

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»
Кафедра биохимии
Кафедра биологии
Кафедра химии и фармацевтической химии

***Молекулярные основы
наследственности***

Учебное пособие

Оренбург – 2015

УДК 575.1(075.8)
ББК[28.04+28.070]я73
М75

«Молекулярные основы наследственности»: краткое пособие для студентов по современным вопросам биохимии и биологии процессов анаболизма нуклеиновых кислот и белков в функционирующей клетке. **Под редакцией** заведующего кафедрой биологии, доктора биологических наук, заслуженного работника Высшей школы РФ **Г. Н. Соловых**

Авторы:

С.Н. Афонина - доцент кафедры биологической химии, кандидат медицинских наук

М.М. Павлова - доцент кафедры химии, кандидат биологических наук,

Е.Н. Лебедева - доцент кафедры биологической химии, кандидат биологических наук,

Е.К. Раимова – доцент кафедры биологии, кандидат медицинских наук,

Е.А. Кануникова – доцент кафедры биологии, кандидат медицинских наук,

Е.М. Нефедова- доцент кафедры биологии, кандидат биологических наук

В учебном пособии изложены на современном уровне основные принципы молекулярной биологии, систематизированы имеющиеся сведения о молекулярных механизмах передачи генетической информации, показана взаимосвязь биохимических процессов, лежащих в основе наследственности с возникновением и развитием врожденных заболеваний, а также описаны возможные пути их предупреждения и лечения.

Пособие предназначено для студентов медицинских и фармацевтических вузов.

Рецензенты:

1. Мирошниченко И.В. - зав.кафедрой нормальной физиологии, д.м.н., профессор
2. Цейликман В.Э. - зав. кафедрой биологической химии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ России, д.б.н., профессор

© Оренбургский государственный медицинский университет, 2015

© Коллектив авторов, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

5

| | | |
|------------------|---|-----------|
| РАЗДЕЛ 1. | СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА КЛЕТКИ | 8 |
| 1.1. | Первичная структура нуклеиновых кислот | 8 |
| 1.2. | Структура и функции ДНК | 10 |
| 1.3. | Структура и функции РНК | 17 |
| 1.4. | Основные типы РНК | 19 |
| 1.5. | Функциональные возможности РНК | 23 |
| | Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы | 27 |
| РАЗДЕЛ 2. | МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ | 28 |
| 2.1. | Репликация ДНК | 28 |
| 2.2. | Транскрипция | 36 |
| | Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы | 43 |
| РАЗДЕЛ 3. | БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ | 44 |
| 3.1. | Генетический код | 44 |
| 3.2. | Цитозольный этап биосинтеза белка. | 47 |
| 3.3. | Рибосомальный этап синтеза белка | 49 |
| 3.4. | Посттрансляционные модификации полипептидной цепи | 58 |
| 3.5. | Регуляция экспрессии генов и прокариот | 62 |
| 3.6. | Особенности регуляция экспрессии генов у эукариот | 66 |
| | Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы | 67 |
| РАЗДЕЛ 4. | МУТАЦИИ. ГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ | 69 |
| 4.1. | Генные болезни. | 70 |
| 4.2. | Клинический полиморфизм | 81 |
| РАЗДЕЛ 5. | ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА. ЕГО ОСОБЕННОСТИ И ХАРАКТЕРИСТИКА. | 86 |
| 5.1. | Характеристика генома человека | 86 |
| 5.2. | Особенности организации генома человека | 87 |
| 5.3. | Митохондриальный геном | 95 |
| 5.4. | Геномика микроорганизмов и вирусов | 96 |
| 5.5. | Программа «Геном человека» | 97 |

| | | |
|---------------------------------|--|------------|
| РАЗДЕЛ 6. | ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. УСПЕХИ И ПЕРСПЕКТИВЫ. | 103 |
| РАЗДЕЛ 7. | ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ | 110 |
| 7.1. | Олигонуклеотиды – новый класс синтетических аффинных реагентов | 112 |
| | Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы | 115 |
| СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ | | 116 |
| РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА | | 123 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | | 124 |

ВВЕДЕНИЕ

Главным свойством всех организмов является способность к размножению, т.е. воспроизведению себе подобных. Чтобы из одной родительской клетки образовались две одинаковые дочерние, в основном идентичные родительской, ее делению должно предшествовать удвоение всех ее основных компонентов, в том числе её белков и нуклеиновых кислот.

Среди бесчисленного разнообразия химических веществ, из которых построены живые организмы, белки и нуклеиновые кислоты занимают особое положение.

К числу важнейших научных событий 20 века относится открытие того факта, что генетическая информация кодируется полимерной молекулой ДНК.

Способность клеток поддерживать высокую упорядоченность своей организации зависит, прежде всего, от той генетической информации, которая сохраняется в форме ДНК. **ДНК играет основную роль не только в хранении, но и реализации генетической информации.** Создание двойной спирали ДНК, открытие принципа комплементарности стали важнейшим событием современной биологии. Благодаря этому стало возможным понять принципы функционирования живых систем, а это, в свою очередь, определило стремительность темпов изучения природы и основных путей передачи и реализации генетической информации. В результате выдающихся открытий Дж. Уотсона, Ф. Крика, Х.-Г. Кораны, А. Корнберга и других крупнейших молекулярных биологов, удостоенных Нобелевских премий, уже к середине 60-х годов XX века окончательно утвердился **основной постулат молекулярной генетики:**



Парадигму молекулярной биологии определяет ее центральная догма, которая гласит, что информация может сохраняться или переноситься между нуклеиновыми кислотами, однако перенос информации в белок носит необратимый характер. Генетическая информация записана в последовательности нуклеиновых кислот в виде генов, а за выполнение закодированных в генах функций отвечают белки. Репликация отвечает за передачу генетической информации по наследству, а транскрипция и трансляция отвечают за перевод этой информации из одной формы в другую.

Биологическая роль ДНК заключается в том, что в этой молекуле заключена химическая основа наследственности. Генетическая информация, закодированная в последовательности нуклеотидов, служит двум целям:

- во-первых, она необходима для синтеза новых белковых молекул;
- во-вторых, обеспечивает передачу информации о самой себе в ряду клеточных поколений и поколений организмов.

Генетическая информация, заключенная в ДНК хромосомы, может быть передана либо путем точной репликации, либо с помощью рекомбинации, транспозиции и конверсии. Эти процессы лежат в основе изменчивости организмов, обуславливают их способность к адаптации, однако они могут стать и причиной заболеваний.

Генетическая информация, закодированная в последовательности нуклеотидов ДНК, транскрибируется в ядре в специфические нуклеотидные последовательности молекул РНК.

Иногда молекулы РНК способны к самовоспроизведению или служат промежуточной матрицей при воспроизведении ДНК, но **никогда белок не служит матрицей для синтеза ДНК или РНК**. Синтез ДНК на матрице РНК получил название обратная транскрипция. Обратная транскрипция была предсказана и открыта Г. Теминым (1962) и Д. Рис. Балтимором (1970). Обратная транскриптаза содержится в РНК-ретровирусах. Предполагают, что гены РНК-содержащих вирусов когда-то транскрибировались и встроились в хромосомы протоонкогенов. Они передаются из поколения в поколение не транскрибируясь. Их активация происходит при действии канцерогенов, излучения и др., что приводит к экспрессии этих генов (превращение в онкогены) с образованием белков, вызывающих трансформацию нормальных клеток человека в злокачественные. Полагают, что через онкогены реализуется действие многих ростовых факторов.

На основе изучения механизмов репликации ДНК, транскрипции и трансляции центральный постулат биологии был дополнен представлениями о существовании процесса обратной транскрипции и репликации РНК, что позволило основной постулат современной молекулярной генетики представить следующей схемой (рис. 1).

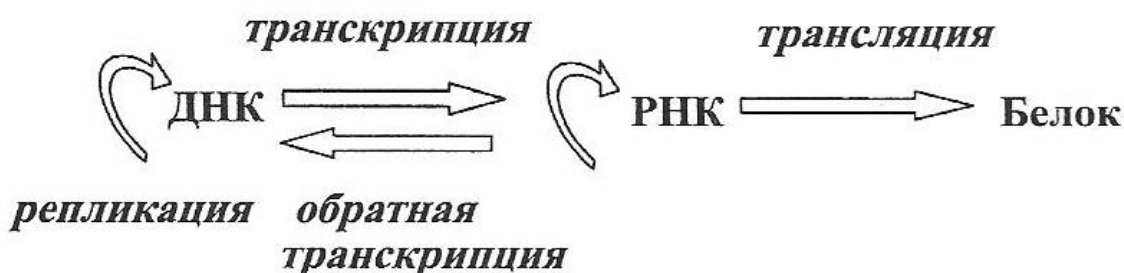


Рис.1. Схема, отражающая основной постулат современной молекулярной биологии и генетики

В конце XX века молекулярная биология вступила в период расцвета, что привело к созданию новых направлений: геномики – науки, которая изучает наборы всех генов данного организма как единое целое; протеомики – науки, которая исследует полные наборы белков на различных этапах развития организма. И уже в конце XX века более целенаправленно в научно – практическом отношении решались новые задачи молекулярной биологии, среди которых:

- рашифровка структуры геномов,
- создание банков генов,
- геномная дактилоскопия,
- изучение молекулярных основ эволюции, дифференцировки, биоразнообразия, развития и старения, канцерогенеза, иммунитета и др.,
- создание методов диагностики и лечения генетических и вирусных болезней,
- создание новых биотехнологий производства пищевых продуктов и биологически активных соединений.

Полученные во второй половине XX века экспериментальные данные свидетельствуют о том, что «центральная догма» молекулярной биологии не полностью отражает процессы передачи генетической информации в клетке (П.С. Спирин, 2007 г.)

В частности, оказалось, что тотальная РНК по своему нуклеотидному составу отличается от нуклеотидного состава ДНК. В связи с этим было высказано предположение, что преобладающая доля тотальной клеточной РНК не является кодирующей РНК. Некодирующие РНК – это рРНК, тРНК, РНК-затравки, мяРНК, малые цитоплазматические РНК, каталитические РНК, (рибозимы), микро-РНК длиной 20-25 нуклеотидных остатков. Их изучение – одна из самых актуальных задач молекулярной биологии в последнее время. Только около 2% геномной ДНК человека кодирует белки, а 98 % генома транскрибируется в различные виды не кодирующих РНК, функции большинства которых пока неизвестны.

РАЗДЕЛ 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА КЛЕТКИ

Клетка – структурная, функциональная и генетическая единица всех живых организмов. Современные представления о природе генетического аппарата клетки позволяют выделить три уровня его организации: генный, хромосомный и геномный. На каждом из них проявляются основные свойства материала наследственности и изменчивости и определенные закономерности его передачи и функционирования.

Материальный субстрат наследственности и изменчивости должен отвечать следующим требованиям:

- он должен обладать способностью к самовоспроизведению, чтобы в процессе размножения передавать эту наследственную информацию, на основе которой будет формироваться новое поколение;
- он должен сохранять постоянство своей организации, чтобы обеспечивать устойчивость вида;
- он должен обладать способностью приобретать изменения и воспроизводить их, обеспечивая эволюцию живой материи.

Исследования, направленные на выяснение химической природы наследственного материала, неопровержимо доказали, что материальным субстратом наследственности и изменчивости, отвечающим этим требованиям являются нуклеиновые *кислоты*, которые были обнаружены Ф. Мишером (1869) в ядрах клеток гноя.

1.1. Первичная структура нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты являются макромолекулам с большой молекулярной массой. К ним относятся ДНК и РНК. Это биополимеры - полинуклеотиды, состоящие из мономеров – нуклеотидов. Первичная структура ДНК и РНК представляет собой порядок чередования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов или рибонуклеозидмонофосфатов в полинуклеотидной цепи.

Каждый нуклеотид содержит 3 химически различных компонента: гетероциклическое азотистое основание, моносахарид (пентозу) и остаток фосфорной кислоты (рис.2). В ДНК-углеводный компонент – D-2-дезоксирибоза, в РНК- D-рибоза. К гетероциклическим основаниям относятся два пурина: аденин (А) и гуанин (Г) и два пиримидина: тимин (Т) и цитозин (Ц). В РНК вместо тимина содержится урацил (У).

К первому атому углерода в молекуле пентозы С1 N-гликозидной связью присоединяется азотистое основание, к пятому атому С5- H_3PO_4 , и к С3 – ОН. Мономерные остатки в нуклеиновых кислотах связаны между собой фосфодиэфирными связями. Эта связь осуществляется за счет 3' - ОН одного нуклеотидного остатка и 5' - ОН другого. Такую межнуклеотидную связь называют 3', 5' - фосфодиэфирной.

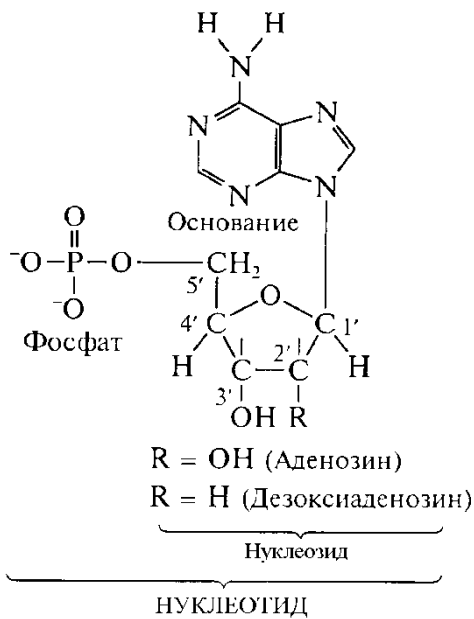


Рис. 2 Химическая структура нуклеотида

Цепи ДНК и РНК обладают определенной полярностью или направлением, поскольку все межнуклеотидные фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепи одинаково. Благодаря полярности каждая полинуклеотидная цепь имеет 5' и 3' конец (рис. 3).

