава организма, а связано с *дифференциальной экспрессией генов* [50]. Широочайшие спектры экспрессии множества генов, жёстко скоординированных по месту и времени в онтогенезе, предполагают наличие четкой «программы развития», носящей видоспецифичный характер. Тканеспецифичная экспрессия генов обеспечивается внутри- и межхромосомным взаимодействием различных доменов, формирующих хромосомные территории [51]. При этом важнейшим обстоятельством эпигенетического контроля являются позиционные отношения хромосом между собой и с ядерной оболочкой [52-54].

Важные результаты были получены при анализе ДНК прицентромерного гетерохроматина, прикрепленного к ядерной оболочке методом микродиссекции хромосом. Оказалось, что в составе ДНК имеются разнообразные повторы,

мобильные элементы и структурные гены. Около 80% фрагментов библиотеки обладают свойствами ДНК ядерных белковых структур, причём наиболее представлен класс ДНК синаптонемного комплекса, меньше – ДНК ядерного матрикса (M/SAR ДНК) и ДНК ядерной ламины [55,56].

Анализ литературных данных показывает, что в последние годы активно исследуются механизмы дистанционной регуляции транскрипции на ДНК и хроматине. Энхансеры и инсультаторы – это последовательности ДНК, способные осуществлять регуляцию экспрессии генов на больших расстояниях. Действие энхансеров эукариот основано на непосредственном взаимодействии белков, связанных с энхансером и промотором-мишенью, что сопровождается образованием петли, включающей упакованный в хроматин промежуточный участок ДНК. Очевидно, регуляция на больших расстояниях осуществляется с помощью специализированных механизмов, облегчающих взаимодействие между регуляторным участком и его мишенью. Показано, что суперскрученность ДНК прокариот является основным фактором, способствующим эффективной дистанционной коммуникации энхансера с промотором по механизму скольжения. У эукариот структура хроматина сама по себе способна поддерживать высокоэффективную дистанционную коммуникацию и функционально подобна суперскрученному состоянию, характерному для ДНК прокариот [57].

Информация о структурах множества полных геномов животных в сочетании с информацией о новых классах регуляторных элементов, расположенных в областях, которые традиционно рассматривались как межгенные, привела к пересмотру представления о геноме как состоящем из генов с их промоторами, разделенными отчетливыми межгенными участками. Вместо этого появилось понятие «транскрипционный ландшафт», в котором практически отсутствуют границы между тем, что традиционно рассматривались как гены. Вслед за этим также категорически изменилось представление о центральном элементе транскрипции системы животных – *цис*-расположенном кор-промоторе. Понимание механизмов функционирования этого элемента служит основой для понимания регуляции транскрипции вообще. Обобщение

данных о кор-промоторах, которые появились за последние годы, привело к представлению, что кор- регуляторные элементы не являются пассивными каркасами для сборки преинициационных транскрипционных комплексов, а являются активными участниками процесса регуляции транскрипции [58].

Разграничение процессов репликации ДНК и транскрипции, протекающих в ядре, и белкового синтеза, происходящего в цитоплазме, создает возможности для более тонкой регуляции этих процессов. Селективный обмен макромолекулами между двумя компартментами осуществляется при помощи комплекса белков ядерной поры. Транспорт молекул («грузов») производят белки-рецепторы семейства кариоферринов, которые, формируя функциональный комплекс с транспортируемым белком, взаимодействует с белками комплекса ядерной поры. Транспортные пути между цитоплазмой и ядром регулируются на уровне экспрессии или модификации свойства отдельного груза, транспортного рецептора или же отдельных белков комплекса ядерной поры. Эти уровни регуляции иерархически организованы по степени избирательности воздействия и используются при модуляции различных процессов, от экспрессии отдельных генов до дифференцировки [59].

В регуляции экспрессии эукариотического генома важную роль играет редактирование РНК. Показано, что дезаминирование аденина аденозиндезаминазами, действующими на РНК (ADAR), приводит к его превращению в инозин (A – I редактирование), который распознается системами сплайсинга и трансляции как гуанин. Это может изменять сайты сплайсинга в пре-мРНК и кодоны в транслируемых областях мРНК, а также приводить к изменению вторичной структуры РНК. Кроме мРНК, редактированию подвергаются микроРНК, регуляторные функции которых у многоклеточных животных связаны с ингибированием транскрипции генов – мишеней или с деградацией определенных РНК-транскриптов. ADAR могут ингибировать продукцию зрелых микроРНК так, что изменяется их специфичность к генам-мишеням. Аденозиндезаминазы, редактирующие аденины в транспортных РНК (ADAT, превращают аденин в инозин в тРНК всех эукариот, в результате чего увеличивается количество форм тРНК в клетке [60].

В качестве *новых открытий в области молекулярной биологии* можно рассматривать *транс-трансляцию* – уникальный механизм синтеза полипептидной цепи с мРНК на матричную часть тмРНК. Она позволяет, с одной стороны, освободить для новых раундов трансляции рибосомы, заблокированные при трансляции мРНК без стоп-кодона, а с другой, – направить на деградацию проблемную мРНК и синтезированный с нее полипептид [61].

В настоящее время считается установленным, что mTOR сигнальная система является одной из основополагающих сигнальных систем, как в клетках растений, так и в клетках животных и участвует в регуляции многих важнейших клеточных функций, как в норме, так и в развитии патологических процессов [62]. Несмотря на то, что за последнее десятилетие в области исследования mTOR сигнального пути были получены значительные результаты, которые позволяют лучше понять патогенез таких заболеваний, как рак и диабет второго типа, наши знания остаются неполными и существует множество вопросов, на которые еще предстоит ответить [63].

Достижения и тенденции развития ведущих научных школ Казахстана и развитых стран мира.

Сейчас хорошо известно, что в человеческом геноме около 30 тыс. генов. Известно также, что наследственные и многие мультифакторные болезни обусловлены повреждениями генов, что гены определяют реакцию нашего организма на лекарства, на инфекцию, вызванную патогенными микроорганизмами, и другие факторы окружающей среды, а также то, что гены влияют на нашу предрасположенность к болезням, которые во многом зависят от внешних условий. Установление точных взаимодействий между генами и их белковыми продуктами, которые обеспечивают координацию процессов, происходящих в здоровом организме, и в случае патологических процессов является важной задачей молекулярной генетики.

