

Рекомбінація у локусах імуноглобулінових генів

В. А. Галицький, С. В. Комісаренко

Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

volha@biochem.kiev.ua, svk@biochem.kiev.ua

Перебіг рекомбінації у локусах імуноглобулінових генів чітко координується генною мережею диференціації лімфоцитів. Клітинні мікроРНК можуть, на наш погляд, забезпечувати при цьому алейне виключення за рахунок мікроРНК-опосередкованого метилювання ДНК та брати участь у перенацілюванні активності рекомбіназ з локусів генів важких імуноглобулінових ланцюгів на локуси генів легких ланцюгів.

Ключові слова: локус імуноглобулінового гена, лімфоїдна клітина, мікроРНК, алейне виключення.

Вступ. Центральною подією В-лімфопоезу є утворення генів важкого та легкого імуноглобулінових ланцюгів. Фрагменти цих генів розташовуються у доволі протяжних ділянках геному – локусах зі складною структурою. Зокрема, локус гена важкого імуноглобулінового ланцюга у геномі миші знаходиться на 12-й хромосомі та займає ділянку у 58 сантиморганід (сМ) довжиною $3,3 \cdot 10^6$ пар нуклеотидів (п. н.) між розташованим у точці $108,5 \cdot 10^6$ п. н. 3'-енхансером та позицією $111,85 \cdot 10^6$ п. н., де розміщений перший ген, що не є V-фрагментом [1]. Він включає вісім константних фрагментів, а саме – $C_1, C_2, C_3, C_4, C_{1b}, C_{2b}, C_{2a}, C_3$ та C_4 , що загалом позначаються як C_H ; чотири з'єднувальних (J_H), а також 10–13 D_H - та приблизно 150 V_H -фрагментів, які відповідають варіабельним ділянкам важкого імуноглобулінового ланцюга (рис. 1) [1]. Локус гена легкого -ланцюга, який містить один константний (C_L), приблизно 85 варіабельних (V_L) а також чотири з'єднувальних (J_L) фрагменти, у геномі миші

розташований на 6-й хромосомі у ділянці 30,0 сМ. Локус гена легкого -ланцюга (згідно з даними Entrez Gene, відповідно чотири C_L -, три V_L - та чотири J_L -сегменти) знаходиться на 16-й хромосомі у ділянці 13,0 сМ (рис. 1). У геномі людини локус гена важкого імуноглобулінового ланцюга розташований на 14-й хромосомі, - та -ланцюгів – відповідно на 2-й та 22-й хромосомах.

Цілісний ген з'являється в результаті унікального для клітин вищих організмів процесу – V-(D)J-рекомбінації, тобто сплайсингу ДНК у зазначених локусах, внаслідок чого випадково обраний V-фрагмент із числа наявних у локусі з'єднується з одним із J-фрагментів при формуванні генів легких ланцюгів, а при формуванні генів важких ланцюгів – з DJ-фрагментом, який утворився внаслідок аналогічної рекомбінації D- та J-фрагментів. Випадковість вибору даних сегментів при перебудові локусу, а також можливість вставки при цьому неоднозначного числа нуклеотидів між ними лежать в основі розмаїття, властивого організмам антитіл [2]. Варто, втім, уточнити,

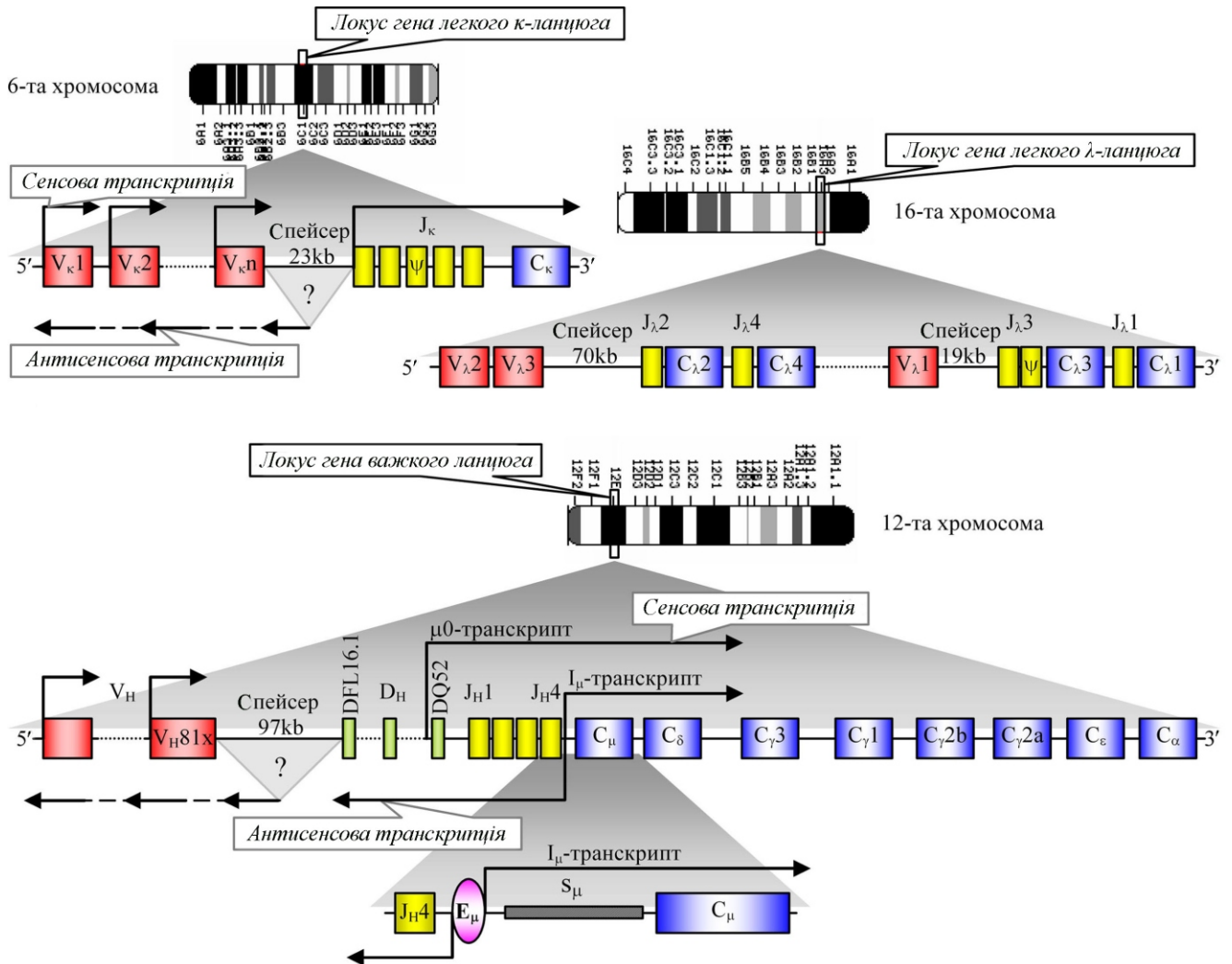


Рис. 1. Будова локусів імуноглобулінових генів у миші до рекомбінації, сенсорна та антисенсорна транскрипція у них (характер транскрипції у локусах - та -ланцюгів схожий; - псевдогенний фрагмент)

що згадана випадковість рекомбінації генних фрагментів не є абсолютною – чим ближче V_H-фрагмент розташований до ділянки D_H-фрагментів, тим частіше він бере участь у рекомбінації.

Рамки перебігу процесу рекомбінації суворо контролюються. У клітині можлива поява лише одного функціонуючого гена кожного з ланцюгів імуноглобулінової молекули, завдяки чому досягається моноспецифічність антитіл, що нею синтезуються. Випадковість процесу рекомбінації призводить до того, що в клітині можуть формуватися недієздатні гени – тоді такі клітини зазнають апоптозу. Гинуть і клітини, які сформували гени автореактивних імуноглобулінів. У даній статті ми

розглянемо можливі механізми координації подій у локусах імуноглобулінових генів. Відзначимо, що гени ланцюгів Т-клітинних рецепторів формуються у результаті перебудови локусів, які містять їхні фрагменти, загалом аналогічного процесу рекомбінації у В-клітинах.