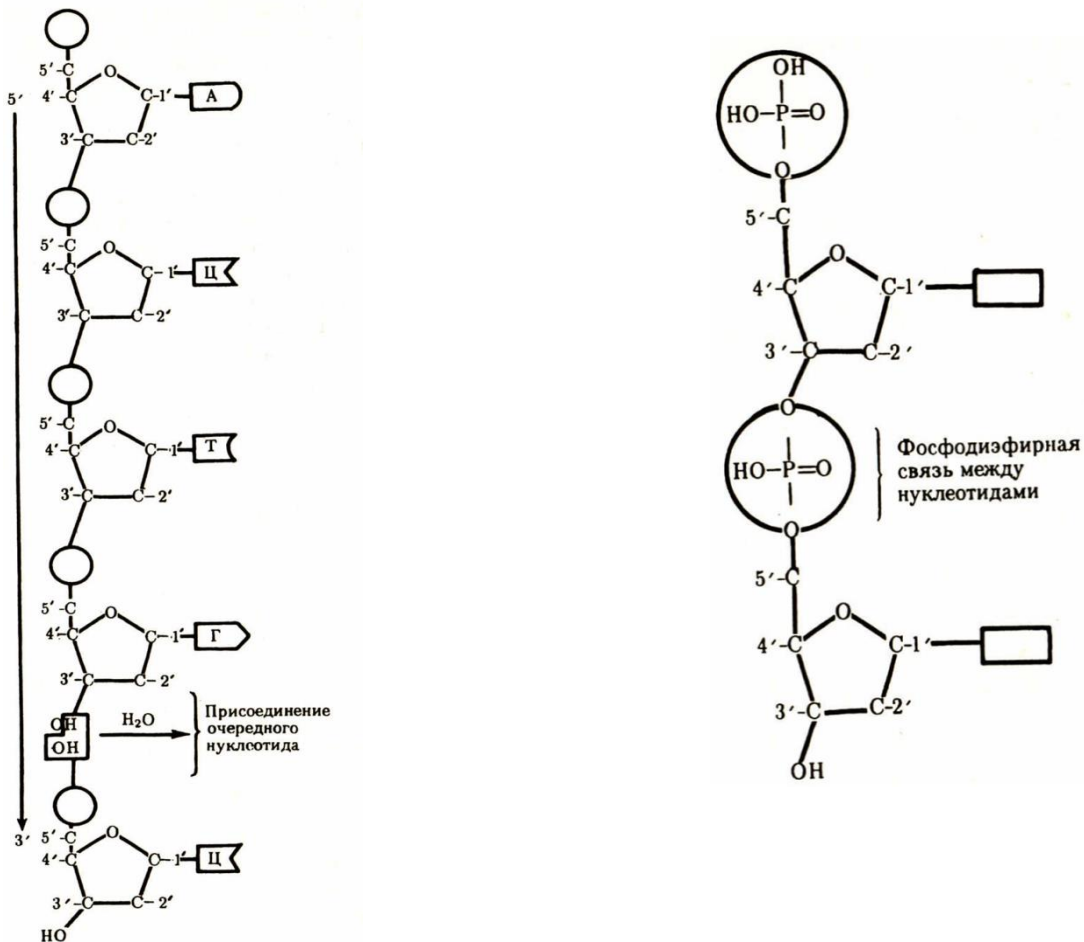


Рис.3 Направление межнуклеотидных фосфодиэфирных связей в нуклеиновых кислотах (каждая полинуклеотидная цепь имеет 5' и 3' конец)

1.2. Структура и функции ДНК

Макромолекулы ДНК – носители жизни- выполняют следующие функции (по А. Ленинджеру)

- хранение запаса генетической информации, необходимой для кодирования структуры всех белков и РНК каждого вида организма;
- регуляция во времени и пространстве биосинтеза компонентов клеток и тканей;
- обеспечение индивидуальности данного организма;
- определение деятельности организма в течение его жизненного цикла.

Свойства молекул ДНК: репликация (удвоение, самовоспроизведение) и репарация (самовосстановление исходной нуклеотидной последовательности при повреждении).

Размножение живых организмов, передача наследственных свойств из поколения в поколение и развитие многоклеточного организма из оплодотворённой яйцеклетки возможны, прежде всего, потому, что ДНК способна к самовоспроизведению. Эта особенность обеспечивается её строением.

Первичная структура ДНК: молекула ДНК построена из сочетания всего четырёх дезоксирибонуклеотидов (дАМФ, дГМФ, дЦМФ, ТМФ). В состав молекулы ДНК входят две полинуклеотидные цепи, которые располагаются **комплементарно** друг по отношению к другу и **антипараллельно** (рис.4).

В 1953 году Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили модель пространственной структуры ДНК (вторичной). Согласно этой модели, молекула ДНК представляет собой правозакрученную спираль, состоящую из двух полинуклеотидных антипараллельных цепей, закрученных относительно друг друга и вокруг общей оси. Диаметр спирали постоянен вдоль всей ее длины и составляет 2,0 нм. Шаг спирали 3,4 нм, на один виток приходится десять пар оснований. Расстояние между плоскостями оснований 0,34 нм. Таким образом, основания уложены в виде стопки в центре спирали. Эта структура двойной спирали (дуплекс) стабилизирована многочисленными межцепочечными водородными связями между специфическими парами азотистых оснований, которые направлены от пентозофосфатного остова каждой цепи внутрь спирали перпендикулярно оси. Молекулы ДНК могут находиться в двух конформациях: А и В. А-форма характеризуется тем, что плоскости пар оснований отклонены от нормальной оси примерно на 20 градусов, а в В-форме плоскости почти перпендикулярны оси спирали. В составе двойной спирали одна нуклеотидная цепь связана с другой осью симметрии 2-го порядка. Для А и В форм характерен другой тип конформационных перестроек в ДНК. Он связан с присутствием палиндромов («перевертышей» на русском языке). Это последовательности ДНК, которые одинаково читаются как в прямом, так и обратном направлении. Такие последовательности обнаружены в ДНК многих вирусов и бактерий, для них характерна симметрия второго порядка.

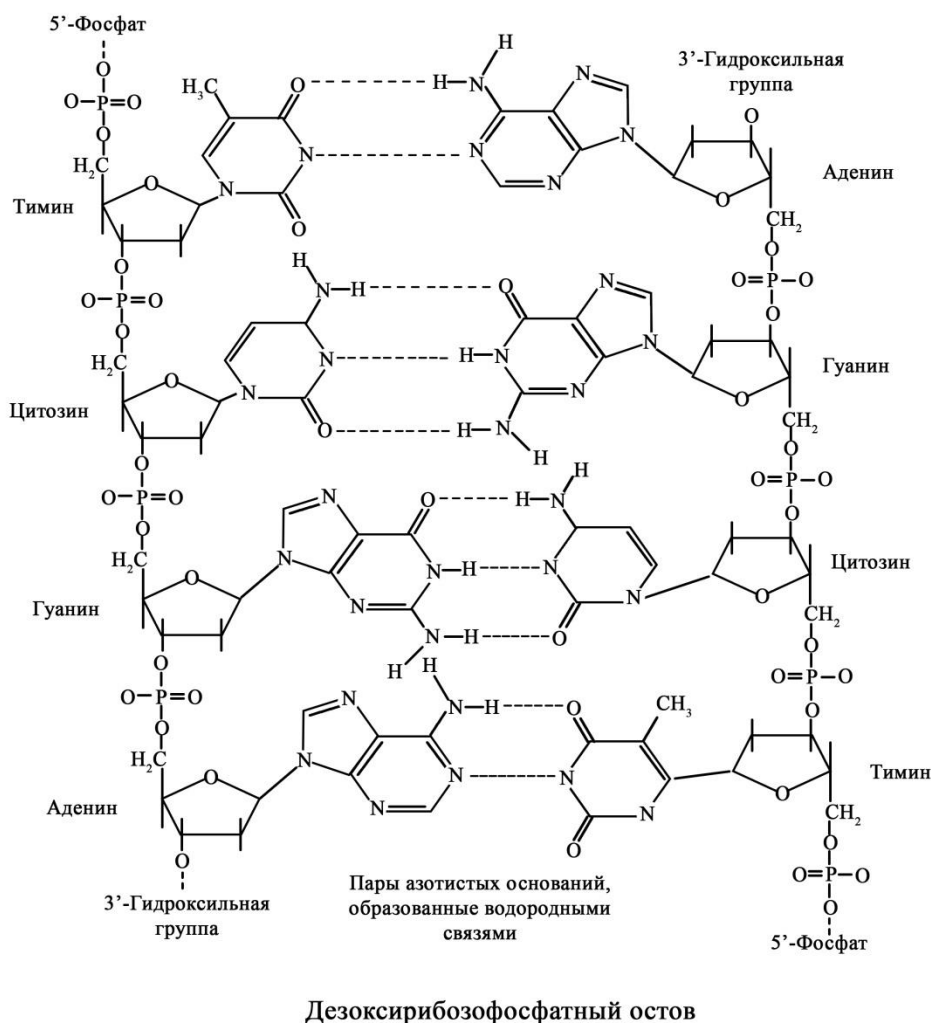


Рис.4. Макромолекулярная структура ДНК

А.Корнберг использовал этот термин для обозначения примыкающих друг к другу участков одноцепочечной ДНК с обращенной последовательностью. Хотя палиндром должен считываться одинаково в обоих направлениях, но ни одна ферментная система его прочитывать одинаково не может. Предположение о взаимодействии между азотистыми основаниями, помещёнными друг против друга, полностью соответствует правилу Э. Чаргаффа открытому в 1951 году, согласно которому «число пуриновых оснований в ДНК всегда равно числу пиримидиновых, количество аденина равно количеству тимина, а гуанина – количеству цитозина. Пури́н всегда связан водородными связями с пиримиди́ном, а более точно, аденин с тими́ном двумя водородными связями, а гуани́н всегда связан тремя водородными связями с цитозино́м. В соответствии с этим правилом пары А=Т и Г≡Ц называются комплементарными парами оснований. Комплементарные основания уложены в стопку в сердцевине спирали. Между основаниями двухцепочечной молекулы в стопке возникают гидрофобные взаимодействия (стекинг – взаимодействия), стабилизирующие двойную спираль.

Такая структура исключает контакт азотистых остатков с водой. Но стопка не вертикальна, пары оснований смещены относительно друг друга. В образованной структуре различают две бороздки – большую, шириной 2,3 нм и малую, шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области этих бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации структуры хроматина (рис. 5).

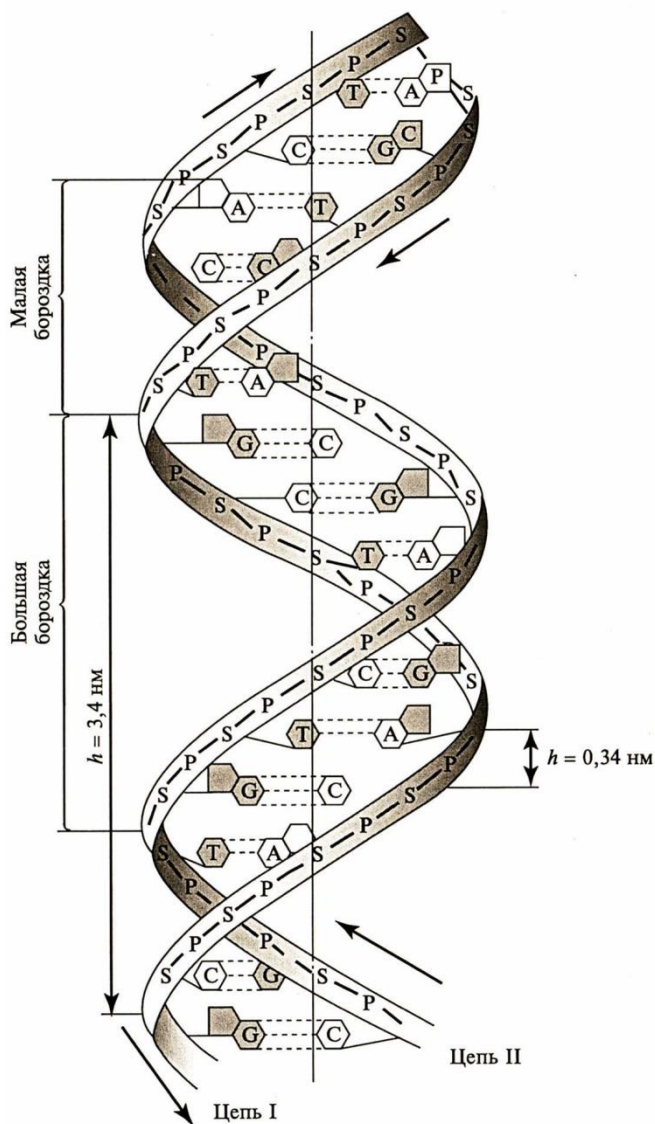


Рис.5. Пространственная организация макромолекулы ДНК

По нуклеотидному составу ДНК определяют **видоспецифичность** организма (геносистематика по А.Н. Белозерскому). Коэффициент специфичности $G+C / A+T$ у эукариот меньше единицы, у прокариот – чаще больше единицы со значительными колебаниями. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что по нуклеотидному составу ДНК можно будет в ближайшем будущем построить все родословное древо животного мира.

Другой важной особенностью объединения двух полинуклеотидных цепей в молекуле ДНК является **антипараллельность**. Правильную пространственную взаимную ориентацию азотистых оснований обеспечивает

противоположная полярность двух цепей: одна из них ориентирована в 3'-5' - направлении, вторая в 5'-3' - направлении. Поэтому 5' конец одной цепи соединяется с 3' концом другой цепи и наоборот.

Таким образом, подводя итог строению ДНК, можно выделить следующие моменты:

- число нуклеотидных цепей в молекуле ДНК равно двум;
- цепи образуют спирали по 10 пар оснований в каждом витке;
- двойные цепи закручены одна вокруг другой и вместе вокруг общей оси;
- фосфатные группировки находятся снаружи спирали, а основания внутри и расположены с интервалом 0,34 нм под прямым углом к оси молекулы;
- цепи удерживаются вместе водородными связями между основаниями;
- пары, образуемые основаниями (А – Т и Г – Ц), в высшей мере строго специфичны: полинуклеотидные цепи комплементарны друг другу;
- в структуре ДНК могут происходить изменения в чередовании нуклеотидов (мутации);
- в структуре ДНК заложена возможность так называемой конвариантной редупликации, т. е. способности живых организмов воспроизводить себе подобных.