С этой точки зрения важным аспектом геномных исследований является выявление вариаций в последовательностях генов, ответственных за формирование индивидуальных реакций на влияние окружающей среды. К таким генам относятся гены детоксикации ксенобиотиков, регуляторов клеточного цикла, репарации ДНК и

контроля апоптоза. В условиях постоянного воздействия токсических веществ, клетки выработали сложную систему защитных механизмов. Если одни из этих защитных систем направлены на обезвреживание вредных метаболитов, функции других сосредоточены на репарации возникших повреждений.

До недавнего времени полигенные мультифакторные болезни чаще всего не рассматривались как генетические заболевания, поскольку для них не наблюдается характерного типа наследования и выраженность болезни может зависеть от образа жизни больного. Полигенные болезни – это результат не одиночной мутации в одном гене, а следствие изменений в ряде генов, которые в совокупности могут вызывать предрасположенность индивидуума к серьезному дефекту. За последние годы в результате геномных исследований наше понимание механизмов возникновения мультифакторных заболеваний сильно выросло.

Методы обратной генетики, рассмотренные выше, применяются, как правило, в исследованиях на моделях различных заболеваний человека и являются первым этапом на пути создания новых терапевтических препаратов.

За последние годы также достигнуты большие успехи в изучении генетики рака. В результате многочисленных исследований сложилась многоударная модель канцерогенеза, в которой центральным звеном являются онкогены и гены опухолевой супрессии. Новым направлением в генетике рака является поиск генов предрасположенности к развитию онкологических заболеваний. По определению к ним относятся полиморфные варианты (аллели) генов, которые совместимы с нормальной жизнедеятельностью, но при действии неблагоприятных факторов либо с течением времени способствующие инициации и развитию канцерогенного процесса. Актуальность изучения генов предрасположенности объясняется тем, что в последние десятилетия отмечается большой рост и «омоложение» различных онкологических заболеваний, в числе которых одно из первых мест занимает рак шейки матки.

Оценка генетического риска для облученных популяций людей является также актуальной проблемой, что связано с многочисленными радиационными ситуациями, возникшими за последние десятилетия, влияющими на здоровье большого контингента людей. Для Казахстана такие

исследования приобретают особую значимость в связи с неблагоприятной экологической обстановкой во многих регионах республики, существованием бывшего Семипалатинского ядерного полигона [64].

Важную группу мультифакторных заболеваний составляют митохондриальные болезни. На сегодняшний день известно более 400 точковых мутаций и более сотни структурных перестроек митохондриальной ДНК (мтДНК), связанных с нейромышечными и другими митохондриальными синдромами – от летальных в неонатальном периоде до заболеваний с поздним началом. Причина возникновения и развития митохондриальных расстройств кроется, в первую очередь, в дефектах системы окислительного фосфорилирования. Отличительная особенность митохондриальных заболеваний человека состоит в их фенотипической многоликости и в феномене гетероплазии. Существует необходимость точной оценки количества мутантных мтДНК, поскольку уровень гетероплазии во многом определяет фенотипическое проявление заболевания. Несмотря на то, что с момента установления причинно-следственной связи между мутацией в мтДНК и определенной клинической картиной в митохондриальной биологии достигнут значительный прогресс, митохондриальные заболевания и по сей день остаются неизлечимыми [65].

Возможность переноса генетического материала из митохондрий в ядро и его интеграция в ядерный геном доказаны в последние годы: это постоянный и динамичный процесс. Некоторые фрагменты митохондриальной ДНК (мтДНК) встраиваются в ядерный геном как некодируемые последовательности, которые получили название ядерно-митохондриальных псевдогенов (NUMT-псевдогенов или NUMT-вставок). У разных эукариот они распределяются по хромосомам, образуя «библиотеку», и дают важную информацию по истории эволюции геномов. Выход мтДНК из митохондрий, в основном, связан с повреждением и митофагией этих органелл. Включение фрагментов мтДНК в ядерный геном может происходить в процессе репарации двунитевых разрывов ядерной ДНК (ядДНК), которые могут возникать эндогенно и/или под действием экзогенных агентов. Репарация двунитевых разрывов яДНК с «захватом» фрагмента мтДНК происходит путем или негомологического

соединения их концов, или с вовлечением микромологий, располагающихся на концевых последовательностях. Анализ данных позволяет полагать, что частота формирования NUMT-псевдогенов зависит от частоты возникновения двунитевых разрывов в яДНК, от активности систем их репарации, а также от количества фрагментов мтДНК, вышедших из органелл и мигрировавших в ядро. Наиболее вероятно, что такие ситуации возникают после воздействия на организм повреждающих агентов и, в первую очередь, – ионизирующих излучений. При возникновении новых NUMT-псевдогенов, очевидно, изменяется не только структура генома на участках их внедрения, но и степень их влияния на реализацию генетической информации. Перенос и включение NUMT-псевдогенов в ядерный геном *de novo* может играть роль в развитии различных патологий и старения, а также быть причиной ошибок при анализе свободной мтДНК в составе общей клеточной ДНК (с использованием методов ПЦР) в результате их ко-амплификации [66].

В Казахстане генетические исследования ведутся в Институте общей генетики и цитологии, на кафедрах генетики ведущих вузов Республики и на базе различных учреждений биологического, медицинского и сельскохозяйственного профиля. Институт общей генетики и цитологии в форме самостоятельного государственного учреждения создан Постановлением Правительства РК в 1995 г. с целью координации и дальнейшего развития генетических исследований в Казахстане. Организатором и первым директором Института был академик НАН РК Р.И.Берсимбай (1995-2001). По его инициативе ведущие казахстанские генетики (академик НАН РК Н.Б.Ахматуллина, д.б.н. Э.Б.Всеволодов, д.б.н. Р.Ж.Жапбасов, д.б.н.И.К. Шарипов и др.) объединили свои лаборатории и научные группы в новом Институте. В мае 2010 г. Институту общей генетики и цитологии исполнилось 15 лет. За такой сравнительно короткий период Институт не только состоялся как научная организация, но и достиг определенных успехов, о чем свидетельствует более 600 публикаций в научных изданиях как республиканского значения, так и рейтинговых международных журналах. Среди фундаментальных проблем, разрабатываемых в Институте, можно отметить проблему генетической нестабильности, мутагенеза и канцероген-

неза, программированной гибели клеток, полиморфизма генов репарации ДНК и детоксикации ксенобиотиков, а также роли сигнальных молекул в регуляции экспрессии генов.