Механізм перебудови локусів імуноглобулінових генів. Можливість участі генних сегментів у V-(D)J-рекомбінації опосередковується фланкуючими їх особливими висококонсервативними нуклеотидними послідовностями – RSS (recombination signal sequence). Кожна RSS складається з паліндромного гептамеру (консенсусний мотив CACAGTG) та A/T-багатого нонамеру (кон-

сенсусний мотив АСAAAAACC), розділених спейсерною послідовністю, що має сталу довжину або 12, або 23 п. н та, отже, відповідає або одному, або двом виткам спіралі ДНК. Рекомбінувати між собою можуть лише ті пари генних сегментів, які несуть RSS з неоднаковою довжиною спейсера (так зване правило 12/23) [2]. Відповідно кожний D_H -фрагмент фланкований з обох боків RSS з одновитковим спейсером, а кожний V_H -сегмент з 3'-кінця та J_H -сегмент з 5'-кінця (тобто з боку, що межує з D_H -фрагментом) фланковані RSS з двовитковим спейсером. У локусах генів легких ланцюгів картина інша. RSS з одновитковим спейсером несе кожний з V - та J -фрагментів, а RSS з двовитковим спейсером – кожний з V - та J -фрагментів. Зазначимо, що на 5'-кінці V-фрагмента знаходяться його промотор (у локусі гена важкого ланцюга він починає функціонувати, опиняючись після V-DJ-рекомбінації під контролем енхансера E [3], розташованого в інтроні між останнім з J-сегментів та s -ділянкою C -сегмента), сайти зв'язування окремих транскрипційних факторів з числа тих, що функціонують у B-клітині (Pu.1, Ikaros, Pax-5, NF- B, NF-AT та ін.), а також екзон, який кодує лідерну амінокислотну послідовність імуноглобулінового ланцюга [1].

При рекомбінації дві неоднакові RSS, що належать випадково обраним генним фрагментам, розпізнаються рекомбіназами Rag-1 і Rag-2 з подальшим зближенням фрагментів [3]. Рекомбінази вносять одноланцюгові розриви ДНК у точках з'єднання RSS з кодуючою послідовністю. При цьому розривається той з ланцюгів, у якому 3'-нуклеотид у місці розриву належить не RSS, а кодуючій послідовності, і вивільнена 3'-ОН група дезоксирибози даного нуклеотиду атакує фосфодієфірний зв'язок, який у комплементарному ланцюзі поєднує RSS з кодуючою послідовністю. В результаті фрагмент ДНК, фланкований RSS, відокремлюється, а на кінці кожної з рекомбінуючих кодуючих послідовностей нуклеотида крайньої комплементарної пари з'єднуються між собою фосфодієфірним зв'язком, формуючи шпильку замість двохланцюгового розриву [4]. Зазначена шпилька надрізається ендонуклеазою у випадковому місці, необов'язково у точці свого замикавання,

тому один з ланцюгів, розгортаючись, може виявитися довшим, аніж комплементарний, що створює можливість певної зміни довжини кодуючої послідовності ДНК внаслідок комплементарного додавання до коротшого ланцюга необхідних нуклеотидів (P-ділянка) або відщеплення екзонуклеазою декількох нуклеотидів від довшого ланцюга [5, 6]. Також до 15 нуклеотидів (N-ділянка) може бути додано при рекомбінації нематрично до кінців кодуючих послідовностей V-, D- та J-сегменти термінальною дезоксирибонуклеотид-трансферазою [5]. Після цього сегменти кодуючих послідовностей ДНК лігуються один з одним ферментами клітинної системи репарації дволанцюгових розривів ДНК (одночасно і вирізаний фрагмент замикається у кільце, оскільки гептамери фланкуючих його RSS теж з'єднуються один з одним) [7]. Неоднозначність сполучення кодуючих генних сегментів, обумовлена навмисною неточністю їхнього поєднання та наявністю P- і N-ділянок у перебудованій послідовності гена імуноглобулінового ланцюга, різко підвищує спектр розмаїття можливих антитіл, фактично роблячи кожне з них неповторним.

Зауважимо, що V-(D)J-перебудова своєю суттю нагадує інші рекомбінаційні процеси, зокрема, вирізання транспозонів [4]. Уже досить давно запропоновано гіпотезу, що в гени – попередники імуноглобулінів та T-клітинних рецепторів – у ході еволюції вбудувалися транспозони, розбивши їх на окремі сегменти, які в подальшому, дуплікуючись та зазнаючи мутацій, утворили відповідні генні локуси [8]. Однак лише недавно показано, що RSS насправді походять від кінцевих інвертованих повторів транспозонів надродина *Transib*, а каталітична ділянка рекомбінази Rag-1 є досить схожою на транспозазу, яка кодується транспозонами зазначеної надродина [9]. Таким чином, послідовності у локусах імуноглобулінових генів можуть розглядатися як нащадки неавтономних транспозонів.

Узгодження подій у локусах імуноглобулінових генів з процесом диференціації B-клітин. У нелімфоїдних клітин усі локуси генів важких та легких імуноглобулінових ланцюгів перебувають у складі гетерохроматину на периферії ядра, тобто в оточенні, яке вважається транскрипційно репре-

сивним. ДНК неактивних локусів імуноглобулінових генів метильована. У попередників В-лімфоцитів (стадія пре/проВ-клітин), що готуються до реаранжувань у локусах генів важких імуноглобулінових ланцюгів, обидва алелі цих локусів під впливом сигналу від рецептора інтерлейкіну-7 (IL-7) вилучаються з ядерної периферії та переміщуються у центральну частину ядра, в еухроматиновий компартмент. Дане репозиціонування алелів призводить в обох локусах до деметилування ДНК, усунення H3K9-метильних міток, ацетилювання гістонів H3 і H4 та, що теж важливо, до наступної сенсової і антисенсової транскрипції неперобудованих алелів з утворенням некодууючої РНК [10].

Сукупність цих подій є достатньою для подальшого здійснення на стадії проВ-клітин завершального етапу – процесу збирання гена важкого імуноглобулінового ланцюга (V-DJ-рекомбінації) за умови стискання локусів, яке регулюється одним із ключових транскрипційних факторів, відповідальних за В-лімпопоез, – білком Рах-5 [11].

Отже, V-(D)J-перебудова координується спільним впливом фактора Рах-5 (даний транскрипційний фактор потрібний також для зняття H3K9-метильних міток з V-фрагментів), сигналу від рецептора IL-7 та ще одного білка – Ezh2, який контролює полімеризацію ядерного актину, що й здійснює фізичне стискання локусу [12]. Процес стискання зачіпає обидва алельних локуси, в результаті у кожному з них дистальні V-фрагменти і вже рекомбінований DJ-сегмент (D-J-перебудова, причому в обох алельних локусах, проходить на ранніх стадіях лімпопоезу, зокрема, є відомості, що ще на стадії ELP – ранніх лімфоїдних попередників, early lymphoid progenitor [13]) розташовуються поруч за рахунок утворення петлі ДНК. V-DJ-реаранжування, втім, при цьому відбудеться лише в одному з алелів. Аналогічно, переміщення в еухроматиновий компартмент та стискання локусів здійснюються при підготовці до збирання генів легких ланцюгів у малих преВ-клітин (див. нижче).

Зазначимо, що ацетилювання гістонів і подальше звільнення сайтів RSS від нуклеосом є необхідними для протікання V-DJ-рекомбінації та за-

лежать від хроматин-ремоделюючих факторів родини SWI/SNF, зокрема BRG1. Однак на сьогодні невідомо, який саме фактор приваблює хроматин-ремоделюючі комплекси до ділянки V-фрагментів [14].

Після успішного V-DJ-реаранжування дозріваюча клітина переходить на наступну стадію диференціації – стадію великих преВ-клітин (преВІ-клітин). При цьому важкий ланцюг з'являється на мембрані у складі преВ-клітинного рецептора (pre-BcR), сигнал від сигнального модуля якого, представленого трансмембранними білками Ig (CD79a) та Ig (CD79b), активує протеїнкіназу В-залежний антиапоптозний каскад, чим не лише запобігає загибелі дозріваючого лімфоцита, а й спричиняє вступ клітини у 3–5 циклів поділу, на цей період пригнічуючи експресію рекомбіназ Rag-1 і Rag-2 [15].

Поява сигналу від pre-BcR також викликає де-контракцію локусів, деацетилювання гістонів і припинення транскрипції сенсового та антисенсового ланцюгів ДНК в обох алельних локусах. Показано, що переміщення локусу гена важкого ланцюга в репресивний перицентромерний гетерохроматин відбувається у відповідь на отримання сигналу від pre-BcR через пригнічення останнім сигналізації від рецептора IL-7 [16]. При цьому не всі модифікації гістонів, наявні до моменту вилучення локусів з гетерохроматину, відновлюються, зокрема, H3K9-мітки не наносяться, що, втім, не заважає одному з алелів (неперобудованому або перебудованому з виникненням невірної рамки зчитування) повернутися до складу гетерохроматину.