Третичная структура ДНК (суперспирализация ДНК)

Не все ДНК *in vivo* являются двухцепочечными. ДНК может находиться в линейной или кольцевой форме. Бактериальные плазмиды, хромосомы некоторых бактерий, большинство митохондриальных или хлоропластных ДНК, геномы вирусов млекопитающих представлены единственной ковалентно замкнутой кольцевой дуплексной молекулой ДНК. Все известные одноцепочечные кольцевые ДНК относительно малы: ДНК фагов Х174 и М13 содержат 5300 и 6000 нуклеотидов. Однако для репликации любой из этих вирусных ДНК совершенно необходимо превращение одноцепочечного кольца в двухцепочечное, из которого затем образуются одноцепочечные кольцевые ДНК вирусного потомства. Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому. В диплоидных клетках человека содержится 46 хромосом. Общая длина ДНК всех хромосом клетки составляет 1,74 м и она упакована в ядре, диаметр которого в миллионы раз меньше. Чтобы расположить такую ДНК в ядре клетки, должна быть сформирована очень компактная структура.

Компактизация и суперспирализация ДНК осуществляется с помощью разнообразных белков, взаимодействующих с определенными последовательностями ДНК. Все, связывающиеся с ДНК белки, можно разделить на две группы: гистоновые и негистоновые белки.

Комплекс белков с ядерной ДНК клеток называется хроматином. Хроматин эукариотических клеток состоит из ДНК - 40%, белков – гистонов -40%, негистоновых белков 20% и небольшого количества РНК (примерно 5%). Часть хроматина неактивна. Она содержит плотно упакован-

ную ДНК и называется гетерохроматином. Гетерохроматин не транскрибируется. Активный транскрибируемый эухроматин составляет в разных клетках и в разный период онтогенеза 2 – 11 %.

Гистоны - это белки с молекулярной массой 11 – 21 кД, основного характера, содержащие около 25% лизина и аргинина. Известно 5 типов гистоновых белков: **H1, H2_а, H2_в, H3, H4**. Гистоны H1 богаты лизином, H2_а, H2_в - умеренно богаты лизином и аргинином, H3 и H4 - содержат большое количество аргинина.

Благодаря своей поликатионной природе (они несут много положительных зарядов) гистоны как бы специально приспособлены для взаимодействия с полианионным (много отрицательных зарядов) пентозофосфатным остовом двойной спирали ДНК.

Исследования показали, что спираль ДНК соединяется с группами из восьми гистоновых молекул - **октамерами**, в состав которых входит по две молекулы H2_а, H2_в, H3, H4. Это так называемый «нуклеосомный кор» (от английского слова – nucleosome core). Причем двунитевая молекула как бы накручивается на октамер и протяжённость этого участка ДНК составляет приблизительно 146 пар нуклеотидов, что образует 1,75 оборота. Эти агрегаты называют **нуклеосомами** (рис.6). **Нуклеосома – структурно – функциональная единица хроматина.**

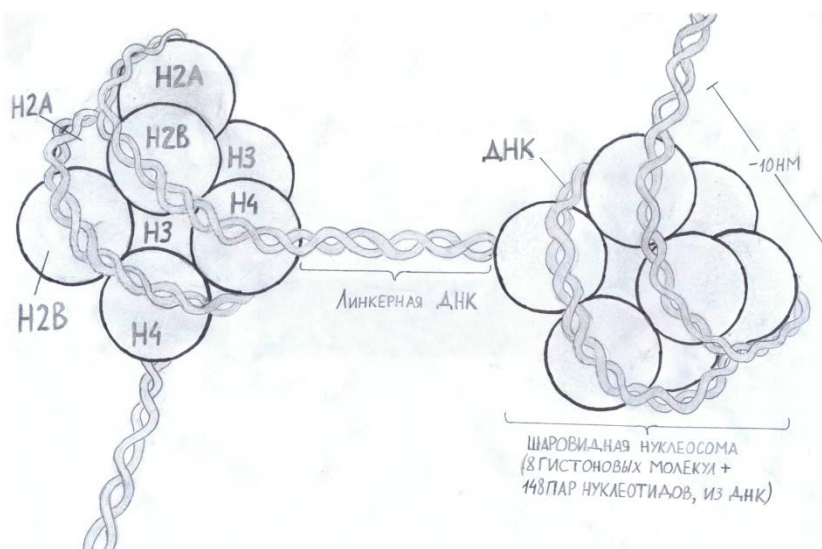


Рис.6. Предполагаемая модель нуклеосомы

Между нуклеосомами имеются соединяющие их участки ДНК, содержащие около 60 пар нуклеотидов. Их называют **спейсерными** или **линкерными** участками, они связаны с белком H1. Белок H1 связан как с линкерным участком так и с сердцевинной (рис.7). Кроме того, в состав хроматина входит значительное число других белков, объединённых общим названием негистоновые белки. В сборке нуклеосомы, вероятно, участвует ядерный белок негистонного характера - нуклеоплазмин. Это пентамерный белок анионного характера, не связанный ни с ДНК, ни с хроматином, но способный обратимо соединяться с гистоновым октамером, блокируя спо-

способность гистонов к неспецифическому «прилипанию» к отрицательно заряженным структурам, таким как ДНК. По-видимому, нуклеоплазмин создаёт в ядре специфическое ионное окружение, способствующее взаимодействию гистонов с ДНК и сборке нуклеосом. После завершения сборки нуклеоплазмин высвобождается из гистонового комплекса. Примерно 90 % ДНК входит в состав нуклеосом, а 10 % содержится в перемычках между нуклеосомами. Считают, что нуклеосомы содержат фрагменты «молчащего» хроматина, а перемычки – активного. При разворачивании нуклеосомы весь хроматин становится активным.

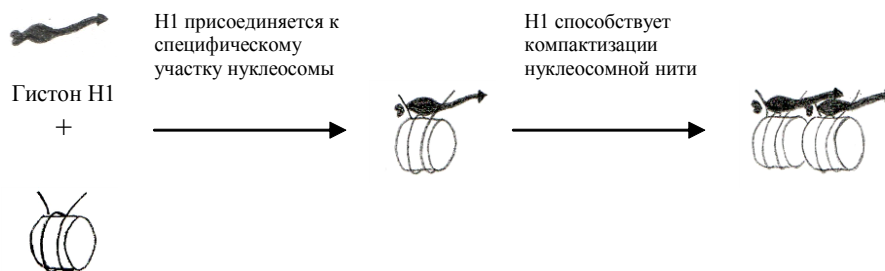


Рис.7. Роль гистона Н1 в компактизации хромосомной нити (по Альберт с соавт., 1994)

Дисковидные нуклеосомы имеют диаметр 10 нм, высоту 5 нм. Из них образуются фибриллы толщиной 10 нм, которые состоят из ряда нуклеосом, касающихся друг друга своими краями и ориентированных плоскими поверхностями вдоль оси фибрилл («бусинки на нитке»). Количество нуклеосом в ядре огромно. Рассчитано, что на гаплоидное количество ДНК человека приходится до $1,5 \cdot 10^7$ нуклеосом. Это первый **нуклеосомный уровень компактизации хроматина**. Этот уровень обеспечивает сверхскручивание ДНК на поверхности гистоновой сердцевины и укорочение ДНК в 7 раз.

Второй нуклеомерный (супербидный) уровень укладки хроматина обеспечивает сорокократное укорочение ДНК. Как нуклеосомный, так и нуклеомерный уровень компактизации ДНК хроматина осуществляется за счёт гистоновых белков. Нуклеосомная фибрилла скручивается в спираль. Существуют две гипотезы упаковки нуклеосомной нити. Согласно соленоидному типу укладки нуклеосомная фибрилла образует спираль, на один виток которых приходится 6 – 7 нуклеосом. Нуклеомерный тип укладки заключается в том, что 8 – 10 нуклеосом объединяются в нуклеомер (образуется «сверхбусина»). В результате такой упаковки образуется хроматиновое волокно с диаметром 30 нм, которое подвергается дальнейшей компактизации с уменьшением длины в 100 раз.

Все остальные уровни компактизации связаны с укладкой хроматиновых фибрилл в новые структуры, где ведущую роль играют негистоновые белки.

Негистоновые белки связываются с особыми участками ДНК, которая в местах связывания образует большие петли или **домены**. Хроматиновые

волокна доменов интерфазных хромосом состоят из 30 000 – 100 000 пар оснований. Петли доменов «заякорены» на внутриядерном поддерживающем матриксе – «ламине», которая прилегает к внутренней ядерной мембране. Каждый петлеобразующий домен хроматина содержит как кодирующие, так и некодирующие области генов.

Поэтому следующие более высокие уровни компактизации ДНК связаны не с ее дополнительной спирализацией, а с образованием поперечной петельной структуры. Образование петельных структур обеспечивается взаимодействием ДНП с белками ядерного матрикса. Существует две точки зрения на способ упаковки с помощью белково – ядерного матрикса (рис. 8).

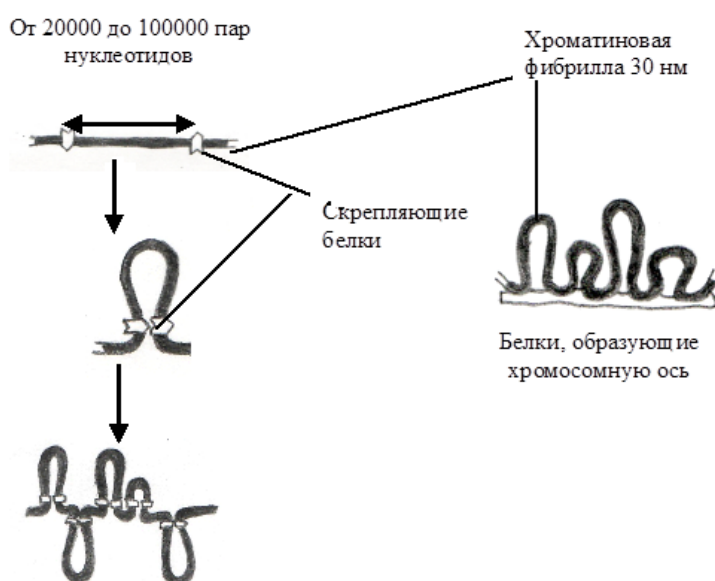


Рис. 8. Схема участка хромосомы имеющего петельную организацию (по Альберт с соавт., 1994);

- а) способ упаковки, приводящий к образованию хромомеров;
 б) способ упаковки с участием хромосомной оси

- 1) Белки образуют в центре хромосомы непрерывный тяж, к которому **крепятся** петли нуклеомеров.
- 2) Белки ядерного матрикса формируют не сплошной остов по длине хромосомы, а множество отдельных центров, к которым крепятся петли ДНП длиной 30-90 тысяч пар оснований, образуя «розетки» (хромомеры). Упаковка фибрилл хроматина, состоящего из ДНК и гистонов, в виде петельных розетковидных структур - это **третий хромомерный уровень структурной организации хроматина**. На хромосому в среднем приходится более 2000 таких петельных доменов ДНК.

Затем сближенные хромомеры образуют толстые нити, которые становятся видны в световом микроскопе. Эти образования называют **хромомерами**. Это **четвертый уровень структурной организации хроматина**. Характер их упаковки еще недостаточно выяснен. Компактизация на этом уровне включает укладку нуклеомерных петель в области хромомерных участков.

И последний уровень **структурной организации хроматина** – **пятый - хроматидный** (рис.9). Хромонемы укладываются спирально или петлеобразно, образуя хроматиду.

Метафазная хромосома состоит из двух хроматид, соединенных первичной перетяжкой – центромерой. Таким образом, в результате суперспирализации происходит компактизация ДНК и образование хромосом. Это необходимый этап организации хроматина в подготовке к клеточному делению.

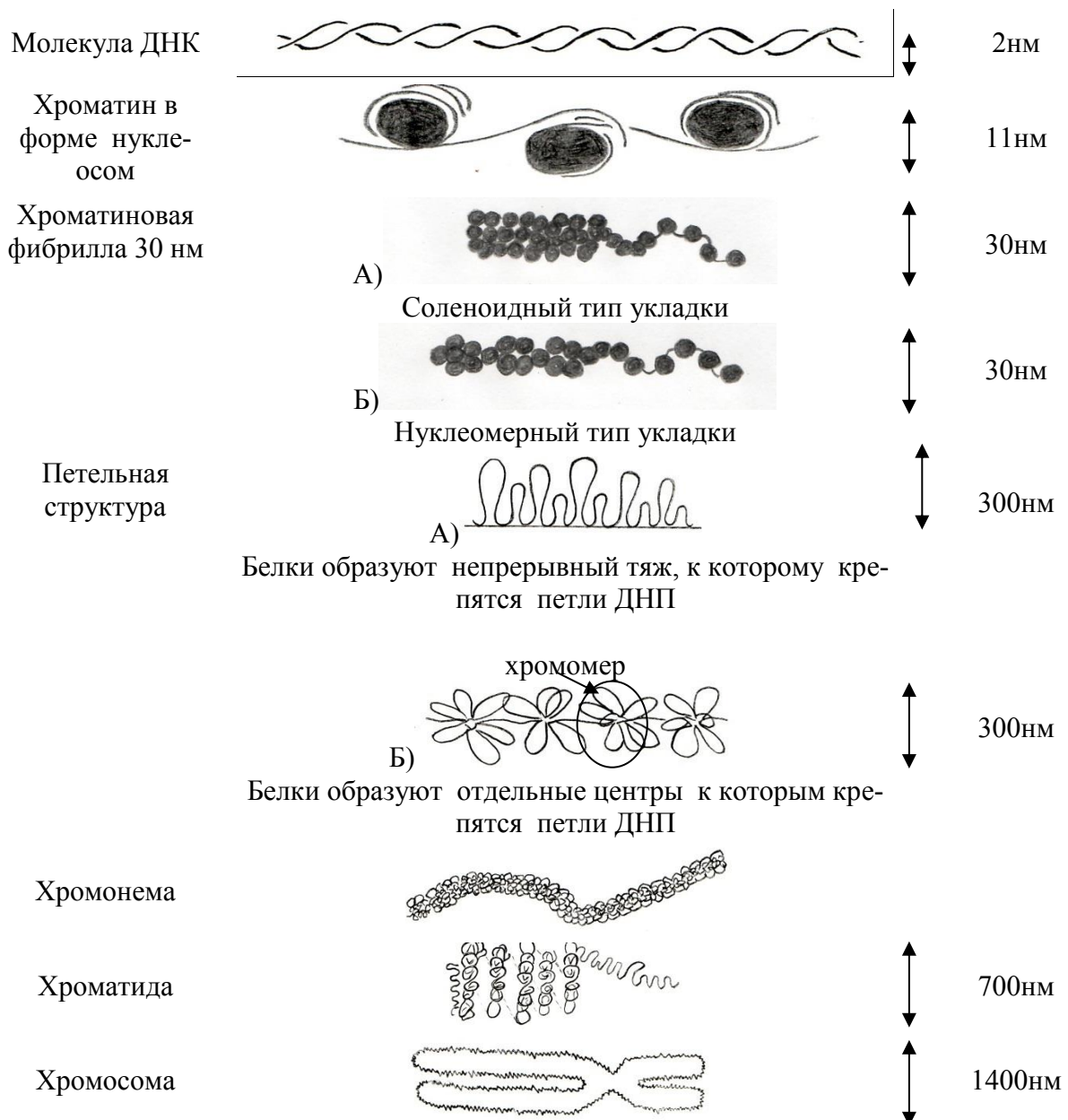


Рис. 9. Уровни компактизации хроматина (по Альберт с соавт., 1994, с изменениями)