В лаборатории молекулярной генетики, созданной при организации Института, впервые в Республике было развито научное направление в области исследования регуляции генетической нестабильности у высших организмов, в частности, генетики дрозофилы. Коллекция онковирус-индуцированных нестабильных линий дрозофилы, представляющая опухоли с различными малигнизирующими способностями и мутации с нарушением развития глазо-антенных структур, в течение многих лет поддерживается в лаборатории и активно используется для изучения проблем канцерогенеза и апоптоза. Так, показано, что развитие опухолей в онковирус-индуцированной системе нестабильности связано с инактивацией генов-супрессоров опухолевого роста, а не с прямой активацией протоонкогенов. Продленная генетическая нестабильность, в основе которой лежат перемещения мобильных элементов генома, вызванные действием онковирусных ДНК, может индуцировать мутации и крупные хромосомные перестройки, являющиеся причиной изменений времени и уровня экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста. Активация протоонкогенов, произошедшая в результате этих изменений, приводит к тем генетическим и морфофизиологическим эффектам, которые наблюдаются в мутантных опухолевых линиях [67].

Исследование процессов регуляции апоптоза на модельной системе дрозофилы показало, что длительное воздействие высокой концентрации оксида азота в ходе развития стимулирует апоптоз, а снижение образования оксида азота ингибирует апоптоз. Определены гены, ответственные за индукцию (*hid*, *grim*, *ripper*) и ингибирование (*diap-2*, *dBcl*) апоптотических сигналов. Впервые выявлено, что для индукции апоптоза необходимо длительное воздействие высоких концентраций оксида азота. Установлено, что индукция апоптоза у модельных животных не зависит от экспрессии генов теплового шока [68].

С целью установления генетических факторов риска онкологических заболеваний, в частности, рака шейки матки и пищевода, в настоящее время проводятся молекулярно-эпидемиологические исследования, посвященные анализу

полиморфизма генов, кодирующих ферменты репарации ДНК, детоксикации ксенобиотиков и регуляции клеточного цикла в популяциях больных и здоровых людей. Анализ ассоциации изученных видов полиморфизма с возникновением рака шейки матки и пищевода в когортах из г. Алматы позволил выявить, что у носителей делеции по генам глутатион-S-трансферазы M1 и T1 типов повышен риск развития рака пищевода и рака шейки матки. Однонуклеотидные полиморфизмы гена *XRCC1* (по 399 кодону), гена *XRCC3* (по 241 кодону) и гена регуляции клеточного цикла и апоптоза TP53 (по 72 кодону) могут оказывать влияние как на развитие рака пищевода, так и рака шейки матки. Полиморфизм гена-регулятора клеточного цикла *CCND1* A870A ассоциирован с развитием рака пищевода. Полиморфизм 194 кодона гена *XRCC1* по 194 кодону (Arg194Trp) не оказывает влияния на развитие рака пищевода, в то же время носители полиморфного варианта Trp194 в гомозиготе более устойчивы к развитию рака шейки матки [69].

Впервые в казахстанских популяциях был изучен характер распределения аллельных вариантов генов, ответственных за детоксикацию ксенобиотиков и репарацию ДНК у здоровых людей и больных ишемической болезнью сердца. Показано, что отсутствие в генотипе функциональных аллелей *GSTM1* (-/-) гена может быть фактором риска развития данной патологии сердца. Полиморфизм генов репарации *XRCC1* (arg399gln) и *XRCC3* (thr241met) не является фактором риска данных заболеваний [70].

Изучение генетических последствий действия радиации на наследственность человека с использованием современных методов молекулярной генетики – другое направление, которое активно исследуется в лаборатории молекулярной генетики. Для оценки генетического риска действия ионизирующей радиации на будущие поколения людей было проведено комплексное исследование 3 поколений семей, проживающих на территории Семипалатинского ядерного полигона [71]. Были определены частоты мутаций в минисателлитных локусах и частота хромосомных мутаций в половых клетках человека. Результаты исследований показали, что у третьего поколения частота мутаций ДНК зависит не от «мутационного багажа», полученного в наследство от родителей, а от уровня радиационного загрязнения

ния окружающей среды. В первом поколении облученной группы была показана отрицательная корреляция между частотой минисателлитных мутаций и годом рождения родителей. Показано, что у внуков людей, переживших первые атомные взрывы, мутаций гораздо меньше, чем у их детей. Результаты цитогенетического анализа с использованием метода гибридизации *in situ* показали одинаковую частоту хромосомных транслокаций между индивидуумами из облученной группы, рожденными до первого ядерного взрыва и аналогичной возрастной когортой из контрольной популяции. Результаты исследования с применением новейших методов биодозиметрии показывают, что дозы облучения для населения этого региона составляют в среднем 0,5 Гр., что существенно ниже таковых, приведенных в ранних публикациях. Эти исследования проводились в рамках международных проектов ИНГАС, ИНКО-КОПЕРНИКУС с участием ведущих специалистов-генетиков США, Великобритании и Финляндии [72]. С использованием этого уникального биобанка проводятся исследования факторов индивидуальной радиорезистентности и радиочувствительности.

Впервые был изучен полиморфизм генов репарации ДНК (*XRCC1*, *XRCC3*) и генов, участвующих в детоксикации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*), в ассоциации с частотой хромосомных aberrаций и частотой минисателлитных мутаций у жителей, проживающих вблизи территории Семипалатинского ядерного полигона. Впервые для трех поколений жителей Семипалатинского региона установлены индивидуальные цитогенетические показатели частот хромосомных aberrаций. Проведено сравнение частоты цитогенетических нарушений с аналогичными показателями в трех поколениях людей с незагрязненной территории. Рассчитаны суммарные поглощенные дозы облучения в трех возрастных поколениях облученной группы, составившие для первого поколения - 65 бэр (0,65 Зв), второго поколения - 39 бэр (0,39 Зв) и третьего поколения - 8,04 бэр (0,08 Зв).