Якщо збирання здатного до експресії гена важкого ланцюга закінчилося невдачею (виявилася некоректна рамка зчитування, що трапляється у 2/3 перебудов), здійснюється спроба реаранжування алельного локусу генів. Відомо, що приблизно у половини В-клітин, які експресують важкий ланцюг, в алельному локусі відбулася лише D-J-перебудова (клітини мають генотип VDJ^+/DJ), тоді як в іншій половині клітин в алельному локусі мало місце непродуктивне VDJ-реаранжування (клітини VDJ^+/VDJ^-) [14]. Сигнал від мембранозв'язаної форми важкого ланцюга є достатнім і критично необхідним для попередження реаранжування алель-

ного локусу гена важкого ланцюга. Якщо за рахунок мутації усунути трансмембранну ділянку важкого ланцюга в одному з алелів, що унеможливить його перебування у складі pre-BcR на клітинній мембрані, то виключення інтактного алельного локусу у гетерозигот не відбудеться, натомість спостерігатиметься його реаранжування та поява В-лімфоцитів з двома продуктивними алелями важкого ланцюга (VDJ⁺/VDJ⁺) [14]. Ці явища пояснюються тим, що сигнал від pre-BcR пригнічує сигналізацію від рецептора IL-7, яка є необхідною для вилучення локусу гена важкого ланцюга з периферії ядра, де панує репресивне гетерохроматинове оточення, та індукції доступності даного локусу для рекомбіназ. У разі невдалої перебудови обох наявних у клітині локусів (VDJ/VDJ), про що буде свідчити відсутність експресії pre-BcR і, відповідно, антиапоптозного сигналу від нього, дозріваюча В-клітина гине.

У клітинах, де успішно перебудувалися локуси генів важкого ланцюга імуноглобулінів, активність рекомбіназ після відновлення експресії їхніх генів перенацілюється на локуси генів легких ланцюгів (див. наступний розділ), що теж є складовим елементом запобігання збиранню алельного гена важкого ланцюга. При цьому на стадії малих преВ-клітин (преВІІ-клітин) рекомбінації зазнає спершу один з двох алельних локусів гена -ланцюга імуноглобуліну, і лише в разі невдачі рекомбінації обох цих локусів перебудовується один, а при наступній невдачі – другий алельний локус гена -ланцюга [14]. При цьому передчасній загибелі дозріваючої Т- або В-клітини перешкоджає вплив IL-7, що тимчасово компенсує – через активацію протеїнкінази В – наростаючий дефіцит клітинного антиапоптозного фактора Bcl-2.

Процес збирання гена легкого -ланцюга має ту особливість, що ДНК лише одного з алельних локусів втрачає метильні мітки, у той час як ДНК іншого локусу залишається метильованою, хоча перед реаранжуванням обидва локуси теж зазнають репозиціонування, вилучення маркерів репресії з гістонів та активної сенсової і антисенсової транскрипції з утворенням некодуєчої РНК [17]. Локус, ДНК якого залишилася метильованою, повертається до складу гетерохроматину перед ре-

аранжуванням в алельному, повністю звільненому від міток репресованого хроматину, локусі. У разі вдалої перебудови останнього алельний локус легкого ланцюга залишиться репресованим назавжди. Після реаранжування некодуєча транскрипція сенсового і антисенсового ланцюга ДНК у локусах генів легких ланцюгів теж припиняється [17].

У випадку успішної перебудови одного з локусів гена легкого ланцюга на мембрані клітини з'являється мембранозв'язана форма імуноглобуліну М (mIgM), що знаходиться в складі В-клітинного рецептора (BcR). Сигнал від повноцінного IgM припиняє спроби перебудови інших алельних локусів та попереджає загибель В-лімфоцита на стадії незрілих В-клітин (AA4⁺mIgM⁺mIgD⁻). Але якщо BcR виявляється автореактивним, у клітині реактивуються гени рекомбіназ Rag-1 і Rag-2, завдяки чому здійснюється спроба редагування гена легкого ланцюга імуноглобуліну внаслідок нової рекомбінації у локусі гена -ланцюга імуноглобуліну та при невдачі – в алельному локусі, що дозволяє виробити толерантність до власних антигенів організму з найменшими втратами клітин [14]. У той же час редагування гена важкого ланцюга не відбувається, оскільки внаслідок V-DJ-рекомбінації разом із D-сегментами втрачаються RSS [14].

Лімфоцити, які експресують толерантний до власних антигенів організму BcR, залишають червоний кістковий мозок та продовжують дозрівання у селезінці, де переходять у стадію зрілих В-клітин (CD19⁺AA4⁻mIgM⁺mIgD⁺) і зрештою приєднуються до популяції периферійних В-лімфоцитів. При цьому, оскільки клітини виходять з мікрооточення, яке презентує IL-7, сигналізація від рецептора IL-7 припиняється, що спричиняє остаточну інактивацію генів рекомбіназ Rag-1 і Rag-2. У зрілих В-клітин непродуктивні імуноглобулінові локуси – один з алельних локусів гена важкого ланцюга та три з чотирьох локусів генів легкого ланцюга – репресовані і знаходяться у складі перичентромерного гетерохроматину.

Зазначимо, що наявні у локусі гена важкого ланцюга до моменту перемикання класу синтезованого імуноглобуліну сегменти С та С розташовуються близько один від одного, будучи розділени-

ми спейсерною послідовністю довжиною всього 5 тис. п. н. Первинний транскрипт такого локусу містить послідовності, зчитані з обох згаданих сегментів, причому кожна з них несе по два сайти поліаденілювання, першим з яких закінчується екзон, що кодує розчинну форму відповідного імуноглобуліну, а другим – мембранозв'язану. Розщеплення такого первинного транскрипта по сайтах поліаденілювання та наступний альтернативний сплайсинг дають змогу зрілим В-клітинам синтезувати мембранозв'язану, а плазмоцитам – розчинні форми IgM і IgD одночасно.

Перенацілювання активності рекомбіназ з локусів генів важких імуноглобулінових ланцюгів на локуси генів легких ланцюгів. Після успішної V-DJ-перебудови та появи сигналу від pre-BcR клітина переходить на наступну після стадії проВ-клітин стадію преВІ-клітин, на якій продовжують діяти ті ж транскрипційні фактори, що й раніше – E2A, EBF-1 і Pax-5. Однак сигнал від pre-BcR якимось чином перериває сигналізацію від рецептора IL-7 [16]. Відбувається швидке пригнічення активності генів рекомбіназ Rag-1 і Rag-2 на транскрипційному та рекомбінази Rag-2 ще й на постраскрипційному рівнях [15]. Інші транскрипційні фактори, IRF4 та IRF8, активовані, як вважають, все тим же сигналом pre-BcR, залучаються транскрипційними факторами Pu.1 та Spi-B до енхансерів у локусах генів легких імуноглобулінових ланцюгів, стимулюючи їхню транскрипцію та репозиціонування в еухроматин. Білки IRF4 і IRF8 також спільно завершують сприйняття преВІ-клітиною (CD24⁺CD43⁻) сигналу від pre-BcR. До цього причетний Ikaros (згідно з останніми уточненнями, pre-BcR за участі адапторного білка SLP-65 залучає Ikaros-споріднений білок Aiolos), який, функціонує в даному разі як транскрипційний репресор, витісняє фактори E47 та EBF-1 із сайтів зв'язування в регуляторних ділянках генів компонентів 5 і *VpreB* сурогатного легкого ланцюга (оскільки сайти зв'язування білків E47 та EBF-1 з одного боку та фактора Ikaros – з іншого перекриваються) і «приваблює» хроматин-ремоделюючі комплекси NuRD і SWI-SNF, які деацетилюють і метилюють гістони та стійко інактивують зазначені гени [18]. Натомість, відомо,

що фактор Ikaros формує містки між генами 5 і *VpreB* та перицентромерним гетерохроматином; можливо, це полегшує доступ до даних генів комплексів, які беруть участь у ремоделюванні хроматину та репресії транскрипції [18]. Внаслідок втрати сурогатного легкого ланцюга сигнал від pre-BcR перестає надходити.

У результаті сукупності цих подій клітина переходить на наступну стадію дозрівання – стадію преВІІ-клітин, під час якої завдяки припиненню сигналізації від pre-BcR відновлюється надходження сигналу від рецептора IL-7, через що поновлюється експресія генів рекомбіназ Rag-1 і Rag-2 та відбувається друга головна подія В-лімфопоезу – збирання гена легкого імуноглобулінового ланцюга. Зауважимо, що за той період, поки активність рецептора IL-7 та рекомбіназ була пригнічена, сталося повернення неперебудованого локусу генів важкого ланцюга в гетерохроматин та репозиціонування і дерепресія локусів генів легкого ланцюга.