1.3. Структура и функции РНК

Содержание РНК в любых клетках в 5 – 10 раз больше ДНК. Основная роль РНК состоит в трансляции генетической информации с образованием белков, а также в осуществлении некоторых специализированных внутри-

ядерных функций, возможно регулирующих различные этапы экспрессии генов. Геномы некоторых вирусов (ретровирусов и многих вирусов животных, растений и насекомых) представлены одно – или двуцепочечной молекулой РНК.

Первичная структура РНК. РНК состоит из чередующихся рибонуклеозидмонофосфатов в полинуклеотидной цепи. В РНК нуклеотиды связаны между собой 3',5' – фосфодиэфирными связями. Концы полинуклеотидных цепей РНК неодинаковые, называются 3',5' – концами.

Вторичная структура РНК. Отдельные участки цепи РНК образуют спирализованные петли – «шпильки» за счет водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны. Но не все участки цепи РНК полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК (рис.10).

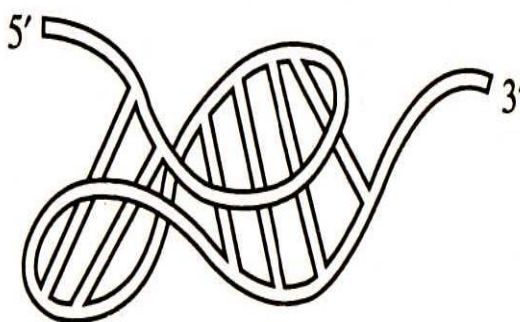


Рис. 10. Вторичная структура РНК

Третичная структура РНК. Одноцепочечные РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой путем взаимодействия элементов вторичной структуры. Так, возможно образование дополнительных водородных связей между нуклеотидными остатками, достаточно удаленными друг от друга или связей между ОН – группами остатков рибозы и основаниями. Контакты между отдельными элементами вторичной структуры осуществляются за счет дополнительных стэкинг-взаимодействий, при которых основания одного участка внедряются между соседними основаниями другого однотяжевого участка (рис.11.). Третичная структура РНК стабилизируется ионами Mg^{++} , которые связываются остатками фосфорной кислоты, а также с азотистыми основаниями.

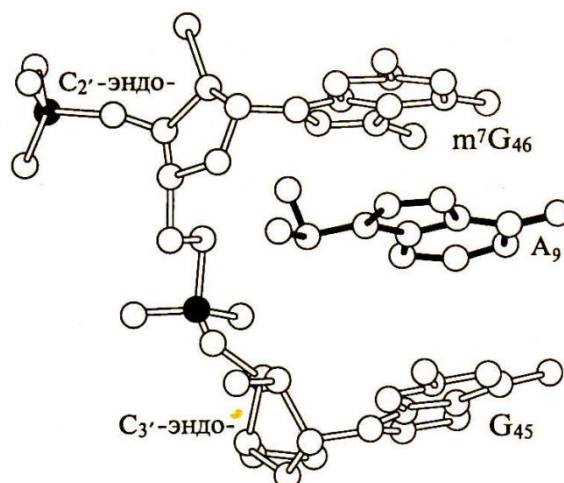


Рис. 11. Структура третичной однотяжевой РНК (на рисунке показан один из видов стэкинг- взаимодействия сопряженный с расхождением остатков гуанина)

1.4. Основные типы РНК

Таблица №1

Характеристика отдельных видов РНК

| типы РНК | Масса от всех видов РНК | Число типов в клетках | Приблизительная длина | Распространенность |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| рРНК | 80 – 85% | 3 - 4 | 120 -5000 н. | 3 вида у прокариот и 4 вида у эукариот |
| тРНК | 10 % | 80 -100 | 75 – 90 н. | у прокариот и эукариот (П,Э) |
| мРНК | 5 % | тысячи | варьирует | П, Э |
| гетерогенная ядерная РНК (гя РНК) | Менее 2% | тысячи | варьирует | Э |
| Малая цитоплазматическая РНК (мцРНК) | Менее 2% | десятки | 90 – 330 н. | П, Э |
| Малая ядерная РНК (мяРНК) | Менее 2% | десятки | 58 -220 н. | Э |

Транспортные РНК (тРНК). Главной функцией тРНК является акцептирование аминокислот и перенос их в белоксинтезирующий аппарат клетки (к рибосомам). Они также выступают в роли затравки (праймера) в процессе обратной транскрипции. Транспортные РНК в клетке выполняют адапторную функцию при трансляции информации мРНК в первичную структуру белка. Последовательность тРНК включает 70 – 90 нуклеотидов. В каждой молекуле тРНК есть участки цепи, не участвующие в образовании водородных связей между нуклеотидными остатками. К ним, в частности, относятся участок, ответственный за связывание с аминокислотой на 3' конце молекулы и антикодон – специфический триплет нуклеотидов, взаимодействующий комплементарно с кодоном мРНК. В состав нуклеотидов тРНК входят 8 – 10% (10-20 оснований на молекулу) минорных ос-

нований. Минорные основания выполняют две функции: они делают тРНК устойчивыми к действию нуклеаз цитоплазмы и поддерживают определенную третичную структуру молекулы, так как не могут участвовать в образовании комплементарных пар и препятствуют спирализации определенных участков в полинуклеотидной последовательности тРНК (рис.12).

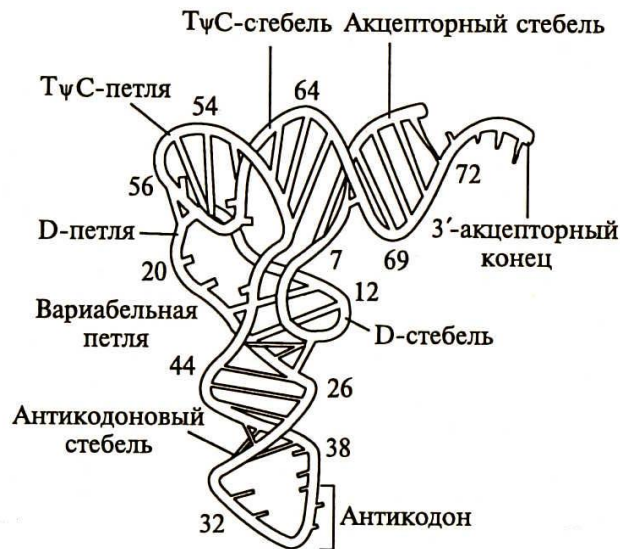


Рис.12. Пространственная ориентация петель тРНК

Помимо акцепторного и антикодонового участков, тРНК содержит специфические участки узнавания для ферментов аминокил-тРНК-синтаз, а так- же участки для связывания с субчастицами рибосом. Ее вторичная структура известна под названием «клеверный лист». Эта структура состоит из 4, 5 двуцепочечных спиральных стеблей и трех петель (рис.13).

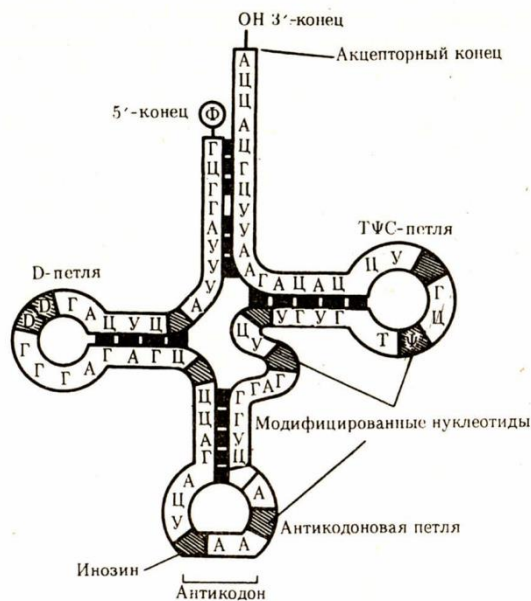


Рис.13. Схема строения тРНК (модель «клеверного листа»)

Различают акцепторный, антикодоновый и другие добавочные стебли. Акцепторный стебель заканчивается неспецифическим триплетом цитозин-цитозин-аденин (ЦЦА), к которому присоединяется специфическая аминокислота, определяемая последовательностью антикодонового триплета, находящегося в антикодоновой петле. Антикодон имеет жесткую структуру, которая позволяет ему быстро считывать кодон матричной РНК.

Рибосомальные РНК (рРНК). Высокомолекулярные рибосомальные РНК (рРНК) являются структурной основой для формирования рибонуклеопротеинового тьяжа, который складываясь в пространстве, дает начало субъединицам рибосом. Каждая рибосома состоит из рибосомной РНК и белка. Принципиальные различия в структуре рибосом прокариот и эукариот показаны на рисунке 14. Рибосомные РНК взаимодействуют с м РНК и аминокил- т РНК в процессе трансляции. Вторичная структура рРНК характеризуется спирализацией самой на себя полирибонуклеотидной цепи.

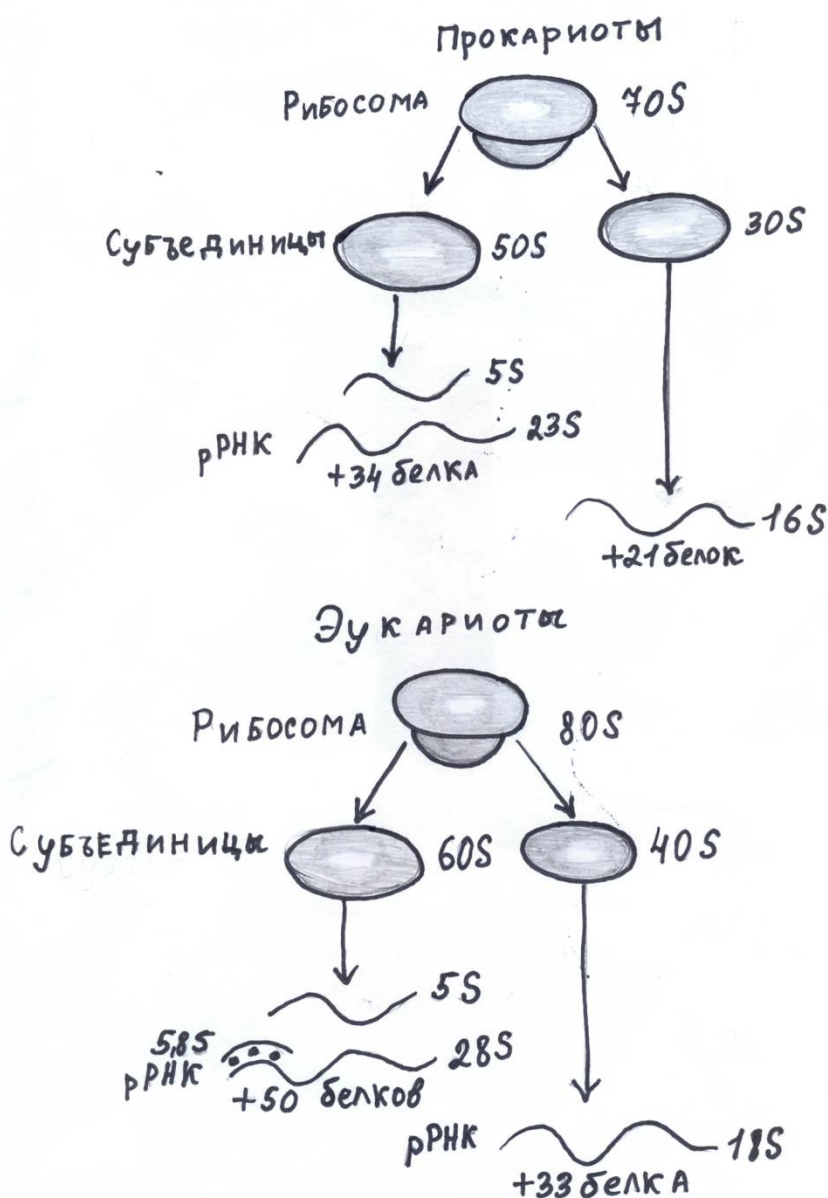


Рис. 14. Принципиальные различия в структуре рибосом прокариот и эукариот

Биспиральные и линейные участки этих молекул формируют постоянные и переменные домены, которые укладываются в компактные структуры более высшего порядка (рис.15).