Изучение полиморфизма *XRCC1* (Arg³⁹⁹Gln) и Arg¹⁹⁴Trp в облученной и необлученной популяции выявило чувствительность 194 кодона гена *XRCC1* к действию радиации. Впервые установлено, что полиморфизм *XRCC1* (Arg¹⁹⁴Trp) ассоциирован с повышением частоты минисателлит-

ных мутаций при условии фактора облучения, а мутации *XRCC1* (Arg³⁹⁹Gln) ассоциированы с повышением частоты перестроек хромосом генных мутаций даже в отсутствии действия радиации. Полиморфизм гена *XRCC3* (Trp²⁴¹Met) не выявил связи с радиочувствительностью и радиорезистентностью. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз (*T1* и *M1*) в облученной и контрольной популяции имеет слабую связь с индукцией хромосомных aberrаций, однако высоко ассоциированы с повышением частоты минисателлитных мутаций [73]. Реконструированная поглощенная доза облучения для жителей Семипалатинского региона составляет: для первого поколения - 65,00 бэр (0,65 Зв), для второго поколения - 39,00 бэр (0,39 Зв) и для третьего поколения - 8,04 бэр (0,08 Зв). В контрольной популяции суммарная поглощенная доза облучения не превышает допустимого уровня фонового загрязнения (5,00 бэр (0,05 Зв) [74].

Если проводить литературный анализ исследований по изучению генетического контроля радиочувствительности, то можно отметить следующие направления исследований: 1) изучение роли гетерогенности человеческой популяции по радиочувствительности хромосом в определении зависимостей доза-эффект; 2) изучение радиационно-индуцированного адаптивного ответа и вклада различных факторов, включая генетические; 3) использование цитогенетических методов биодозиметрии для оценки доз внутреннего и внешнего облучения людей [75]. Можно отметить, что ионизирующее излучение характеризуется, в первую очередь, кластогенным действием. Однако, по всей видимости, существует и анеугенная компонента радиационного воздействия, механизм реализации которой отличен от индукции структурных повреждений хромосом [76].

Фундаментальные исследования природы отдаленных последствий действия генетически активных факторов среды позволили раскрыть существенные различия реакции клеток на малые и большие дозы радиации. Знаменательным оказалось открытие нового феномена в генетике человека - трансгенерационной передачи мутаций, индуцированных в половых клетках родителей, соматическим клеткам потомства. Репарационные способности и отдаленное действие радиации на геном человека изучались в экспери-

ментах по длительному культивированию клеток человека в условиях *in vitro*. Изучение влияния изменений радиочувствительности, радиоадаптивного ответа и репарации на процесс формирования нестабильности генома показало, что при длительном культивировании лимфоцитов крови человека, облученных различными дозами γ -радиации, обнаруживается качественное изменение спектра хромосомных aberrаций, указывающее на переход клеток в нестабильное состояние. Интенсивность стимуляции репаративного и репликативного синтеза ДНК в предоблученных клетках ниже, чем в необлученных, на всем протяжении культивирования, что, по-видимому, является одной из причин формирования нестабильности генома [77].

Проблемы, связанные с нестабильностью генома, генетического и эпигенетического контроля апоптоза, канцерогенеза, их взаимодействия, ассоциации полиморфизма последовательностей множества генов, задействованных в реакции организма на условия окружающей среды, с развитием предрасположенности к мультифакторным болезням и устойчивостью к агрессивному действию среды – это те направления молекулярной генетики, которые активно развиваются в настоящее время в Казахстане и в ведущих лабораториях мира. В то время как геномные технологии были направлены на установление полных нуклеотидных последовательностей геномов различных организмов, постгеномные технологии ставят целью определение механизмов реализации этой генетической информации и выявление различий между индивидуальными геномами.

Как уже указывалось выше, применение новых знаний в области медицинской генетики может кардинально изменить подходы к диагностике, лечению и профилактике не только наследственных генетических заболеваний, но и множества других, широко распространенных болезней, в развитии которых участвуют как генетические факторы, так и факторы окружающей среды (например, болезни бронхо-легочной патологии). Генетика атопии – одно из наиболее активно используемых сегодня направлений исследований мультифакторных заболеваний. Под атопией понимают наследственную тенденцию к гиперпродукции иммуноглобулинов класса E (IgE), которая лежит в основе целого ряда аллергических заболеваний. В настоящее время

исследования по влиянию различных условий на профили генной экспрессии бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких активно развиваются в лаборатории молекулярной генетики Института экспериментальной биологии, биотехнологии и экологии ЕНУ им. Л.Н.Гумилева [78].

Цитогенетические исследования.

Цитогенетические исследования млекопитающих в Казахстане проводятся в следующих направлениях: установление нормального кариотипа разных видов и пород животных путем изучения морфологии и морфометрических параметров индивидуальных хромосом; изучение состояния генетического аппарата – хромосом у животных разных возрастов и пола, а также с различным уровнем продуктивности и воспроизводительных качеств, которые разводятся в разных природно-экологических районах Республики; изучение уровня цитогенетической нестабильности в гемопоэтических тканях при различных типах врожденных пороков развития у животных; изучение уровня хромосомных aberrаций и геномных мутаций у мышевидных грызунов из экологически неблагополучных районов Казахстана; изучение состояния генома у домашних животных из экологически неблагополучных районов Казахстана [79].

В Казахстане имеются несколько регионов, которые характеризуются неблагополучной экологической ситуацией. Наряду с Семипалатинским ядерным полигоном сюда относятся высыхающие районы Аральского моря, уранодобывающие районы Северного Казахстана, территория космодрома Байконур, и, в частности, районы падения отработанных ступней космических ракет при штатном запуске и при аварийных ситуациях с космическими ракетами, а также нефтедобывающие районы западного Казахстана.