Експресія генів рекомбіназ Rag-1 і Rag-2 на стадії проВ-клітин критичним чином залежить від фактора Foxp1, здатного зв'язуватися з енхансером Erag. У разі інактивації Foxp1 перехід дозріваючих лімфоїдних елементів зі стадії проВ-клітин на стадію преВІ-клітин неможливий [19]. З огляду на це ми вважаємо за можливе запропонувати механізм тимчасової та остаточної інактивації генів рекомбіназ під час лімфопоезу, що передбачає участь мікроРНК.

Однак спершу розглянемо механізм участі останніх у регуляції експресії генів.

Як показано недавніми дослідженнями, пригнічення експресії гена може бути викликане не лише репресорами білкової природи, а й інтерферуючими РНК (RNAi), до яких належать короткі інтерферуючі РНК (siRNA) та мікроРНК (miRNA). Попередники останніх (pri-miRNA), зчитані з власних генів у клітині, утворюють недосконалі шпильки, які спочатку перетворюються під впливом ядерної рибонуклеази III Droscha на дволанцюгові pre-miRNA довжиною близько 60 п. н. [20]. У цитоплазмі pre-miRNA потрапляють завдяки активному транспорту за участі експортину 5 і там на решті розщеплюються ендорибонуклеазою III Dicer на фрагменти довжиною близько 22 нуклео-

тидів [21]. Останні долучаються до комплексів RISC (RNA interfering silencing complex), де розплітаються за допомогою білка родини Argonaute і стають зрілими miRNA, які беруть участь у регуляції експресії генів еукаріотних клітин, зв'язуючися з комплементарними ділянками їхніх мРНК, що в рослинних клітин викликає руйнування мРНК і, отже, сайленсинг генів [22].

Посттранскрипційний miRNA-залежний сайленсинг у тваринних клітинах має певні особливості. По-перше, для нього достатньо, щоб з мРНК-мішенню взаємодіяв не увесь ланцюг молекули miRNA, як у рослинних клітин, а так звана seed-ділянка – послідовність з 1-го або 2-го по 7-й чи 8-й нуклеотид на 5'-кінці miRNA. У цьому випадку miRNA діє у складі miRNA-рибонуклеопротеїну (miRNP – miRNA-ribonucleoprotein) та спричиняє не розщеплення мРНК, а пригнічення її трансляції після стадії ініціації. Є чотири основних типи seed-ділянки: секстимерна (6mer), утворена нуклеотидами з 2-го по 7-й, септимерна m8 (7mer-m8) – з 2-го по 8-й, септимерна 1A (7mer-1A) – з 1-го по 7-й, та октамерна (8mer) – з 1-го по 8-й, причому в обох останніх випадках у сайті зв'язування miRNA першим нуклеотидом з 3'-кінця є аденін [23]. Коли взаємодія seed-ділянки з мішенню виявляється неповною (seed-ділянка є надто короткою, утворює петлю чи містить нуклеотиди, некомплементарні мішені), miRNA все ж може проявити свою функцію – за умови, що кілька з її нуклеотидів у положенні 12–17 також спаряться з мішенню [23].

По-друге, miRNA у тваринних клітинах проявляє свій ефект, взаємодіючи з сайтами у 3'-кінцевій нетрансльованій області (3'-UTR – 3'-untranslated region) молекули РНК, але не в ділянці 5'-UTR чи стартового кодону. Більше того, 3'-UTR-сайти miRNA повинні бути віддалені не менш як на 15 нуклеотидів від стоп-кодону [23]. Ці ефекти мають досить банальне пояснення – оскільки із сайтом у послідовності-мішені спарюється не вся молекула miRNA, а лише її seed-ділянка та іноді ще кілька нуклеотидів, розташованих на 3'-кінці, рибосома, протягуючи матричну РНК крізь себе під час трансляції, здатна легко відділити приєднані miRNA, і тому останні можуть проявляти свій вплив лише за

рахунок прикріплення у тих ділянках РНК-мішені, які не взаємодіють з рибосомами [23].

На наш погляд, інактивація генів рекомбіназ може бути зумовлена тим, що мРНК фактора Foxp1 зазнає miRNA-залежного посттранскрипційного сайленсингу. Ми виявили *in silico* за допомогою програмного пакету TargetScan 4.0 (<http://www.targetscan.org>) у 3'-UTR-ділянці даної мРНК висококонсервативний сайт зв'язування miRNA miR-181 типу 7mer-m8 та консервативний сайт зв'язування miRNA miR-150 теж типу 7mer-m8 (рис. 2).

У той же час відомо, що експресія miR-181 проявляється уже в недиференційованих клітинах кісткового мозку і підвищується у В-клітинах (в зрілих В-лімфоцитах вона припиняється), а експресія miR-150 перебуває на високому рівні в зрілих Т- та В-клітинах [24]. Це може означати, що тимчасова інактивація генів рекомбіназ на стадії преВІ-клітин обумовлена сайленсингом мРНК фактора Foxp1 через вплив miR-181 за відсутності активної експресії гена *Foxp1*, викликаній тимчасовим зникненням сигналу від рецептора IL-7. Даний механізм може відігравати важливу роль у перенацілюванні активності рекомбіназ з локусів гена важкого імуноглобулінового ланцюга на локуси генів легкого ланцюга (рис. 3). Остаточна інактивація генів рекомбіназ у зрілих В-лімфоцитів обумовлена, як нам здається, у тому числі і сайленсингом мРНК фактора Foxp1 через вплив miR-150. Водночас у мРНК безпосередньо генів рекомбіназ Rag1 і Rag2 сайтів зв'язування даних miRNA нами не виявлено.

Соматичні гіпермутації і перемикання класу імуноглобулінів. Відповідь зрілих В-лімфоцитів на антигенну стимуляцію залежить від їхньої локалізації – В-клітини крайової зони та деяке число фолікулярних В-лімфоцитів відразу диференціюються у плазмоцити, які виробляють низькоафінні антитіла. Термін їхнього життя невеликий – протягом приблизно 1 тижня вони зазнають апоптозу. Інші фолікулярні В-клітини після антигенної стимуляції завдяки швидкому зростанню рівня транскрипційного фактора Vcl-6 певний час проліферують у зародкових центрах лімфовузлів. При цьому афінність їхніх BcR змінюється і в пев-

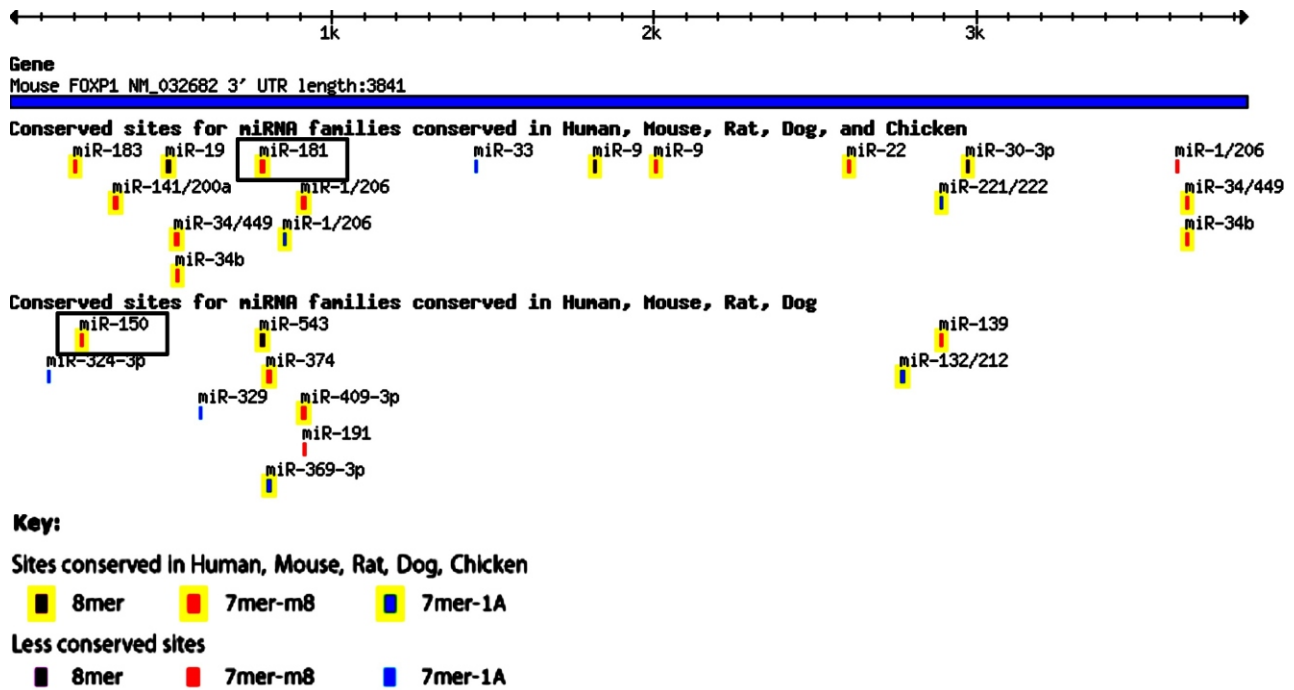


Рис. 2. Консервативні та висококонсервативні сайти зв'язування miRNA в 3'-UTR-ділянці мРНК гена *Foxp1*. Сайти miR-181 і miR-150 позначено прямокутниками