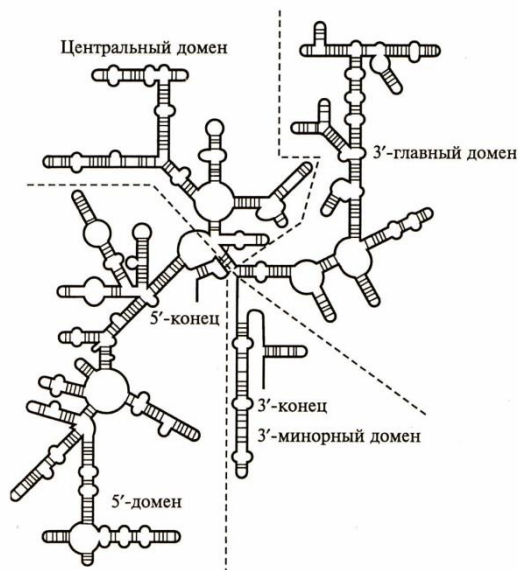


Рис. 15. Вторичная структура рРНК E.coli

Матричные РНК. Матричная РНК – это продукт первичного транскрипта и процессинга пре-мРНК, которая образуется в результате транскрипции с транскриптона эукариот или оперона прокариот.

Матричная РНК (мРНК) последовательностью своих нуклеотидных остатков в молекуле несет информацию о синтезе специфического белка непосредственно на ней самой, а также информацию о времени, количестве, месте и условиях синтеза этого белка. Строение мРНК эукариот специфично: в их составе есть информативные участки, т.е. матрицы для биосинтеза белка, а также неинформативные участки (рис. 16).

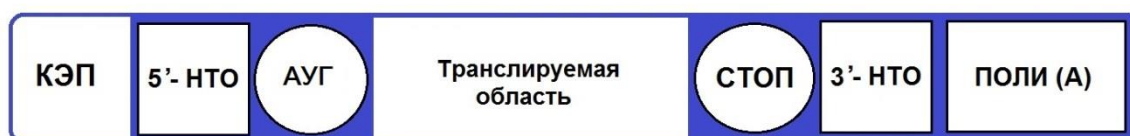


Рис.16. Обобщенная структура мРНК эукариот

НТО – нетранслируемая область

Неинформативные участки содержат кэп (модифицированный нуклеотид 7-метилгуанозин 5'- трифосфат), 5'- нетранслируемую область (5'-НТО), 3' – нетранслируемую область (3'-НТО), полиадениловый фрагмент (100 – 200) остатков).

Кэп (шапочка) - нуклеотидная последовательность, которая присоединяется с первичному транскрипту и нужна для защиты мРНК от эндо-

нуклеаз. Кроме того, кэп играет сигнальную роль в присоединении мРНК к рибосоме, тем самым, участвуя в трансляции.

Фрагмент поли – А участвует в процессе созревания мРНК, способствует переносу мРНК из ядра клетки в цитоплазму и также участвует в трансляции.

Время жизни мРНК запрограммировано специфическими последовательностями 3' – НТО.

Малые цитоплазматические РНК – участвуют в процессах трансляции на рибосомах.

Микро- РНК – открыты в 2007 году. Они состоят из 20 – 25 нуклеотидных остатков, комплементарных участкам мРНК и играют ключевую роль в регуляции синтеза белков, определяющих эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку и другие важные процессы.

1.5. Функциональные возможности РНК

Рассмотренные выше особенности структуры и функций ДНК и РНК побуждают к сопоставлению их роли в живой природе. РНК выполняет более разнообразные функции по сравнению с ДНК, существование которой связано исключительно с необходимостью сохранения и передачи из поколения в поколение наследственной информации. С открытием явления обратной транскрипции оказалось, что РНК может служить матрицей не только для воспроизведения своей собственной структуры в РНК-содержащих вирусных геномах, но и для биосинтеза ДНК у высших организмов. Уже одно это открытие формально поставило РНК в центр основного постулата молекулярной генетики, так как показало, что поток генетической информации распространяется от РНК не в одном, а в двух направлениях: не только к белку, но и к ДНК.

Таким образом, можно говорить о **полифункциональности молекул РНК** (рис. 17).

- К достаточно давно определенным каноническим функциям РНК относятся: способность выполнять роль мессенджера при передаче наследственной информации о структуре белка от ДНК к белоксинтезирующему аппарату клеток (мРНК), участвовать в формировании структуры рибосом (рРНК), обеспечивать специфическое акцептирование и перенос аминокислот к рибосомам (тРНК).
- РНК участвуют в *репликации ДНК*, выступая в роли затравок (праймеров), необходимых для инициации синтеза комплементарных цепей ДНК. Особая «антисмысловая» РНК (РНК I) выполняет роль *регулятора* инициации репликации ДНК в точках начала репликации, обладая возможностью связывать праймеры и тем самым останавливать биосинтез ДНК.
- РНК выполняет роль *матричной молекулы* в процессах обратной транскрипции (биосинтезе ДНК на матрице РНК) и своей собственной репликации у РНК-содержащих вирусов и фагов. В процессе обратной транскрипции роль затравки, необходимой для синтеза комплементар-

ной цепи ДНК, выполняет тРНК. Матричные свойства РНК реализуются в процессе наращивания теломерных повторов в молекулах ДНК: РНК-матрица является важнейшим компонентом *теломераз* – ферментов, осуществляющих синтез теломерных участков ДНК в хромосомах.

- В процессе *транскрипции* (биосинтезе РНК на матрице ДНК) большое значение имеет способность РНК образовывать разнообразные элементы вторичной структуры (шпильки), которые влияют как на инициацию, так и на терминацию синтеза РНК.
- РНК активно участвует в процессе своего собственного созревания – *процессинге* первичных транскриптов (про-РНК). Так в сплайсировании РНК принимают участие особые молекулы – малые ядерные РНК (мяРНК), необходимые для безошибочного вычленения интронов из молекул РНК-предшественников.
- В *биосинтезе белка* (трансляции) РНК играет определяющую роль. Различные по структуре рРНК формируют основу субчастиц рибосомы и определяют взаимодействие субчастиц при сборке полной рибосомы. Присоединение мРНК к рибосоме детерминируется комплементарным взаимодействием определенных участков мРНК и рРНК. Активация аминокислот, их специфическое акцептирование и доставка к рибосомам осуществляется тРНК. Кодон-антикодонное взаимодействие между мРНК и тРНК обеспечивает перевод нуклеотидной последовательности информационных макромолекул в аминокислотную последовательность синтезируемых белков. Сама реакция образования пептидной связи (транс-пептидирование) и продвижение рибосомы по мРНК (транслокация) также, по всей видимости, связаны с функционированием рРНК. Пространственная структура мРНК непосредственно влияет на скорость трансляции, а ее способность взаимодействовать с разнообразными регуляторными белками, особенно характерная для высших эукариот, является основой для тонкой регуляции биосинтеза белка.
- Посттрансляционные модификации, синтезированных в ходе трансляции полипептидов, в результате которых образуются функционально активные молекулы, также нередко сопряжены с присоединением к ним значительных по размерам молекул РНК. Таким путем возникают *РНК-содержащие ферменты* – рибонуклеопротеины (РНКаза Р, теломеразы и др.).
- И, наконец, нельзя обойти вниманием тот факт, что многие катализаторы белковой природы (ферменты), катализирующие различные биохимические превращения в клетке, функционируют благодаря содержанию в них *коферментов рибонуклеотидной природы* (NAD^+ , FAD, АТФ и др.).

После открытия Т. Чеком с соавторами аутосплайсинга РНК у тетрахимены стало ясно, что сами молекулы РНК могут обладать каталитическими свойствами, вполне сопоставимыми со свойствами ферментов-протеинов. Именно открытие рибозимов (РНК-ферментов) привело к созданию кон-

цепции «мира РНК» – мира, который, вероятно, возник и существовал за-долго до оформления ныне существующего «ДНК-белкового мира». Вскоре после открытия рибозимов Т. Чеком в одной из своих работ Ф. Крик писал: «Эти эксперименты (по каталитической РНК) поддерживают гипотезу, что биохимия РНК предшествовала традиционной биохимии, основанной на нуклеиновых кислотах и белках».

Существует несколько аргументов в пользу того, что РНК представляет собой первичную молекулу – носитель жизни. Молекула РНК так же способна нести генетическую информацию. Это в полной мере свойственно ныне существующим РНК-содержащим вирусам. Доказано также, что вирусные РНК способны к *рекомбинации*, в которую могут вовлекаться как вирусные, так и клеточные РНК. Широко известны ставшие уже классическими результаты опытов Г. Урея и С. Миллера, воспроизводящих первичную (абиотическую) среду Земли. Так, из газообразных веществ (аммиака, углекислого газа, метана и водорода) при воздействии электрического разряда и УФ-облучения можно получить элементарные соединения (формальдегид, синильную кислоту, мочевины, отдельные аминокислоты и др.), из которых далее образуются пуриновые основания (А и G) – исходные молекулы, необходимые для образования нуклеотидов. Сами нуклеотиды уже являются убикивистическими молекулами, способными существовать в виде различных жизненных форм (коферментов, энергоносителей и др.). В результате использования энергии, выделявшейся при нагревании сухих органических остатков или под действием каталитической активности неорганических полифосфатов, нуклеотиды могли взаимодействовать друг с другом с образованием полимерных молекул. Случайное объединение нуклеотидов в полимерные цепи имело решающее значение, ибо привело к возникновению матричных молекул, пригодных для комплементарного копирования. Дальнейшая эволюция этих молекул могла привести к отбору каталитически активных РНК. Таким образом, мог возникнуть «мир РНК», где РНК выступает как самодостаточная молекула, сочетающая в себе генотип и фенотип одновременно, и способная к эволюционному развитию благодаря рекомбинации и каталитическим способностям. Ключевым ферментом этого мира должен быть фермент РНК-репликазы, способный осуществлять аутокаталитическую репликацию РНК. Поиски такого фермента в настоящее время ведутся среди интронов группы I – участков молекул определенных видов РНК, служащих источником для возникновения и ныне существующих рибозимов.

В ходе дальнейшей биологической эволюции и, особенно, в связи с возникновением клеточных форм жизни часть функций РНК, вероятно, перешла к ДНК, а другая часть – к белкам. Существующие РНК обладают высоким разнообразием жизненных форм (фенотипов), превосходя в этом отношении ДНК, и сохраняют способность к хранению и передаче генетических признаков, чем принципиально отличаются от белковых молекул, многие из которых они «приспособили» для обеспечения своего собственного существования.

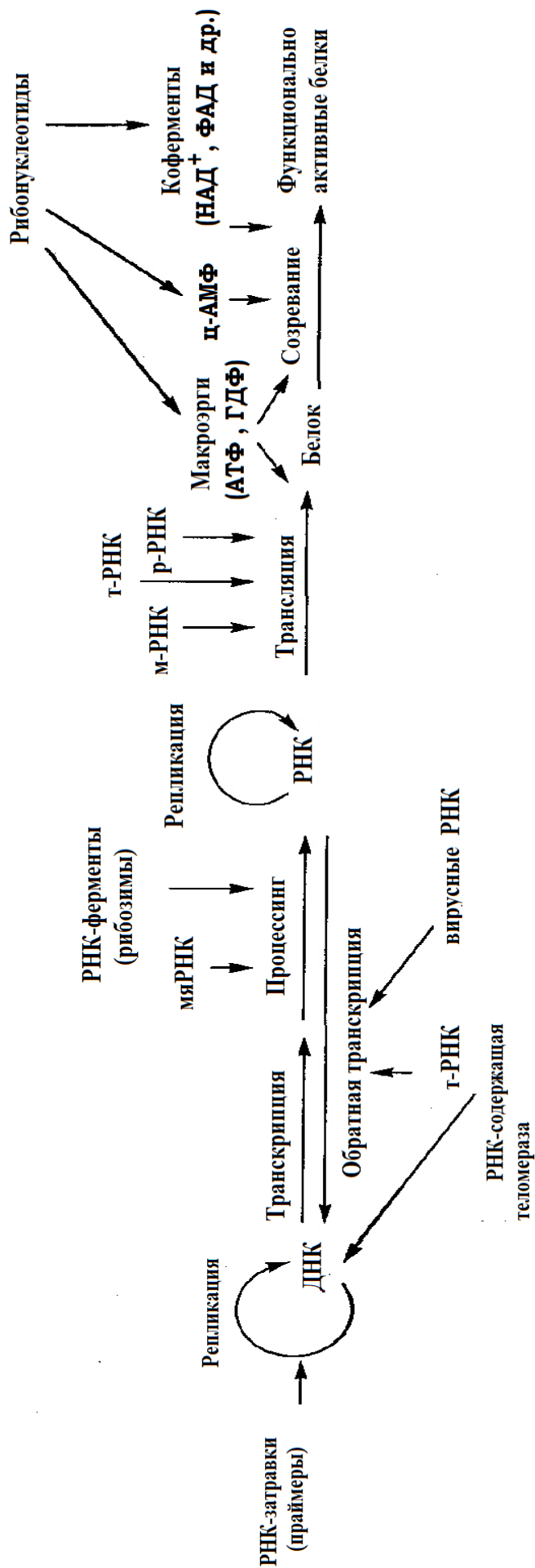


Рис.17. Роль различных РНК в основных молекулярно-биологических процессах.

Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Общие принципы построения молекулы ДНК, особенности ее вторичной структуры.
2. Нуклеотидный состав и свойства молекулы ДНК.
3. Биологическая роль ДНК.
4. Строение и функции различных типов РНК.
5. Особенности строения различных видов РНК.
6. Полифункциональность молекул РНК и ее значение в онтогенезе.
7. Напишите структурные формулы следующих соединений: ГМФ, дАМФ, ТМФ, тимидина, ЦМФ, гуанозина.
8. Какова комплементарная пара оснований РНК (напишите структурные формулы), соответствующая паре аденин и тимин в ДНК.
9. Объясните, почему в клетках число вариантов различных мРНК достигает нескольких десятков тысяч, а тРНК – около 60 вариантов.
10. При старении организма между гистонами и ДНК образуются ковалентные связи. Как появление прочных связей между ДНК и гистонами влияет на функции ДНК.
11. Чем отличается химический состав молекул ДНК от такового молекул РНК?
12. Каково наиболее существенное отличие вторичной структуры ДНК и РНК?
13. Перечислите взаимодействия, которые обеспечивают удержание взаимозакрученных дезоксирибонуклеотидных цепей в биспиральной молекуле ДНК.
14. Перечислите общие закономерности, присущие первичной структуре тРНК.
15. Укажите отличия химического состава молекул ДНК от такового молекул РНК.
16. Какая ветвь в тРНК называется антикодоновой?