Мышевидные грызуны являются прекрасным объектом для изучения влияния отрицательных факторов окружающей среды на организм млекопитающих, так как они обитают и размножаются в этих экологически неблагополучных местах. Тем не менее при экстраполяции результатов этих научно-исследовательских работ на крупных животных, и, в частности, на овец, возникает много вопросов, на которые невозможно ответить, опираясь на уже полученные данные. К тому же следует отметить, что продукция

животноводства, которая производится в этих экологически неблагоприятных регионах, используется населением. С учетом этих обстоятельств в 2009 и 2010 годах в лаборатории цитогенетики ИОГиЦ активно проводятся цитогенетические исследования сельскохозяйственных животных, и, в частности, овец, которые разводятся на территориях бывшего Семипалатинского испытательного полигона, Степногорского горно-химического комбината, а также из района падения космических ракет вследствие нештатной ситуации при их запуске. Естественно, полученные в этих исследованиях результаты являются прогностическими и для людей, и к тому же позволяют проследить пути миграции радионуклидов на новые территории.

В целом, полученные групповые или индивидуальные цитогенетические показатели животных можно использовать для генетической характеристики разводимых животных и для объективной оценки экологического состояния окружающей среды, а также для поиска хромосомных маркеров индивидуальных продуктивных и воспроизводительных качеств животных.

Обобщенная научная информация по качественному и количественному цитогенетическому статусу животных позволяет также оценить уровень нестабильности генома в соматических и генеративных клетках у определенных пород и популяций.

Резюмируя научные материалы по современному состоянию цитогенетики млекопитающих в Казахстане, следует отметить, что, несмотря на отмеченные определённые достижения, цитогенетика домашних животных остаётся одним из слабых звеньев общей цитогенетики млекопитающих. Даже исследование состояния хромосом у нормальных и здоровых животных не может быть пройденным этапом для цитогенетики домашних животных ввиду того, что и в этой области ещё много нерешённых актуальных научных проблем. Например, ещё не у всех пород и популяций животных исследована изменчивость хромосом, представляющая несомненный научно-практический интерес. Наряду с этим существуют и такие проблемы, как кариотипическая эволюция в видообразовании, цитогенетические аспекты гибридизации животных, хромосомные маркеры продуктивных качеств животных, цитогенетическое картирование хромосом и генов в

хромосомах, ультраструктура индивидуальных хромосом и т.д.

Развитие молекулярной генетики растений в Казахстане

Молекулярная генетика растений изучает разнообразие и наследуемость макромолекул для анализа организмов на геномном, хромосомном и геномных уровнях организации. Данные исследования важны как для расширения фундаментальных знаний, так и для практических целей.

1. Изучение генетического разнообразия геномов растений

С целью изучения, сохранения и рационального использования генетических ресурсов страны необходимо изучение генетического разнообразия культурных видов растений и их дикорастущих сородичей. Работы такого рода проводились мозаично, в основном с использованием морфологических признаков и белковых макромолекул. Развитие методов молекулярной генетики открыло возможности использования современных ДНК-технологий. Использование методов молекулярных маркеров, в том числе ДНК-маркирование геномов важных для Казахстана культур растений, позволит идентифицировать, регистрировать и систематизировать имеющиеся ресурсы. С целью ДНК-баркодирования дикорастущих видов Казахстана активно используются SNP-маркеры (единичные нуклеотидные замены) ядерных и хлоропластных геномов. К примеру, осуществлено генотипирование дикорастущих злаковых культур Казахстана с использованием маркеров *trnL* и *matK* хлоропластного генома [80]. Для изучения уровня внутривидового разнообразия, генотипирования и паспортизации сортового генофонда основных зерновых культур также активно используются микросателлитные ДНК-маркеры.

2. Идентификация новых генов, детерминирующих признаки качества, устойчивости к болезням и стрессовым факторам.

Различные болезни и абиотические факторы (стрессы) причиняют существенный урон урожаю и качеству сельскохозяйственных растений. Благодаря развитию молекулярно-генетических методов и прикладных статистических программ появились новые возможности идентификации и картирования генов, вовлеченных в изменчивость количественных признаков, для повышения устойчивости и качества. Создание приборов нового

поколения по определению нуклеотидных последовательностей геномов резко увеличило возможности генерирования массивов данных за сравнительно короткое время, что приводит к бурному развитию геномики растений. Основным молекулярно-генетическим подходом для поиска новых генов хозяйственно-ценных признаков остается изучение дискретных и сложных признаков на основе построения генетических карт важных культур растений и картирование локусов количественных признаков. Вместе с этим появились принципиально новые методологические подходы по эффективной идентификации новых генов и ДНК-маркеров. Одним из таких подходов является метод ассоциативного картирования геномов, основанный на возможности изучения больших коллекций сельскохозяйственных культур по нескольким тысячам экспрессирующихся ДНК-маркеров в различных экологических зонах выращивания зерновых и зерно-бобовых культур.

Известно, что большинство хозяйственно ценных признаков растений наследуется полигенно. Изменчивость признака, контролируемая несколькими или многими локусами и зависящая от эффектов окружающей среды, называется «количественной», «полигенной», «многофакторной» или «сложной». Индивидуальные локусы, которые вносят свой вклад в такую изменчивость, называют локусами количественных признаков (*QTL - quantitative traits loci*). Разработка и использование методов ДНК-маркеров, революционизировала генетический анализ сложных признаков растений. Методы ДНК-генотипирования и селекции при помощи молекулярных маркеров (*marker-assisted selection - MAS* - отбор, основанный на молекулярных маркерах), позволяют ускорить перенос хозяйственно ценных генов и локусов количественных признаков в процессе селекции и обеспечить создание новых сортов целым комплексом заданных свойств.

Одним из лучших примеров сложного признака является урожайность зерна, которая зависит от условий окружающей среды и обычно имеет низкую наследуемость. QTL-анализ с использованием детализированной генетической карты пшеницы позволяет разбить экспрессию этого сложного признака на его генетические компоненты, каждый из которых, в свою очередь, должен быть ассоциирован с определенным компонентом урожайности (продуктивности), например, с количеством продук-

тивных колосьев на растение, количеством зерен на колос, весом 1000 зерен и другими. Низкая наследуемость урожайности должна выявляться как изменчивость местоположения (локализации) QTL продуктивности (урожая) от эксперимента к эксперименту, от опыта к опыту.