ної кількості клітин стає високою внаслідок соматичних гіпермутацій у генах імуноглобулінових ланцюгів – фактор IRF4, що експресується під впливом Рах-5 на низькому рівні, викликає експресію гена *Aicda*, який кодує білок AID – цитидин-дезаміназу – необхідний для здійснення соматичних гіпермутацій та перемикання класу імуноглобуліну. Під впливом цитидин-дезамінази залишки цитозину в ДНК втрачають аміногрупу, стаючи залишками урацилу; оскільки останній комплементарний аденіну, то подальша реплікація ДНК може призводити до заміни пари цитозин–гуанін парою тимін–аденін за умови невтручання системи репарації ДНК, що розпізнає дезаміновані нуклеотиди. При цьому частота мутацій у ДНК, яка кодує варіабельні ділянки імуноглобулінових ланцюгів, зростає у 10^5 разів по відношенню до спонтанного рівня, досягаючи значення 10^{-3} на кожен пару нуклеотидів [25].

Враховуючи, що варіабельні ділянки легкого та важкого ланцюгів кодують загалом 600 п. н., за таких умов одна мутація у них припадає в середньому на кожних два клітинних цикли. Крім того, під

впливом нез'ясованого механізму соматичні гіпермутації в основному концентруються в ДНК, що кодує гіперваріабельні ділянки як легких, так і важких імуноглобулінових ланцюгів [25].

Антигенна стимуляція у поєднанні із впливом цитокінів, зокрема ІЛ-4, часто спричиняє ще одну перебудову ДНК у локусі гена важкого імуноглобулінового ланцюга – рекомбінацію функціонуючого VDJ-сегмента з одним із генних C_H -фрагментів, розташованих за С - та С -фрагментами, внаслідок чого імуноглобулін, зберігаючи свою антигенну специфічність, змінює клас (ізотип) з ІgM/ІgD на ІgG3, ІgG1, ІgG2b, ІgG2a, ІgE або ІgA. Даний процес опосередковується послідовностями, названими ділянками перемикання (s-ділянками – від англ. switch regions), розташованими в інтроні біля 5'-кінця кожного із C_H -сегментів (окрім С). Ці послідовності складаються з множинних коротких повторів (GAGCT та TGGGG) і мають значну довжину – від 2 до 10 тис. п. н. Взаємодіючи з s-ділянкою генного С-сегмента, який кодує константну область молекули ІgM (див. рис. 1), одна з s-ділянок, що фланкує віддаленіші C_H -сегменти,

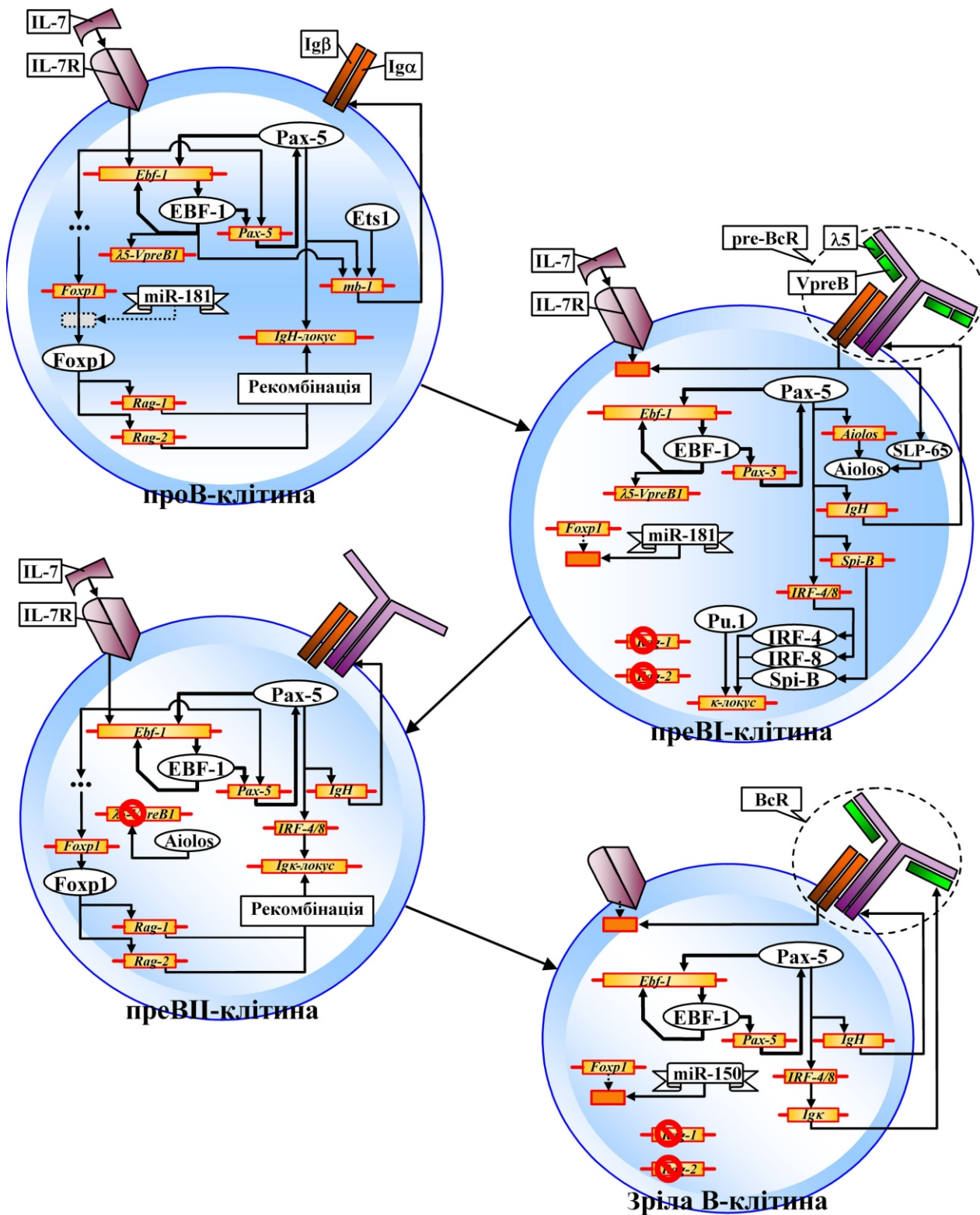


Рис. 3. Участь miRNA miR-181 і miR-150 у регуляції експресії генів рекомбіназ

обумовлює формування та подальше вирізання особливою перемикаючою рекомбіназою (switch recombinase) петлі, яка включає ДНК, розташовану між взаємодіючими ділянками. У цю петлю потрапляють, як правило, сегменти, що кодують константні області імуноглобулінів M і D, внаслідок чого нуклеотидна послідовність VDJ-сегмента зазвичай поєднується з послідовністю, відповідальною за C-фрагмент одного з варіантів IgG. У рекомбінованому локусі зберігається s-ділянка між VDJ-та найближчим із C-сегментів, тому можливим є повторний раунд сплайсингу ДНК у константній зоні локусу, зокрема, сполучення VDJ-фрагмента з нуклеотидними послідовностями, які кодують константні ділянки імуноглобулінів E або A.