РАЗДЕЛ 2. МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ

1. Перенос генетической информации от ДНК к ДНК называется **репликацией** или **редупликацией**, т.е. **самоудвоением ДНК в клетке при делении**. Единицей репликации является репликон. Матрица – обе материнские цепи ДНК. Продукт репликации – дочерние цепи ДНК.
2. Перенос генетической информации от ДНК к РНК называется **транскрипцией**. Единицей транскрипции является транскриптон у эукариот и оперон у прокариот. Матрица – участок лидирующей цепи ДНК. Продукт транскрипции - все виды РНК (тРНК, рРНК, мРНК).
3. Перенос генетической информации с м-РНК на белок называется **трансляцией**. При этом осуществляется перевод информации с «языка» нуклеотидной последовательности на «язык» аминокислотной последовательности.

В некоторых живых системах (вирусах) существует **обратная транскрипция**, когда информация вирусных РНК в заражённых клетках транскрибируется путём синтеза ДНК, которая включается в геном клеток хозяина и служит матрицей для синтеза новых вирусных РНК (например, ретровирусы, вирус СПИДа).

Все виды передачи генетической информации основаны на так называемом **матричном механизме**, который в клетке обеспечивает:

- Высокую скорость передачи генетической информации
- Высокую точность (ошибка не превышает 1 на 10^3 - 10^{10} нуклеотидов)
- Экономичность (как времени передачи информации, так и энергии).

2.1. Репликация ДНК

Репликация двухцепочечной ДНК-это сложный процесс, требующий целого ряда ферментативных реакций. Прежде всего необходимо разделение родительских цепей и их временная стабилизация в одноцепочечном состоянии. Далее должна быть инициирована репликация ведущей цепи, и затем эта цепь должна удлиняться. Кроме того, постоянно должна инициироваться, удлиняться полинуклеотидная цепь отстающей цепи. В конце репликации необходимы реакции соединения и (или) терминации. Указанные события могут контролироваться отдельными белками или группой белков, но, поскольку эти белки функционируют взаимосвязано, вполне вероятно, что разные ферментативные активности принадлежат вполне определенной структуре, иногда называемой **реплисомой**. Реплисома – это мультиферментный комплекс в бактериальной репликативной вилке (replication fork), осуществляющий процесс полуконсервативной репликации. *Реплисома* – это полный набор ферментов, состоящий из 15-20 различных белков, находящихся в репликативной вилке и осуществляющих репликацию ДНК (рис.18). Она не выявляется в виде свободного клеточного компонента, подобного, например, рибосоме, а собирается из отдельных ком-

понентов в начале репликации. Таким образом, **реплисома может существовать только как белковый комплекс, связанный с определенной структурой, которую ДНК приобретает в репликационной вилке.**

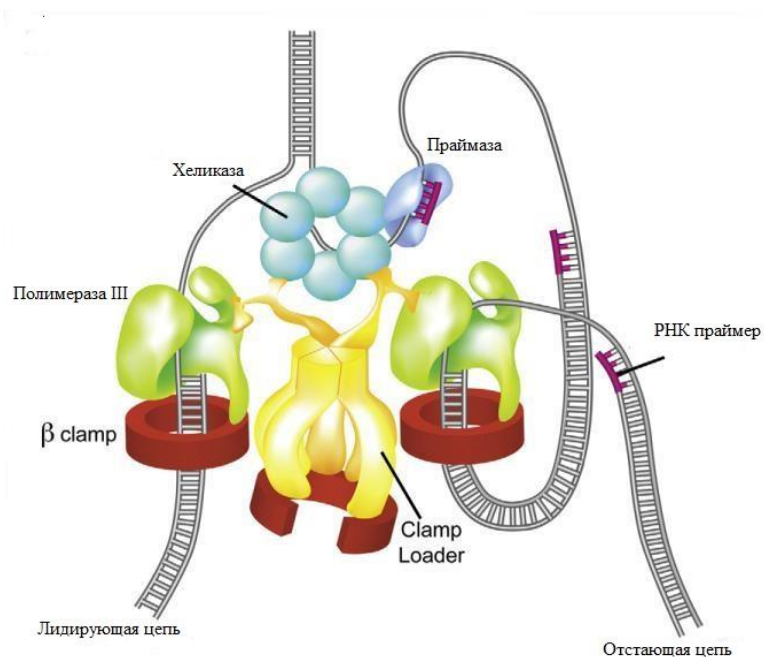


Рис. 18. Схематическое изображение строения реплисомы.

Процесс репликации ДНК начинается с того, что цепи ДНК расходятся. Каждая цепь служит матрицей, на которой синтезируется комплементарная ей новая цепь ДНК. В результате собираются две дочерние, двухспиральные, неотличимые по строению от родительских молекулы ДНК. Каждая из них состоит из одной цепи исходной родительской молекулы ДНК и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм репликации ДНК, при котором от одного поколения к другому передаётся одна из двух цепей родительской молекулы ДНК, получил название **полуконсервативного** (рис. 19).

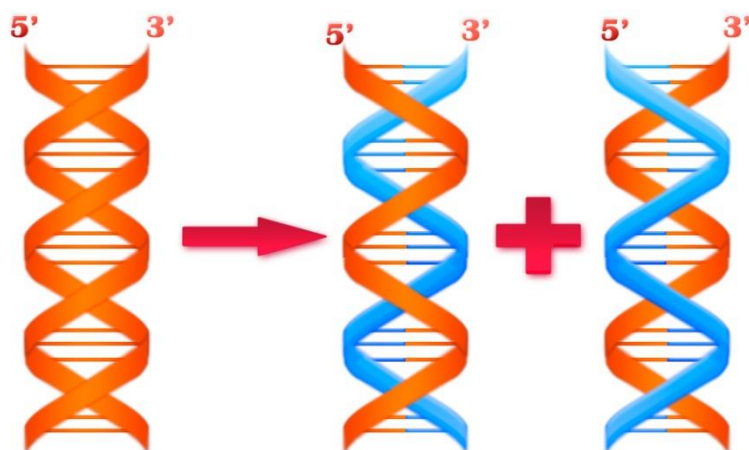


Рис. 19. Схема полуконсервативного способа репликации ДНК.

Репликация происходит в синтетический период интерфазы клеточного цикла.

В результате репликации однохроматидные хромосомы становятся двуххроматидными (общее число хромосом при этом не изменяется). Это является основой для сохранения постоянства кариотипа при делении клетки (рис.20).

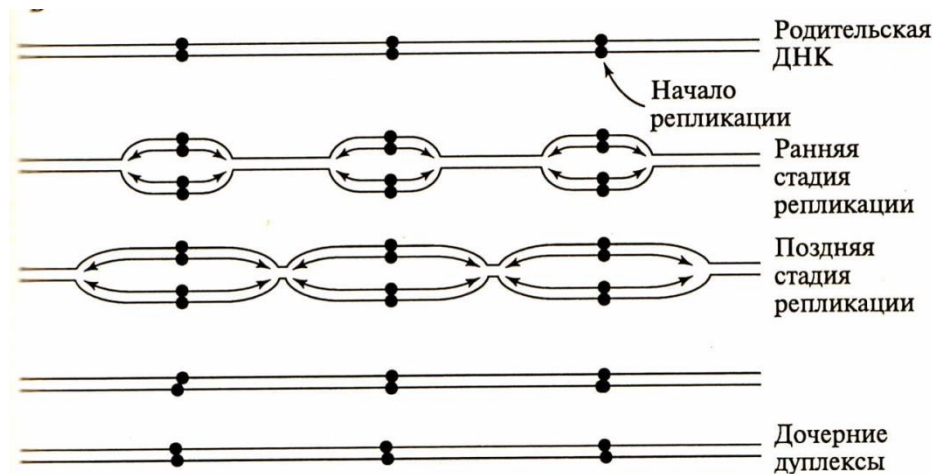


Рис. 20. Общая схема репликации. Дочерние дуплексы образуют две хроматиды одной хромосомы

Условия, необходимые для репликации ДНК:

1. набор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ).
2. образование РНК- «затравки» (праймера)
3. расплетенные участки двойной спирали ДНК (обе цепи - матрицы)
4. необходимые ферменты:

- **ДНК-хеликаза** - разрывает водородные связи в двухцепочечной молекуле ДНК, используя энергию АТФ для расплетения двойной спирали ДНК. Разрыв идет на *ori* – сайте, там, где находятся комплементарные азотистые основания А = Т, имеющие две водородные связи, которые хеликазе легче разрушить.
- **ДНК-топоизомеразы (I, II, III)** (соответствуют E – гиразе)

Семейство топоизомераз, обладая нуклеазной активностью, участвует в регуляции суперспирализации ДНК. Хеликаза не может вращать всю громадную молекулу ДНК. Поэтому ее продвижение не только ведет к разделению цепей, но и порождает тенденцию к усилению скрученности впереди хеликазы. Эту проблему снимает топоизомераза, способная разрывать фосфатидную перемычку в одной из цепей ДНК.

Быстрое раскручивание цепей родительской ДНК в процессе репликации (45 00 об/мин) компенсируется биологическим шарниром – гиразой (семейство топоизомераз), который обеспечивает во время раскручивания кратковременный разрыв одной из цепей ДНК быстро восстанавливаемый с высокой точностью после одного или нескольких оборотов (от англ. Gyration – вращение). Это фермент не только позволяет ДНК вращаться, но и

активно закручивает ее в направлении, благоприятствующем расплетению цепей матрицы в районе репликативной вилки. ДНК-топоизомераза I разрывает фосфодиэфирную связь в одной из цепей двойной спирали и ковалентно присоединяется к 5'-концу в точке разрыва. По окончании формирования репликативной вилки фермент ликвидирует разрыв в цепи и отделяется от ДНК. Механизм действия топоизомеразы показан на рис. 21.

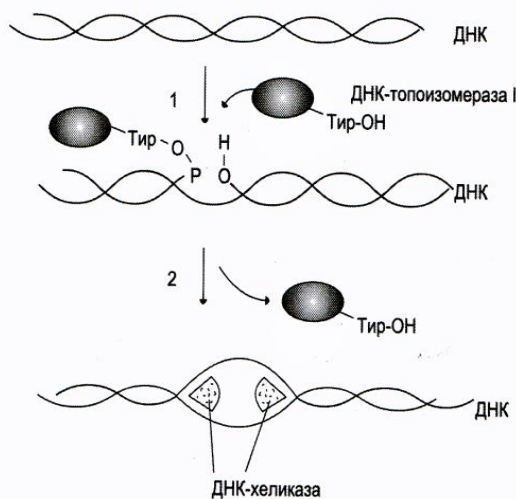


Рис. 21 Механизм действия топоизомеразы

ДНК- полимеразы

В синтезе ДНК у прокариот участвуют ДНК – полимеразы I, II, III.

- ДНК-полимераза I удаляет праймер и заполняет образующуюся брешь.
- ДНК-полимераза II осуществляет контроль за правильностью последовательного присоединения дезоксирибонуклеотидов в синтезируемой цепи ДНК.
- ДНК-полимераза III (олигомерный фермент состоящий из 7 субъединиц.) содержит в активном центре ионы Zn^{2+} и Mg^{2+} , с помощью которых нейтрализует (-) заряд ДНК и повышает реакционную способность нуклеотидов. Этот фермент осуществляет синтез новообразующейся, дочерней ДНК.

В синтезе эукариотических ДНК участвуют 5 ДНК-полимераз (α , β , γ , δ , ϵ). ДНК-полимеразы различаются по числу субъединиц, молекулярной массе, ассоциации с разными вспомогательными белками, ускоряющими процесс биосинтеза ДНК и функциональному значению. α , β , δ , ϵ – участвуют в синтезе ДНК в ядре, а ДНК- полимераза γ – в репликации митохондриальной ДНК.

- **ДНК- полимераза α** – инициирует репликацию. Она комплементарна определенному сайту одноцепочечной ДНК, присоединяясь синтезирует фрагмент РНК-праймер (старое название фермента - праймаза). **Праймер** – это олигонуклеотид, содержащий 60 нуклеотидных остатков: 8-10 рибонуклеотидов и фрагмент цепи ДНК (около 50 дезоксири-

бонуклеотидов). ДНК-полимераза- α состоит из четырех субъединиц. Каждая из субъединиц фермента выполняет определенную функцию: «узнавание» сайта репликации, синтез праймера, синтез фрагмента цепи ДНК.

- **ДНК-полимераза δ** – активируется праймером, продолжает синтез новой непрерывной цепи от 5'-3' концу по ходу раскручивания репликативной вилки, что соответствует ДНК-полимеразе III у прокариот. Эта ДНК-полимераза отбирает из окружающей среды дезоксирибонуклеотидфосфаты, азотистые основания которых комплементарны азотистым основаниям материнской цепи ДНК. Она катализирует образование 3'-5' –фосфодиэфирных связей между нуклеотидами и контролирует правильность сборки дочерней цепи ДНК, проверяя точность спаривания азотистых оснований, что дает возможность своевременной репарации. ДНК-полимераза δ осуществляет синтез лидирующей цепи ДНК, а синтез отстающей цепи ДНК обеспечивает наряду с ДНК-полимеразой δ **ДНК-полимераза ϵ** . Оба фермента обладают не только полимеразной, но и эндонуклеазной активностью. В ходе синтеза они могут исправлять допущенную ошибку и отщеплять неправильно включенный нуклеотид, что обеспечивает высокую точность синтеза ДНК.
- **ДНК-полимеразы β** – устраняет праймер РНК, заполняет брешь в отстающей цепи, что соответствует ДНК-полимеразе I прокариот.

Рибонуклеаза H – гидролизует праймеры.