Для мягкой пшеницы QTL-анализ количественных признаков затруднителен из-за большого размера ее генома, оцениваемого примерно в 14,500-16,000 Mbp/1C и характеризующегося большим количеством (более 80%) повторяющихся последовательностей. Также следует отметить, что вследствие относительно недавнего происхождения, гексаплоидная пшеница обладает относительно низким уровнем полиморфизма. Вследствие этого для мягкой пшеницы гораздо труднее построить детализированные генетические карты целого генома (состоящего из трех геномов - AABBDD), чем для других видов растений. При наличии определенного генетического бэкграунда, QTL-анализ позволяет идентифицировать локусы количественных признаков, ассоциированные с продуктивностью и качеством зерна, которые относительно стабильны при изменении окружающей среды [81].

3. Изучение структуры и функции генов

Приоритетом большинства проектов в молекулярной генетике растений является изолирование генов, с целью дальнейшего их внедрения в перспективные линии и сорта для создания сортов, более устойчивых к стрессам и болезням, с повышенным качеством зерна [82]. Для достижения этой цели используется две разные стратегии: 1) реверсивная генетика, когда направление изучения идет от идентифицированного гена к выяснению контролируемого им фенотипа, и 2) форвардная генетика, когда генетический анализ идет в направлении от известного фенотипа к гену. Задачи реверсивной генетики решаются в основном с помощью трансформации растений, тогда как проблемы форвардной генетики базируются на разработке детальных генетических и физических карт с последующим клонированием генов (*map-based cloning*). В настоящее время одним из актуальных направлений реверсивной генетики являются работы, основанные на методах TILLING и eoTILLING. Метод TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) основан на создании нескольких тысяч мутантных линий конкретных сортов, охарактеризован-

ных тысячами ДНК-маркеров, расположенных по всему геному, с целью изучения эффекта того или иного гена на конкретные хозяйственно-ценные признаки и поиска ассоциаций определенных мутаций и агрономически важных показателей. Модификация метода *ecoTILLING* состоит в том, что мутантные линии заменены обширными коллекциями, состоящими из более чем сотни сортообразцов и сортов различных культивируемых видов растений, что позволяет вовлечь в анализ генетический материал с различным генетическим бэкграундом.

Наряду с расширением фундаментальных знаний исследования в области молекулярной генетики растений значительно повышают эффективность селекционных работ. С созданием высокополиморфных молекулярных маркеров появились новые возможности эффективной идентификации полезных генов, в том числе детерминирующих сложные признаки. Работы по оптимизации таких маркеров, тесно сцепленных с полезными генами, позволяют значительно повысить целенаправленную селекционную работу и повысить экономический эффект, в том числе по созданию новых высококонкурентных сортов зерновых культур. Таким образом, селекция растений, основанная на использовании надежных белковых и ДНК-маркеров, является новым современным и многообещающим направлением в этой области.

Обзор результатов молекулярно-генетических исследований за последние пять лет позволяет сказать, что революция в области геномных исследований продолжается до сих пор. Недавно, например, был разработан метод, с помощью которого дифференцированные клетки кожи (фибробласты) мыши и человека удалось вернуть в плюрипотентное состояние (возможность образования любых органов и тканей взрослого организма). Полученные в эксперименте так называемые индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) обладали практически всеми свойствами эмбриональных стволовых клеток и в то же время были лишены гетерологических свойств. В настоящий момент в мире ведется создание коллекций ИПСК полученных из фибробластов кожи от пациентов с различными наследственными патологиями и мультифакторными заболеваниями, причины которых кроются в известных генных мутациях, которые часто смертельны и с трудом поддаются клас-

сической терапии, таких как болезнь Паркинсона, синдром Дауна, диабет I типа, мышечная дистрофия Дюшена, в-талассемия и другие. Исправление генных мутаций в клетках культивируемых *in vitro* является актуальной задачей, решение которой позволит использовать аутологичные ИПСК с «отремонтированными» генами для заместительной клеточной терапии.

Резюмируя все изложенное выше, можно заключить, что в последние несколько лет происходит взрывное развитие исследований в области современной молекулярной генетики и молекулярной биологии, и, в первую очередь, в области исследований генома и геномных технологий, открытия которых относятся к категории выдающихся достижений второй половины XX-го и начала XXI-го века. Хотя этих достижений достаточно много, я остановился лишь на тех направлениях исследований, которые в том или ином аспекте разрабатываются и казахстанскими учеными.

В заключение можно отметить, что сегодня генетики применяют технологии рекомбинантных ДНК для непосредственной идентификации всех генов в геноме организма. Рассмотренные нами выше достижения *функциональной геномики* помогают установить молекулярные или клеточные функции и позволяют получить данные о биологических функциях на уровне всего организма. Глобальной задачей молекулярной генетики является установление точных взаимодействий между генами, а еще точнее, между их белковыми продуктами, которые обеспечивают координацию процессов, происходящих в организме, как в норме, так и в случае нарушения функции клеток на молекулярном уровне. Можно надеяться, что будущие исследования приведут к появлению новых фундаментальных концепций, столь же революционных, какими сегодня для нас являются РНК-интерференция, рибозимы или получение искусственных хромосом с целью использования в генотерапии наследственных заболеваний с помощью трансформации стволовых клеток.

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>
2. <http://www.ddbj.nig.ac.jp>
3. <http://www.ebi.ac.uk/embl>
4. <http://www.us.expasy.org/sprot>
5. *Daneholt B.* RNAinterference // http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/adv.html