Перехід В-центроцитів у термінальну стадію спеціалізації – стадію плазмоцитів – призупиняється, доки в них залишається активним фактор Bcl-6, оскільки він пригнічує активність гена *prdm1*, що кодує транскрипційний репресор Blimp-1 – ключовий фактор диференціації плазмоцитів [26]. Невелика кількість таких клітин при цьому під впливом фактора Bcl-6 перетворюється у В-клітини пам'яті. Лише після повторної антигенної стимуляції рівень білка Bcl-6 у В-центроцитах та В-клітинах пам'яті різко знижується внаслідок його фосфорилування MAP-кіназою та подальшої убіквітинізації і протеасомної деградації, що сприяє дерепресії гена *prdm1* і, отже, робить вірогідними появу та зростання рівня фактора Blimp-1. Останній, викликаючи диференціацію В-клітин у плазмоцити, зупиняє процес соматичних гіпермутацій та перемикання класу імуноглобулінів, репресуючи гени важливих для нього факторів AID, Stat6 (що є медіатором сигналу рецептора IL-4, який спричиняє експресію транскрипта I 1, необхідного для перемикання ізотипів), субодиниць Ku70 і Ku86 ДНК-протеїнкінази (DNA-PK) [26].

Зазначимо, що в першу чергу повторної антигенної стимуляції і, отже, клональної експансії та перетворення у плазмоцити зазнають ті В-клітини, BcR яких завдяки соматичним гіпермутаціям виявилися високоафінними до антигену.

Антисенсова РНК та алейне виключення у локусах імуноглобулінових генів. Як згадувалося

вище, обидва алелі неперебудованих локусів генів важкого та легкого імуноглобулінових ланцюгів у процесі диференціації В-лімфоцитів активно транскрибуються з утворенням некодуючих РНК. У константній області локусу гена важкого ланцюга у сенсовому напрямку зчитується транскрипт 0, починаючи від промотора PDQ52 (який знаходиться з 5'-боку DQ52 – D_H-сегмента, найближчого до J_H-сегментів), та транскрипт I, починаючи від енхансера E (розташованого, нагадаємо, в інтроні між останнім з J-сегментів та s-ділянкою C-сегмента) – див. рис. 1 [17]. Обидва зазначених транскрипти зазнають сплайсингу з утворенням РНК, що складається з 0- або відповідно I-екзона та C-екзонів. Відмітимо, що утворення 0-транскрипта припиняється після D-J-реаранжування, натомість DJ-сегмент починає продукувати D-транскрипт [17]. У варіабельній області локусу ланцюга у сенсовому напрямку транскрибуються V-фрагменти.

В антисенсовому напрямку до D-J-рекомбінації спостерігається транскрипція D- та J-областей, що теж починається поблизу енхансера E і ним контролюється (рис. 1) [17]. Показано, що за допомогою даної РНК, а також I-транскрипта енхансер E регулює перебіг D-J-реаранжування, ймовірно, ремоделюючи структуру хроматину D- та J-ділянок [17]. Також в антисенсовому напрямку зчитуються міжгенні ділянки у V_H-області. Відповідальний за це регуляторний елемент поки не ідентифікований, але встановлено, що це не промотор PDQ52 і не енхансер E [17]. Крім того, у неперебудованих локусах легких ланцюгів має місце сенсова транскрипція J- та константної областей, а також сенсова і антисенсова – V-області (рис. 1) [14].

Біологічне завдання некодуючих РНК на сьогодні остаточно не з'ясовано. Оскільки їхня транскрипція спостерігається безпосередньо перед рекомбінацією одного з алелів і завершується після неї, передбачається, що вона сприяє деметилюванню ДНК та ацетилюванню гістонів через залучення хроматин-ремоделюючих комплексів [17]. Висловлено думку, що це явище якимось чином пов'язане з алейним виключенням [14]. Зауважимо, що транскрипція нетрансльованої РНК з константної області обох алелів має місце також у зрілих спленоцитів перед зміною класу імуноглобуліну [27].

Достеменний механізм алельного виключення при реаранжуванні локусів імуноглобулінових генів у літературі на сьогодні не розкритий [14]. Зазначимо, що частка зрілих В-клітин, які несуть два продуктивно перебудованих H-алелі (VDJ⁺/VDJ⁺), становить лише 0,01 % [28], причому у цьому випадку один з алелів кодує важкий ланцюг, який з тих чи інших причин не може увійти до складу рге-BcR (і таким чином дозволяє перебудуватись алельному локусу). Дана обставина свідчить, що V-DJ-перебудова в різних алельних локусах відбувається асинхронно. Згідно з однією з висловлених гіпотез, цього можна було б досягти завдяки присутності в клітині необхідних транскрипційних факторів у кількості, недостатній для активації енхансерів та перебудови одночасно обох алелів [14].

Інша можливість полягає начебто в тому, що при рекомбінації втрачається фрагмент ДНК, здатний сприймати певний пригнічуючий сигнал, що з'являється в В-клітині після успішної перебудови одного з алелів – як наслідок, рекомбінований ген залишається активним, а неперебудований локус повинен бути негайно репресованим [14]. Втім, ці гіпотези успішно пояснюють лише те, чому один локус не має зазнавати реаранжування після успішного реаранжування іншого, але остаточно на питання, чому не є можливим одночасне реаранжування усіх наявних у дозріваючій клітині алелів, не відповідають.

Загалом, пояснення механізму алельного виключення та інших феноменів, де проявляється ефект дози гена, становить досить непросте завдання. Далеко не всі гени зазнають алельного виключення, але якщо воно для якого-небудь гена характерне, то буде неодмінно відбуватися у найширшому діапазоні коливань рівня його експресії та регуляторних впливів. Незалежно від кількості алелів (а їх може виявитися при певних захворюваннях і більше двох) у результаті алельного виключення в клітині залишиться активним не більше і не менше одного з них.

Проте, якщо врахувати, що транскрипції, принаймні іноді, як у випадку алельних локусів генів імуноглобулінових ланцюгів, зазнає не лише матричний ланцюг ДНК, але й антипаралельний, та

припустити, що транскрипт одного з них є попередником miRNA (зважаючи на ту обставину, що окремі miRNA кодуються інтронними послідовностями [29]), то ймовірний механізм алельного виключення виявляється доволі простим.

Одним із авторів даної статті нещодавно запропоновано механізм RNAi-опосередкованого транскрипційного сайленсингу [30, 31], який полягає в тому, що RNAi проникає у клітинне ядро, де сканує нуклеотидну послідовність ланцюгів ДНК у міру їхнього розплітання РНК-полімеразою II при транскрипції. Виявивши комплементарну ділянку ДНК, RNAi зв'язується з нею і рекрутує клітинну ДНК-метилтрансферазу DNMT3, яка метилує в ДНК *de novo* цитозин динуклеотидів 5'-CG-3' та тринуклеотидів 5'-CNG-3', спарених з аналогічними сайтами у складі RNAi [30].

На користь запропонованого механізму свідчить нещодавне відкриття ядерного імпорту утвореного RNAi та білком Ago2 комплексу RISC [32], а також здатності мікроРНК miR-320 сприяти асоціації з промотором гена *POLR3D* іншого білка родини Argonaute, Ago1, та триметильованого за лізином-27 гістона H3 [33], що, як відомо, є маркером репресії.

Оскільки РНК-полімераза, транскрибуючи той чи інший ланцюг ДНК, повинна відокремлювати або розщеплювати зв'язані з ним молекули miRNA, внаслідок чого вони можуть не встигати ініціювати метилювання ДНК, ми припустили, що кількості miRNA, зчитаної лише з одного алеля, недостатньо для його репресії *de novo*. Алельне виключення настає через те, що в клітині, де функціонують два чи більше алелів гена, концентрація зчитаної з них miRNA рано чи пізно досягає рівня, за якого РНК-полімераза не встигає відокремити miRNA, спарену з транскрибованим ланцюгом, до того, як вона залучить ДНК-метилтрансферазу та ініціює нанесення метильної мітки на зв'язану ділянку ДНК, модифікування прилеглих гістонів і подальше ремоделювання хроматину (рис. 4) [31]. У підсумку один з алелів мітється маркерами репресії та перестає зчитуватися, тоді як інший зберігає активний статус. Репресованим виявляється той алель, який менш активно звільняється від приєднаної miRNA, тобто слабкіше транскри-