ДНК-лигаза, «сшивает» фрагменты Оказаки в новую структуру дочерней цепи ДНК.

Наличие различных белковых факторов, например, ДНК-связывающих белков или SSB – белков (от англ. single strand binding proteins – белки, связывающиеся с одноцепочечными нитями ДНК). SSB - белки не закрывают азотистые основания, связываются с одноцепочечной ДНК по всей длине разделившихся цепей, предотвращают их комплементарное скручивание и образование «шпилек».

В эукариотических клетках имеется фермент **теломераза** (нуклеотидтрансфераза), обеспечивающий восстановление недореплицированных 5' - концов после удаления праймера.

Процесс репликации ДНК включает в себя 3 основных этапа:

1. **инициацию** (начало синтеза дочерних цепей ДНК),
2. **элонгацию** (удлинение цепей)
3. **терминацию** (конец синтеза) этого процесса.

Этап инициации в процессе репликации ДНК

Для инициации синтеза ДНК требуется раскручивание двойной спирали и удерживание двух цепей на некотором расстоянии друг от друга. Ферменты **хеликазы** (helix - спираль) расплетают короткие участки ДНК, образуя при этом репликативные вилки. **Репликативная вилка** – это часть молекулы ДНК, в которой в данный момент осуществляется синтез

новой ДНК. Теперь, когда родительская ДНК расплетена и находится в одноцепочной форме и каждая из цепей служит матрицей для синтеза новой ДНК, образуется предзатравочный промежуточный комплекс, состоящий как минимум из пяти белков. Один из них белок *dna-B* – может передвигаться вдоль ДНК, используя энергию гидролиза АТФ, а также может служить сигналом для активации праймазы.

Топоизомераза предотвращает быстрое вращение цепей ДНК и помогает хеликазе раскручивать ДНК для её репликации и разрывать водородные связи. Как только небольшой участок ДНК оказывается расплетённым, к каждой из цепей прочно присоединяются молекулы **ДНК-связывающего белка (SSB)**, которые препятствуют образованию комплементарных пар и обратному воссоединению цепей.

Область, которая уже реплицирована, имеет вид «глазка» внутри нереплицированной ДНК. Важно отметить, что **репликационный «глазок»** образуется только в тех местах молекулы, где находятся специфические нуклеотидные последовательности. Эти последовательности, получившие названия **«точек начала репликации»** или **ориджинов**, состоят приблизительно из 300 нуклеотидов.

В зависимости от того в одном или в двух направлениях происходит репликация, «глазок» содержит одну или две **репликативные вилки** (рис. 22). Последовательное движение репликативной вилки ведёт к расширению «глазка».

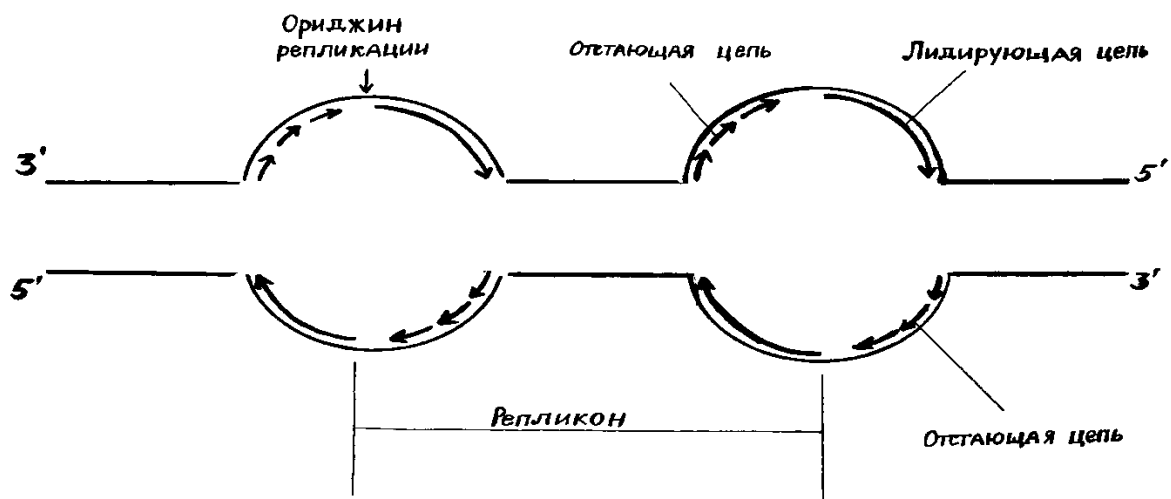


Рис. 22. Схема, демонстрирующая образование двух репликативных вилок перемещающихся в противоположных направлениях от ориджина в эукариотической хромосоме.

В активном центре всех ДНК полимераз находятся ионы Zn^{2+} (кофактор фермента). Для взаимодействия полимераз с субстратами необходимо присутствие также ионов Mg^{2+} , которые поляризуют нуклеотиды и образуют с ними комплексы, в результате чего реакционная способность нуклеотидов повышается.

Полная репликация генома млекопитающих заканчивается за 9 часов - время, необходимое для удвоения генетического материала диплоидной

делящейся клетки. Такая скорость означает, что репликация начинается сразу же на многих участках, называемых сайтами инициации или **ориджинами** (от англ. origin- начало). Ориджины репликации имеют определенную нуклеотидную последовательность. Таких точек или сайтов насчитывается около 100. На ориджинах индуцируется двунаправленная репликация, то есть образуются две репликативные вилки, которые перемещаются в противоположных направлениях до тех пор, пока не встретятся со следующим участком репликации — **репликоном** (единица репликации у эукариот).

Этап элонгации и терминации в процессе репликации ДНК

ДНК-полимеразы относятся к категории наиболее сложных, так называемых матричных ферментов. Они не только способны катализировать реакцию роста новой цепи ДНК, но на каждом «шаге» выбирают из четырёх мономеров тот, который комплементарен звену материнской ДНК.

С помощью фермента ДНК-полимеразы δ происходит реакция между 3'-гидроксильной группой РНК-затравки (праймера) и 5'-альфа фосфатной группой дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ или дТТФ). В результате дезоксирибонуклеотидный остаток присоединяется к РНК-затравке с одновременным выделением пирофосфата. При этом образуется 3'-5' – фосфодиэфирная (пентозофосфатная) связь.

Выбор очередного нуклеотида на каждом шаге синтеза определяется матричной цепью ДНК согласно правилам антипараллельности и комплементарности, предложенным Уотсоном и Криком.

Синтез дочерних цепей идет на обеих цепях ДНК, но на одной цепи синтез идет непрерывно в направлении от 5'-3'. Эта цепь получила название **лидирующей**. На другой цепи синтезируется сегмент ДНК в направлении обратном движению репликативной вилки. Эта цепь получила название **отстающей**, а синтез дочерней цепи на ней называется **прерывистой репликацией**. В направлении 5'-3' синтезируется серия таких фрагментов, которые называются **фрагментами Оказаки** по имени японского учёного, впервые их обнаружившего и описавшего.

После образования значительного числа фрагментов Оказаки репликативный комплекс приступает к удалению РНК - затравок с помощью **ферментов рибонуклеазы Н** или **ДНК-полимеразы β** и к заполнению образующихся брешей соответствующими дезоксирибонуклеотидами с помощью фермента **ДНК-полимеразы β** . Затем с помощью **фермента ДНК - лигазы** фрагменты «сшиваются» между собой с образованием непрерывной цепи ДНК.

В ходе всего процесса синтеза репликативная вилка перемещается вдоль молекулы и при этом расплетаются все новые и новые участки родительской ДНК до тех пор, пока вилка не дойдёт до точки окончания синтеза - **точки терминации** (рис 23).

Суммарное уравнение репликации

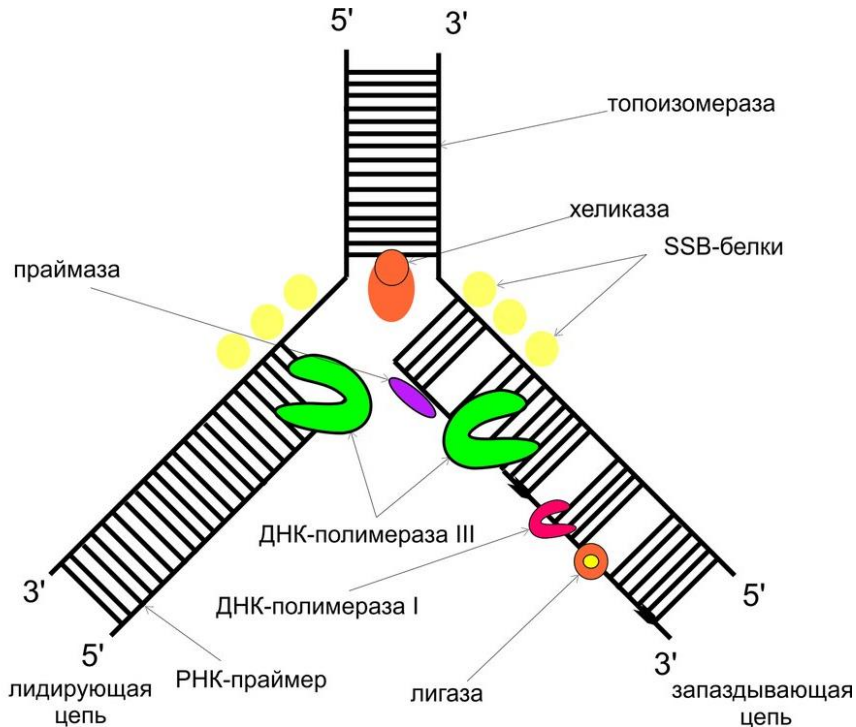
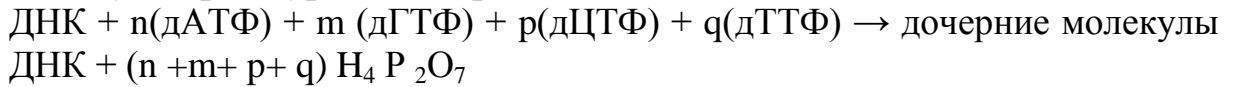


Рис.23. Схематическое изображение основных этапов репликации ДНК.

Скорость наращивания цепи при репликации ДНК у человека составляет 50 нуклеотидов в минуту.

Новообразованная ДНК затем подвергается **модификации**. При этом происходит метилирование остатков аденина и цитозина у прокариот и цитозина у эукариот. Единственная специфическая функция, связанная с метилированием оснований, установлена для прокариот, где метилирование защищает хромосомы от расщепления своими собственными ферментами цитозоля.

В клетках эукариот метилированию ДНК приписывают разные функции, но ни одна из версий окончательно до сих пор не была безусловно подтверждена. Одной из возможных функций метилирования является регуляция транскрипции тех или иных генов.

2.2. Транскрипция

Следующий этап в передаче генетической информации - это транскрипция, т.е. синтез всех типов РНК: м-РНК, т-РНК, р-РНК. Транскрипция как механизм передачи информации от ДНК к РНК обеспечивает копирование лишь части закодированной в ДНК информации. Участок ДНК, ограниченный промотором и сайтом терминации, представляет собой единицу транскрипции – **транскриптон** (у эукариот, рис. 25) и **оперон** (у прокариот, рис. 24)



Рис. 24. Схема строения полицистронной модели оперона у прокариот

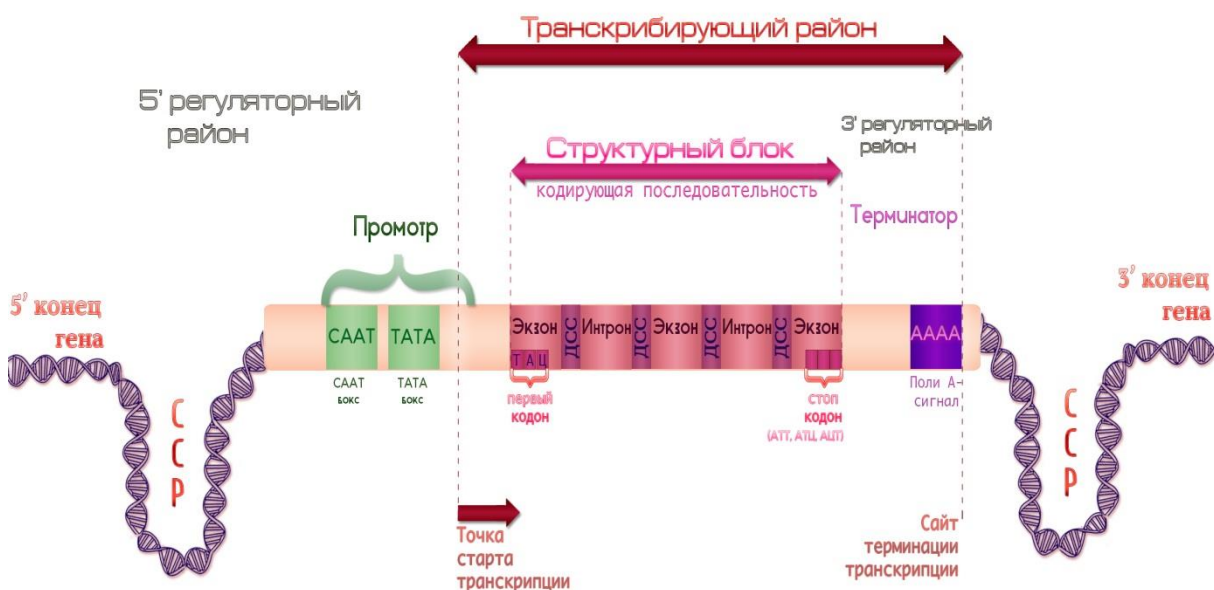


Рис. 25. Схема строения моноцистронной модели транскрипта у эукариот.

Примечание:

Функциональная кодирующая часть гена называется **цистроном**.

ССР (Спенсерный сайт рестрикции) - полидромный участок ДНК, разделяющий транскриптоны, образуя так называемые «шпильки» в ДНК. Состоит из инвертированных нуклеотидов (чаще гуанин и цитозин) по принципу «КАЗАК».