6. Tang G. (2005) siRNA and miRNA: insight into RISCs // *Trends Biochem Sci.* **30**, 106-114.
7. Bartel D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. // *Cell* **116**, 281-297.
8. Ding S. W. and Voinnet O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. // *Cell* **130**, 413-426.
9. Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., and Voinnet, O. (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**, 68-71.
10. Diaz-Pendon, J. A., and Ding, S. W. (2008) Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis // *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 303-326.
11. Омаров Р.Т., Берсимбай П.И. (2010). Биохимические механизмы супрессии РНК интерференции вирусами растений // *Биохимия*, **75**. № 8, 1062-1069.
12. Vaistij, F. E., and Jones, L. (2009) Compromised virus-induced gene silencing in RDR6-deficient plants. // *Plant Physiol.* **149**, 1399-1407.
13. Song, J. J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., et al. (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. // *Nature Struct. Biol.* **10**, 1026-1032.
14. Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. // *Science* **305**, 1434-1437.
15. Kiriakidou M., Tan G.S., Lamprinaki S., de Planell Saguer M., Nelson P.T, Mourelatos Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. // *Cell*. **129**, 11141-1151.
16. Wassenegger M. (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. // *Cell*. **122**, 13-16.
17. Weinberg M.S., Villeneuve L.M., Ehsani A., Amarzguioui M., Aagard L., Chen Z.H. et al. 2006. The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. // *RNA*. **12**, 256-262.
18. Ting A.H., Schuebel K.E., Herman J.G., Baylin S.B. (2005). Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. // *Nature Genet.* **37**. 906-910.
19. Li, F., and Ding, S. W. (2006) Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. // *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 503-531.
20. Scholthof, H. B. (2007) Heterologous expression of viral RNA interference suppressors: RISC management. // *Plant Physiol.* **145**, 1110-1117.
21. Cech T.R. 1987. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. // *Science*. **236**. 1532-1539.
22. http://wsyachina.narod.ru/chemistry/molecular_evolution_2.html
23. <http://www.dddmag.com/News-Roche-Acquires-Mirus-Bio.aspx>
24. Воробьева М.А., Ковалев Н.А., Зенкова М.А., Веньямина А.Г., Власов В.В. (2006). // *Вестник ВОГиС*. **10**, 321-330.
25. Baum D.A., Silverman S.K. 2008. DEoxyrybozymes: useful DANN catalysts in vitro and in vivo. // *Cell. Mol. Life Sci.* **65**. 2156-2174.
26. http://www.redorbit.com/news/health/22569/cytrx_announces_the_advancement
27. <http://www.mirusbio.com/therapeuticpipeline>
28. <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>
29. Рязанский С.С., Гвоздев В.А. (2008). Короткие РНК и канцерогенез. // *Биохимия*. **73**. 640-655.
30. <http://www.regulsr.com/therapeutic-focus>
31. <http://www.santaris.com/frame.cfm?sprog=2&grp=4&menu=1>
32. Sauer S., Konthur Z., Lehrach H. (2005). Genome projects and the functional –genomic era // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. **8**. 659-667.
33. Ezzeldin H.H., Diasio R.B. (2006). Genetic testing in cancer therapeutics // *Clin. Cancer Res.* **12**. 4137-4141.
34. http://www.researchhandmarkets.com/research/2b8231/the_futureof_mai.
35. Взгляд на жизнь через окно генома в 3 т.: курс лекций // отв. ред. Е.Д. Свердлов; Ин-т молекуляр. генетики РАН. М.: Наука, 2009.
36. Golovnin A., Biryukova I., Romanova O., Silicheva M., Parshikov A., Savitskaya E., Pirrotta V., Georgiev P. (2003). An endogenous Su(Hw) insulator separates the yellow gene from the Achaete-scute gene complex in *Drosophila* // *Development*. **130**. 249-3258.
37. Oberstein A., Pare A., Kaplan L., Small S. (2005). Site-specific transgenesis by Cre-mediated recombination in *Drosophila* // *Nat Methods*. **2**. 583-585.
38. Wimmer E.A. (2005). Insect transgenesis by site-specific recombination // *Nat Methods*. **2**. 580-582.
39. Basu J., Willard H.F. (2005). Artificial and engineered chromosomes: non-integrating vectors for gene therapy // *Trends Mol Med*. **11**. 251-258.
40. Irvine D.V., Shaw M.L., Choo K.H., Saffery R. (2005). Engineering chromosomes for delivery of therapeutic genes // *Trends Biotechnol.* **23**. 575-583.
41. Wilczynski B., Furlong E.E. (2010). Challenges for modeling global gene regulatory networks during development: insights from *Drosophila* // *Dev Biol.* – **340**. 161-169.
42. Greenwald I., Rubin G.M. (1992) Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells // *Cell*. **68**. 271-281.
43. Boeva V., Surdez D., Guillon N., Tirode F., Fejes A.P., Delattre O., Barillot E. (2010). De novo motif identification improves the accuracy of predicting transcription factor binding sites in ChIP-Seq data analysis // *Nucleic Acids Res.* **38**. 126.
44. Liu R., Li Y., Hu R., Jin T., Deng S., Liang W., Zhang N., Chen J., Prud'homme G., Jia W.W., Ma D., Wang Q. (2010). A site-specific genomic integration strategy for sustained expression of glucagon-like peptide-1 in mouse muscle for controlling energy homeostasis // *Biochem Biophys Res Commun.* **256**. 287-296.
45. Wang E.T., Moyzis R.K. (2007). Genetic evidence for ongoing balanced selection at human DNA repair genes ERCC8, FANCC, and RAD51C // *Mutat Res.* **16**. 165-174.
46. Davis M.W., Morton J.J., Carroll D., Jorgensen E.M. (2008). Gene activation using FLP recombinase in *C. elegans*. *PLoS* // *Genet.* **4**(3). e1000028.
47. Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Bruggeman S.W., Solovei I., Brugman W., Graf S., Flicek P., Kerkhoven R.M., van Lohuizen M., Reinders M., Wessels L., van Steensel B. (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation // *Mol Cell*. **38**. 603-13.
48. van Steensel B., Delrow J., Henikoff S. (2001). Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase // *Nat Genet.* **27**. 304-308.
49. de Wit E., Greil F., van Steensel B. (2005). Genome-wide HP1 binding in *Drosophila*: developmental plasticity and genomic targeting signals // *Genome Res.* **15**. 1265-1273.