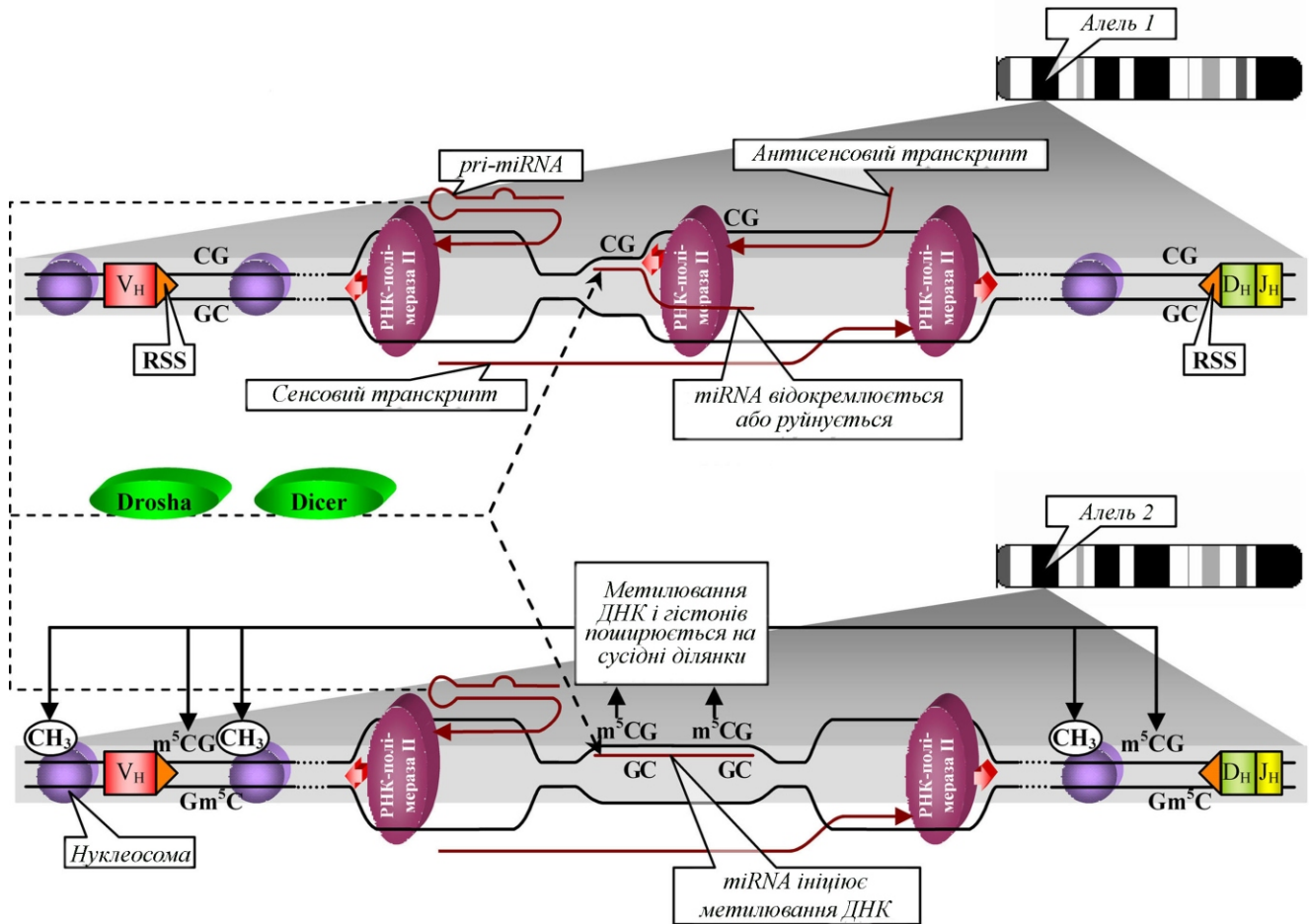


Рис. 4. Гіпотетичний механізм miRNA-опосередкованого алельного виключення локусу імуноглобулінового гена (алель 1 готовий до рекомбінації, алель 2 зазнає репресії)

бується (наприклад, через якісь випадкові особливості утримуючого його та прилеглої хроматину).

Зауважимо, що поріг концентрації miRNA, за якої ініціюється репресія, для кожного з алелів не є якоюсь стандартною величиною, а гнучко налаштовується, стаючи тим вищою, чим активніше транскрибується алель та швидше відділяються гібридизовані з останнім miRNA (рис. 4). Завдяки цьому алельне виключення може встановлюватися при будь-яких рівнях експресії генів, що його зазнають. Важливим наслідком останнього є те, що в ситуації, коли в клітині починає експресуватися інший алель, поріг концентрації miRNA, за якої задається репресія, для цього алеля може виявитися істотно нижчим, аніж для повністю активного алеля, і в граничному випадку концентрація miRNA,

зчитаної з активного алеля, будучи підпороговою для репресії його самого, у той же час уже виявлятиметься надпороговою для алелів, які лише починають експресуватися, що веде до їхнього сайленсингу та встановлення алельного виключення.

Відзначимо також, що попередник miRNA у ході свого синтезу не повинен сам запускати механізми нанесення епігенетичних маркерів, оскільки він прагне утворити шпильку, і його зв'язок із транскрибованим ланцюгом ДНК швидко розривається (рис. 4). Враховуючи ту обставину, що miRNA є похідними мобільних елементів геному класу MITE (miniature inverted-repeat transposable elements) [34], первинне біологічне завдання системи клітинних miRNA полягало, на нашу думку, у захисті стабільності геному завдяки транскрипційно-

му сайленсингу множинних копій транспозонів та інших мобільних елементів. Вочевидь, клітини здатні специфічно знижувати активність множинних копій транспозонів до мінімально можливого рівня, допускаючи транскрипцію максимум однієї з них та використовуючи РНК, зчитану з неї і процесовану за допомогою ендонуклеаз Drosha та Dicer, для мічення усіх інших копій маркерами репресії, окремим випадком чого і є алельне виключення.

Алельне виключення локусів імуноглобулінових генів, як ми вважаємо, здійснюється у вказаний спосіб. Як зазначалося, локуси перед реаранжуванням зазнають активної сенсової та антисенсової транскрипції (див. вище). Імовірно, некодуючий транскрипт V-області і є попередником miRNA (рис. 4). У результаті зв'язування з цією miRNA ДНК в одному з локусів зазнає метилювання, яке поширюється на рекомбінаційні сигнальні послідовності.

У свою чергу, метилювання ДНК, як відомо на сьогодні, прямо перешкоджає діяльності рекомбіназ [35]. Тому реаранжування відбувається лише в одному з алельних локусів і лише у разі його невдачі інший алельний локус буде заново деметильований (через те, що в клітині, яка не отримала функціонального імуноглобулінового гена, не зникне сигнал від рецептора IL-7, який викликає репозиціонування локусів та зняття з них маркерів репресованого хроматину).

Оскільки невдало реаранжований генний локус не може перешкодити дерепресії альтернативного локусу, варто очікувати, що відповідальна за алельне виключення транскрипція неперебудованої V-області регулюється розташованою між найближчими сусідніми V- та (D)J-сегментами спейсерною ділянкою, яка у локусі гена важкого ланцюга розміщується між останнім V_H -сегментом (V_H81x) та першим D_H -сегментом (DFL16.1), маючи довжину 97 тис. н., а в локусах генів легкого ланцюга – між останнім V - та першим J -сегментами або найближчими сусідніми V - та J -сегментами, де її довжина становить відповідно 23 та 19/70 тис. н. (див. рис. 1).

При V-(D)J-рекомбінації ця ділянка завжди втрачається і, таким чином, перестає чинити репресивний вплив на алель. У зазначеному спейсері

могли б знаходитись або енхансер, який координує некодуючу транскрипцію V-області, або промотор цієї транскрипції чи її точка старту, або й ген miRNA та відповідно сайт опосередкованого нею метилювання ДНК.

У разі, коли один з алелів гена важкого ланцюга штучно позбавлений ділянки, яка кодує трансмембранний домен, через що клітина навіть у випадку його успішної рекомбінації не може отримати сигнал від pre-BcR, реаранжування альтернативного локусу проходить за тим же механізмом, як і при невдалій перебудові, і клітина в підсумку отримує генотип VDJ^+/VDJ^+ (див. вище).

Висновки. Рекомбінація генів імуноглобулінових ланцюгів відбувається завдяки перебігу низки подій, що координуються генною мережею диференціації лімфоїдних клітин. Під контролем цієї генної мережі здійснюються послідовне вивільнення локусів імуноглобулінових генів із зон репресованого хроматину, вибір алеля, у якому пройде рекомбінація, перевірка наслідків реаранжування локусу, за результатами якої клітина або переходить на наступну стадію дозрівання, або чинить перебудову алельного локусу чи редагування перебудованого локусу, або, якщо це не призвело до успіху, зазнає апоптозу.

Перенацілювання активності рекомбіназ на локуси генів легкого імуноглобулінового ланцюга забезпечується переведенням неперебудованого алеля гена важкого ланцюга у гетерохроматиновий компартмент, тимчасовою інактивацією генів рекомбіназ на стадії преВІ-клітин (на наш погляд, внаслідок сайленсингу мРНК фактора Foxp1 під впливом miRNA miR-181) і наступним репозиціонуванням в еухроматиновий компартмент локусів генів легких ланцюгів.

Остаточна репресія генів рекомбіназ на стадії зрілих В-лімфоцитів викликається сайленсингом мРНК фактора Foxp1 під впливом miR-150, специфічної для даної стадії.

Алельне виключення локусів імуноглобулінових генів досягається, як нам здається, через транскрипційний сайленсинг одного з них, ініціатором чого виступає miRNA, яка утворюється внаслідок процесингу некодуючого транскрипта алелів і, проникнувши в ядро клітини, зв'язується з їхньою

ДНК. РНК-полімераза, зчитуючи ланцюг ДНК, з яким гібридувалися miRNA, повинна їх відокремити, однак якщо інтенсивність транскрипції низька, miRNA встигають рекрутувати ДНК-метилтрансферази, які в результаті наносять на ДНК маркери репресії. Очевидно, інактивації зазнає алель, що транскрибується менш активно. Алельне виключення виникло в процесі еволюції задля репресії множинних копій мобільних елементів геному.

V. A. Halytskiy, S. V. Komisarenko

Recombination in immunoglobulin gene loci

Summary

Gene network of the lymphoid cell differentiation coordinates precisely the recombination process in immunoglobulin gene loci. In our opinion, cellular microRNAs can contribute to the allelic exclusion through microRNA-directed DNA methylation and participate in retargeting recombinases activity from the gene loci of heavy immunoglobulin chains to the gene loci of light chains.

Keywords: immunoglobulin gene locus, recombination, microRNA, allelic exclusion.

В. А. Галицький, С. В. Комисаренко

Рекомбінація в локусах імуноглобулінових генів

Резюме

Протекание рекомбинации в локусах иммуноглобулиновых генов четко координируется генной сетью дифференциации лимфоцитов. Клеточные микроРНК могут, на наш взгляд, при этом обеспечивать аллельное исключение за счет микроРНК-зависимого метилирования ДНК, а также участвовать в перенацеливании активности рекомбиназ с локусов генов тяжелых иммуноглобулиновых цепей на локусы генов легких цепей.

Ключевые слова: locus иммуноглобулинового гена, рекомбинация, микроРНК, аллельное исключение.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Johnston C. M., Wood A. L., Bolland D. J., Corcoran A. E. Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region // *J. Immunol.*—2006.—**176**, N 7.—P. 4221–4234.
2. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity // *Nature.*—1983.—**302**, N 5909.—P. 575–581.
3. Jung D., Gialourakis C., Mostoslavsky R., Alt F. W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus // *Annu. Rev. Immunol.*—2006.—**24**.—P. 541–570.
4. Grundy G. J., Hesse J. E., Gellert M. Requirements for DNA hairpin formation by RAG1/2 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2007.—**104**, N 9.—P. 3078–3083.
5. Komori T., Sugiyama H. N sequences, P nucleotides and short sequence homologies at junctional sites in VH to VHDJH and

- VHDJH to JH joining // *Mol. Immunol.*—1993.—**30**, N 16.—P. 1393–1398.
6. Jackson K. J., Gaeta B., Sewell W., Collins A. M. Exonuclease activity and P nucleotide addition in the generation of the expressed immunoglobulin repertoire // *BMC Immunol.*—2004.—**5**.—P. 19.
7. Rooney S., Chaudhuri J., Alt F. W. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development // *Immunol. Rev.*—2004.—**200**.—P. 115–131.
8. Sakano H., Huppi K., Heinrich G., Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes // *Nature.*—1979.—**280**, N 5720.—P. 288–294.
9. Kapitonov V. V., Jurka J. RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from *Transib* transposons // *PLoS Biol.*—2005.—**3**, N 6.—P. e181.
10. Corcoran A. E., Riddell A., Krooshoop D., Venkiteswaran A. R. Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor // *Nature.*—1998.—**391**, N 6670.—P. 904–907.
11. Fuxa M., Skok J., Souabni A., Salvaggio G., Roldan E., Busslinger M. Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene // *Genes Develop.*—2004.—**18**, N 4.—P. 411–422.
12. Su I. H., Tarakhovskiy A. Epigenetic control of B cell differentiation // *Semin. Immunol.*—2005.—**17**, N 2.—P. 167–172.
13. Smith E., Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation // *J. Leuk. Biol.*—2004.—**75**, N 6.—P. 973–981.
14. Corcoran A. E. Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion // *Semin. Immunol.*—2005.—**17**, N 2.—P. 141–154.
15. Grawunder U., Leu T. M., Schatz D. G., Werner A., Rolink A. G., Melchers F., Winkler T. H. Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement // *Immunity.*—1995.—**3**, N 5.—P. 601–608.
16. Roldan E., Fuxa M., Chong W., Martinez D., Novatchkova M., Busslinger M., Skok J. A. Locus «decontraction» and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene // *Nat. Immunol.*—2004.—**6**, N 2.—P. 31–41.
17. Bolland D. J., Wood A. L., Afshar R., Featherstone K., Oltz E. M., Corcoran A. E. Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emju // *Mol. Cell. Biol.*—2007.—**27**, N 15.—P. 5523–5533.
18. Sabbattini P., Dillon N. The 5-VpreB1 locus – a model system for studying gene regulation during early B cell development // *Semin. Immunol.*—2005.—**17**, N 2.—P. 121–127.
19. Hu H., Wang B., Borde M., Nardone J., Maika S., Allred L., Tucker P. W., Rao A. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development // *Nat. Immunol.*—2006.—**7**, N 8.—P. 819–826.
20. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing // *Nature.*—2003.—**425**, N 6956.—P. 415–419.
21. He L., Hannon G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation // *Nat. Rev. Genet.*—2004.—**5**, N 7.—P. 522–531.
22. Hutvagner G., Zamore P. D. RNAi: nature abhors a double-strand // *Curr. Opin. Genet. Develop.*—2002.—**12**, N 2.—P. 225–232.

23. Grimson A., Farh K. K.-H., Johnston W. K., Garrett-Engele P., Lim L. P., Bartel D. P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing // *Mol. Cell.*—2007.—**27**, N 1.—P. 91–105.
24. Zhou B., Wang S., Mayr C., Bartel D. P., Lodish H. F. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2007.—**104**, N 17.—P. 7080–7085.
25. Papavasiliou F. N., Schatz D. G. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity // *Cell.*—2002.—**109**, Suppl.—P. S35–S44.
26. Shaffer A. L., Lin K. I., Kuo T. C., Yu X., Hurt E. M., Rosenwald A., Giltman J. M., Yang L., Zhao H., Calame K., Staudt L. M. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program // *Immunity.*—2002.—**17**, N 1.—P. 51–62.
27. Delpy L., Le Bert M., Cogne M., Khamlichi A. A. Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes // *Eur. J. Immunol.*—2003.—**33**, N 8.—P. 2108–2113.
28. Barreto V., Cumano A. Frequency and characterization of phenotypic Ig heavy chain allelically included IgM-expressing B cells in mice // *J. Immunol.*—2000.—**164**, N 2.—P. 893–899.
29. Lin S.-L., Miller J. D., Ying S.-Y. Intronic microRNA (miRNA) // *J. Biomed. Biotechnol.*—2006.—**2006**, N 4.—P. 1–13.
30. Halytskiy V. A. Mechanism of the initiation of DNA methylation *de novo* by small RNA // *Eur. J. Cancer Suppl.*—2007.—**5**, Suppl., N 4.—P. 75.
31. Halytskiy V. A. Hypothesis of initiation of DNA methylation *de novo* and allelic exclusion by small RNAs // *Cell Tissue Biol.*—2008.—**2**, N 2.—P. 97–106.
32. Ohrt T., Mutze J., Staroske W., Weinmann L., Hock J., Crell K., Meister G., Schwillke P. Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC *in vivo* in human cells // *Nucl. Acids Res.*—2008.—**36**, N 20.—P. 6439–6449.
33. Kim D. H., Saetrom P., Snuve O. J., Rossi J. J. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2008.—**105**, N 42.—P. 16230–16235.
34. Piriyaopongsa J., Jordan I. K. A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements // *PLoS One.*—2007.—**2**, N 2.—P. e203.
35. Hsieh C. L., Lieber M. R. CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication // *EMBO J.*—1992.—**11**, N 1.—P. 315–325.

УДК 611.018.1:612.017.11/12
Надійшла до редакції 18.06.08