50. Корочкин Л.И. (2002). Биология индивидуального развития. М.: изд. Моск. ун-та, 263 с.
51. Zhimulev I.F. (1998). Polytene chromosomes, heterochromatin and position effect variegation// *Advances in Genetics*. **37**.1-566.
52. Гвоздев В.А. (2001). Пространственное расположение хромосом в клеточном ядре определяет активность генов // Соросовский образовательный журнал. **7**. №2. 4-10.
53. Серов О.Л. (2003.) Генный и хромосомный уровни контроля развития// Информационный вестник ВОГИС. **24-25**. 2-8.
54. Стегний В.Н. (2006). Эволюционное значение архитектоники хромосом как формы эпигенетического контроля онто- и филогенеза эукариот // *Генетика*. **42**. 1215-1224.
55. Усов К.Е., Шелковникова Т.А., Вассерлауф И.Э., Стегний В.Н. (2008) Молекулярно-цитогенетический анализ прицентромерного гетерохроматина хромосом трофоцитов яичников у видов подгруппы DROSOPHILA MELANOGASTER // *Цитология*. **50**. №12. 1044 – 1049.
56. Стегний В.Н., Артемов Г.Н., Сайджафарова А.О., Усов К.Е. (2010). Принципы молекулярно-цитогенетической организации хромосомных локусов, обеспечивающих трехмерную организацию интерфазного ядра // *Цитология*. **52**. № 8. 683-690.
57. Студитский В.М. (2009). Механизмы дистанционной регуляции транскрипции на ДНК и хроматине. // *Молекулярная биология*. **243**. 204-214.
58. Свердлов Е.Д. (2010). Эволюция взглядов на молекулярные механизмы жизнедеятельности в свете полной информации на примере представлений о кор-промоторах. // *Молекулярная биология*. **44**. 773-785.
59. Чумайков С.П., Прасолов В.С. (2010). Организация и регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта. // *Молекулярная биология*. **44**. 211-228.
60. Панкратова Е.В., Степченко А.Г. (2010). Редактирование РНК в экспрессии эукариотического генома. // *Молекулярная биология*. **46**. 5-13.
61. Шпанченко О.В., Бугаева Е.Ю., Головин А.В., Донцова О.А. (2010). Транс-трансляция. Факты и гипотезы. // *Молекулярная биология*. **44**. 563-572.
62. Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M. and Sabatini D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. // *Science*. **307**. 1098-1101.
63. Берсимбай Р.И., Булгакова О.В., Омаров Р.Т., Сарбасов Д. (2010) Роль mTOR сигнальной системы в регуляции клеточных функций // Доклады НАН РК. **№5**. 82-90.
64. Берсимбай Р.И., Уильямс А.У. (2009). Recommendation of a human population monitoring program to address environmental health concerns in Kazakhstan. // Доклады НАН РК. **4**. 32-39.
65. Мазунин И.О., Володько Н.В., Стариковская Е.Б., Сукерник Р.И. (2010). Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека. // *Молекулярная биология*. **44**. 755-772.
66. Газиев А.И., Шайхаев Г.О. (2010). Ядерно-митохондриальные псевдогены // *Молекулярная биология*. **44**. 405-417.
67. Муть Н.В. Генетическая характеристика онковирусиндуцированных нестабильных мутаций *Drosophila melanogaster* // Автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук (генетика). Алматы, 2001. 26 с.
68. Хусаинова Э.М. Изучение экспрессии апоптоз-регулирующих генов *hid* и *grim* в *dNOS*-трансгенных линиях *Drosophila melanogaster* при действии теплового шока // Автореферат дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук (генетика). Алматы, 2010. 21 с.
69. Курманов Б.К. Генетические маркеры предрасположенности к раку пищевода // Автореферат дисс. на соискание ученой академической степени доктора философии (Ph.D., генетика), Алматы, 2010. 31 с.
70. Булентаева З.А. Роль генов регуляторов клеточного цикла, апоптоза и детоксикации ксенобиотиков в развитии миокарда // Автореферат дисс. на соискание ученой академической степени доктора философии (биология), Алматы, 2008. 34 с.
71. Dubrova Y.E, Bersimbaev R.I., Djansugurova LB et al. (2002). Nuclear weapons tests and human germline mutation rate // *Science*, **295**. 1307.
72. Salomaa S., Lindholm C., Bersimbaev R.I., Tankimanova M., et al. (2002). Stable chromosome aberrations in the lymphocytes of a population living in the vicinity of the Semipalatinsk nuclear test site. // *Radiation Res.*, **158**. 591-596.
73. Bolegenova N.K., Bekmanov B.O., Djansugurova L.B., Bersimbaev R.I., Salama S.A., Au W.W. (2009). Genetic polymorphisms and expression of minisatellite mutations in a 3-generation population around the Semipalatinsk nuclear explosion test-site, Kazakhstan // *Int.J.Hyg. Environ. Health*. **212**. 654-660.
74. Bersimbaev R.I, Lindholm C., Dubrova Y.E et al., Minisatellite mutations and biodosimetry of population living close to the Semipalatinsk nuclear test site. // In: Workshop on Dosimetry of the Population Living in the Proximity of the Semipalatinsk Atomic Weapons Test Site. STUK – A 187, STUK-Radiation and Nuclear Safety Authority, Helsinki, p. 40-47, 2002.
75. Хандогина Е.В. (2010). Изучение генетического контроля радиочувствительности. // *Генетика*. **46**. 293-301.
76. Васильев С.А., Тимошевский В.А., Лебедев И.Н. (2009). Анеугенный эффект ионизирующего излучения в соматических клетках млекопитающих и человека. // *Генетика*. **45**. 1589-1599.
77. Ахматуллина Н.Б. (2010). Действие малых доз ионизирующих излучений на человека. // В книге: От генетики вирусов до генетики человека. Алматы. С.231-253.
78. Берсимбай Р.И. (2009). Медицинская геномика: некоторые достижения и проблемы. // *Вестник ЕНУ (серия естественных наук)*, **№ 2**, с.128-134.
79. Жапбасов Р.Ж. (2010) Современное состояние цитогенетики домашних животных и диких млекопитающих из различных природно-климатических и экологически неблагоприятных районов Казахстана // В кн.: Современное состояние генетики в Казахстане. Материалы конференции Алматы. с.23-26.
80. Abugaliev S., Ledovskoy Yu., Abugaliev A., Quarrie S., Turuspekov Ye. (2010). Mapping of quantitative traits loci for grain protein content in common wheat // *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology (Global Science Book)*. **4**. 35-41.
81. Ledovskoy Y., Abugaliev S., Turuspekov Y. (2010). Comparative Assessment of the Genetic Variation in Wild and Cultivated Barley Based on SSR Markers // *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. **4**. 21-26.
82. Turuspekov Y., Beecher B., Darlington Y., Bowman J., Blake T.K., Giroux M.J. (2008). Hardness Locus Sequence Variation and Endosperm Texture in Spring Barley // *Crop Science*. **48**. 1007-1019.