П (Промотор) – нуклеотидная последовательность, детерминирующими инициацию транскрипции. Состоит из двух блоков:

ЦААТ (СААТ) блок – активный участок, состоящий из 70-80-100 пар нуклеотидов и заканчивается ЦААТ, участвует в узнавание РНК-полимеразы,

ТАТА блок (блок Хогнесс у эукариот или Прибнова у прокариот) – состоит из 30 пар нуклеотидов, обогащен последовательностями аденина и тимина, участвует в присоединение РНК-полимеразы.

Сайт инициации транскрипции - это точка инициации или стартовая точка, представляющая собой триплет **ТАЦ** кодогенной цепочки ДНК, который при транскрипции даст триплет АУГ и при трансляции будет соответствовать АК – метионин.

О (Оператор) или акцепторная зона - с него начинается синтез и-РНК и с ним взаимодействует особый белок репрессор или индуктор от этого будет зависеть будет или нет идти транскрипция.

Структурный блок – участок ДНК в котором записана информация о белках.

Эзоны (Э) – смысловые участки ДНК, несущие информацию о структуре белка.

Интроны (И) – несмысловые, не несут информация о структуре белка.

ДСС (Донорные сайты сплайсинга) – участки ДНК между интронами и экзонами, по которым произойдет вырезание интронов в процессе сплайсинга.

Стоп кодон – триплет нуклеотидов, расположенный в конце структурного блока (транскрибируемого района), соответствующий стоп кодомам иРНК, определяющим остановку трансляции на рибосоме.

Т (Терминатор) - нуклеотидная последовательность поли-А, прекращающая рост цепи РНК (точка терминации)

S - **Структурные гены** - участки, которые информируют о последовательности аминокислот в первичной структуре белка.

Условия, необходимые для транскрипции:

1. Наличие транскриптона
2. Рибонуклеозидтрифосфаты: нАТФ, нУТФ, нЦТФ, нГТФ
3. Факторы инициации А и В, которые иницируют раскручивание примерно одного витка двойной спирали ДНК.
4. Факторы элонгации (Е, Н, F) повышают активность РНК-полимеразы и облегчают локальное расхождение нуклеотидных цепей
5. Белковые факторы транскрипции - это (сигма-факторы: белки *shl*, СТФ, В-белок), которые необходимы для распознавания промоторных участков РНК-полимеразой. Для осуществления полимеразной функции должен образоваться холофермент - комплекс так называемого **корфермента**, т.е. собственно **РНК-полимеразы** с дополнительным белковым фактором (**сигма-фактор**). Сигма-белок «узнаёт» точку инициации на ДНК путем определения последовательности генов, характерной для промотора и помогает присоединиться к этому участку РНК-полимеразе. В результате происходит расщепление двойной спирали ДНК и образуется **открытый промоторный комплекс**, включающий в себя расплетенный участок ДНК, РНК-полимеразу и белковые факторы инициации (рис. 24)
6. Фермент - ДНК-зависимая РНК-полимераза I, II, III
ДНК-зависимая РНК-полимераза- мультиферментный белок, состоящий из 5 субъединиц: двух α , β , β' и δ :
 - β – субъединица участвует в связывании с ДНК-матрицей;
 - α – субъединица – в связывании рибонуклеозидтрифосфатов;
 - δ – субъединица – в выборе участка инициации транскрипции.Весь комплекс субъединиц представляет собой холофермент, содержащий два иона цинка. РНК-полимераза без δ – субъединицы – корфермент в котором находится каталитический участок. РНК – полимеразы I, II, III, узнающие разные промоторы, содержат разные по строению δ – субъединицы.

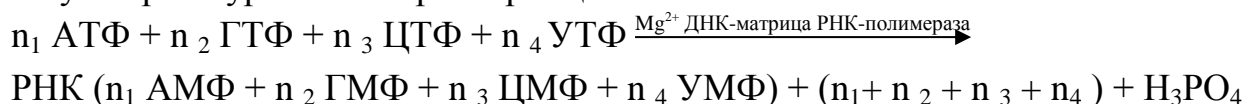
Молекулярные массы трех важнейших классов РНК-полимераз млекопитающих варьируют в пределах 500000-600000. По-видимому, каждый из этих ферментов отвечает за транскрипцию различных наборов генов: РНК-полимераза I осуществляет синтез р-РНК, РНК-полимераза II синтезирует м-РНК, а РНК-полимераза III - тРНК.
7. Фермент - поли А-полимераза, которая формирует на 3' конце первичного транскриптона м-РНК полиА последовательность от 100-200 остатков адениловой кислоты.
8. Сплайсосомы – (рибозимы) – это малые ядерные рибонуклеопротеины (мяРНП). мяРНП состоят из мяРНК, связанной с белковым остовом, состоящим из нескольких протомеров. мяРНК по принципу комплементарности «узнают» специфические последовательности интронов, катализируют реакцию расщепления 3'-5' – фосфоэфирной связи на границе экзона и интрона и последующее соединение двух экзонов.
9. Наличие ионов Mn^{++} и Mg^{++} .

Стадии транскрипции

Транскрипция у эукариот происходит внутри ядра. Процесс синтеза РНК на ДНК-матрице наиболее полно охарактеризован для прокариот. Вместе с тем описание синтеза РНК у прокариот вполне применимо к эукариотам, т.к. эти процессы практически одинаковы.

В процессе синтеза мРНК на матрице ДНК так же выделяют три стадии: **инициацию, элонгацию и терминацию процесса.**

Суммарное уравнение транскрипции:

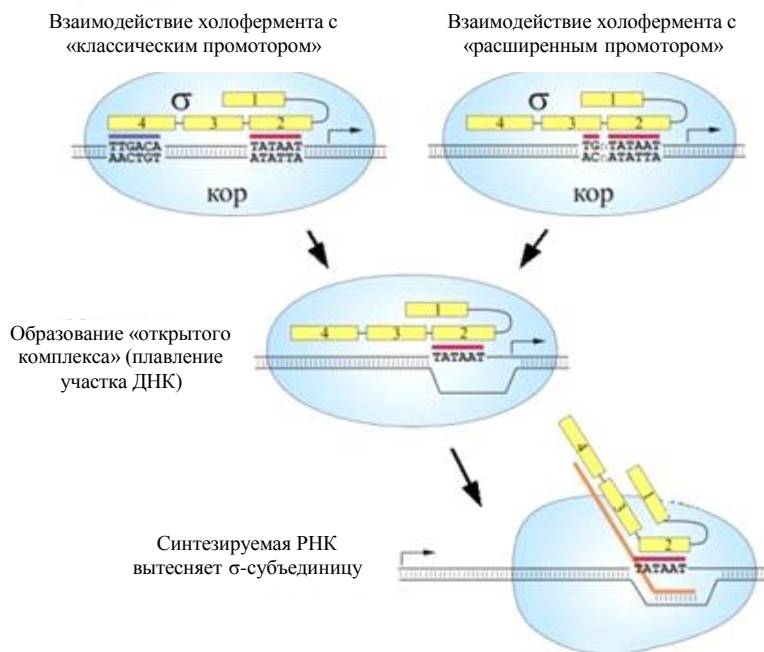


Инициация

δ – субъединица РНК-полимеразы через серию случайных актов «ассоциации-диссоциации» с ДНК находит промотор в области ТАТА-бокса и других участков-дискриминаторов. Затем к δ – субъединице присоединяется фермент РНК-полимераза и образуется сначала закрытый транскрипционный комплекс, после чего δ – субъединица обеспечивает разрыв водородных связей ДНК и появляется открытый транскрипционный комплекс, в котором расплетено примерно 17 пар оснований ДНК. Синтезируемая цепь РНК на 5'-конце начинается либо рррА, либо с рррГ. После того как синтезирован олигонуклеотид из 8-10 нуклеотидных остатков, δ – субъединица отделяется от РНК-полимеразы, а вместо нее к молекуле фермента присоединяется несколько факторов элонгации.

Для инициации транскрипции праймер не нужен, и мРНК синтезируется в направлении 5'-3' путем последовательного добавления нуклеозидтрифосфатов. РНК-полимераза распознает промоторную последовательность у эукариотов выше старт-сайта, однако, РНК-полимеразы I, II, III могут распознавать различные старт-сайты. Для РНК-полимеразы II необходимы три старт-сайта: СААТ – бокс, (СА-СААТС) в положении 110, ДС- бокс (ДДДСДД) в положении 40 и ТАТА- бокс (бокс Хогнесса) в положении 25.

Активация промотора происходит с помощью белка ТАТА-фактора, он взаимодействует со специфической последовательностью нуклеотидов промотора ТАТА – бокса. Присоединения ТАТА-фактора облегчает взаимодействие промотора с РНК-полимеразой. Факторы инициации вызывают изменения конформации РНК-полимеразы и обеспечивают раскручивание примерно одного витка спирали ДНК, т.е. образуется транскрипционная вилка, в которой матрица доступна для инициации синтеза цепи РНК. Схема инициации транскрипции показана на рис. 26.



Третья структура σ -субъединицы (цилиндры изображают альфа-спирали)

Рис 26. Схема инициации транскрипции

После инициации транскрипции, когда длина первичного транскрипта достигает примерно 20 нуклеотидных остатков происходит кэпирование 5' конца, под действием фермента гуанозилтрансферазы, происходит гидролиз макроэргической связи молекулы ГТФ и присоединяется нуклеотиддифосфатный остаток 5'-фосфатной группы к 5' –концу синтезированного фрагмента РНК с образованием 5',5' –фосфодиэфирной связи. Далее идет метилирование остатка гуанина в составе ГТФ с образованием N₇ - метилгуанозина, в итоге завершается формирование кэпа.

Кэп выполняет три функции:

- защищает мРНК от ферментативного гидролиза;
- играет большую роль при последующем сплайсинге;
- способствует трансляции мРНК.

Элонгация

Фермент РНК-полимераза осуществляет синтез полирибонуклеотидной цепи, соединяя рибонуклеотиды в определённой последовательности, отражающей структуру кодирующей цепи ДНК в соответствии с принципом комплементарности. По мере продвижения комплекса элонгации, содержащего РНК-полимеразу, по кодирующей цепи должно происходить расплетение ДНК. Оно необходимо для правильного образования комплементарных пар со встраиваемыми в цепь РНК рибонуклеотидами. Размер расплетенного участка ДНК постоянен в течение всего процесса транскрипции и составляет около 17 пар на молекулу РНК-полимеразы. Это позволяет предположить, что РНК-полимераза ассоциирована с дополни-

тельным фактором, проявляющим расплетающую активность, благодаря которой и раскрывается спираль ДНК (рис 27). Синтез молекулы РНК идет от 5'- к 3'-концу комплементарно матричной ДНК. По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расхождение, а позади-восстановление двойной спирали ДНК.

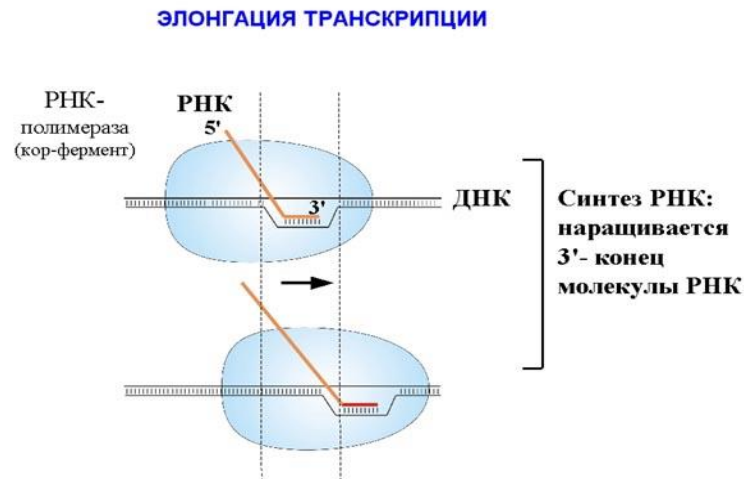


Рис.27. Элонгация транскрипции

Терминация

Как только РНК-полимераза дойдет до сайта терминации, процесс транскрипции заканчивается. Сигнал терминации синтеза молекулы РНК представляет собой определенную последовательность, расположенную в пределах кодирующей цепи ДНК. Этот сигнал распознается терминирующим белком – (ρ-фактором). Терминирующие кодоны обычно дублируются. Первым, основным терминирующим кодоном выступает УАА, вслед за ним близко расположены УАГ или УГА. На рис. 28 показана общая схема транскрипционного процесса.

В результате процесса транскрипции образуется первичный РНК-транскрипт.

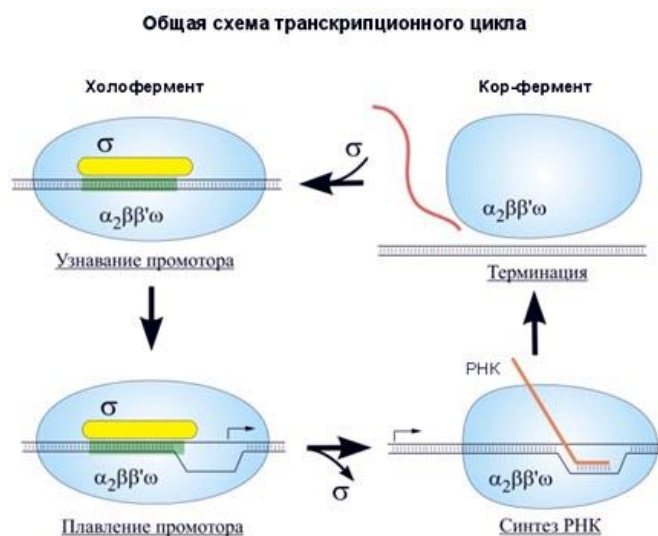


Рис. 28. Общая схема транскрипционного цикла

Процессинг молекулы РНК

У прокариот первичные транскрипты м-РНК – кодирующих генов начинают использоваться в качестве матриц белкового синтеза еще до полного завершения транскрипции. Транскрипция и трансляция у прокариот – это сопряженный процесс. Прокариотические м-РНК транслируются в том виде, в каком они транскрибируются. На рис.29 приводится схема транскрипции у кишечной палочки.

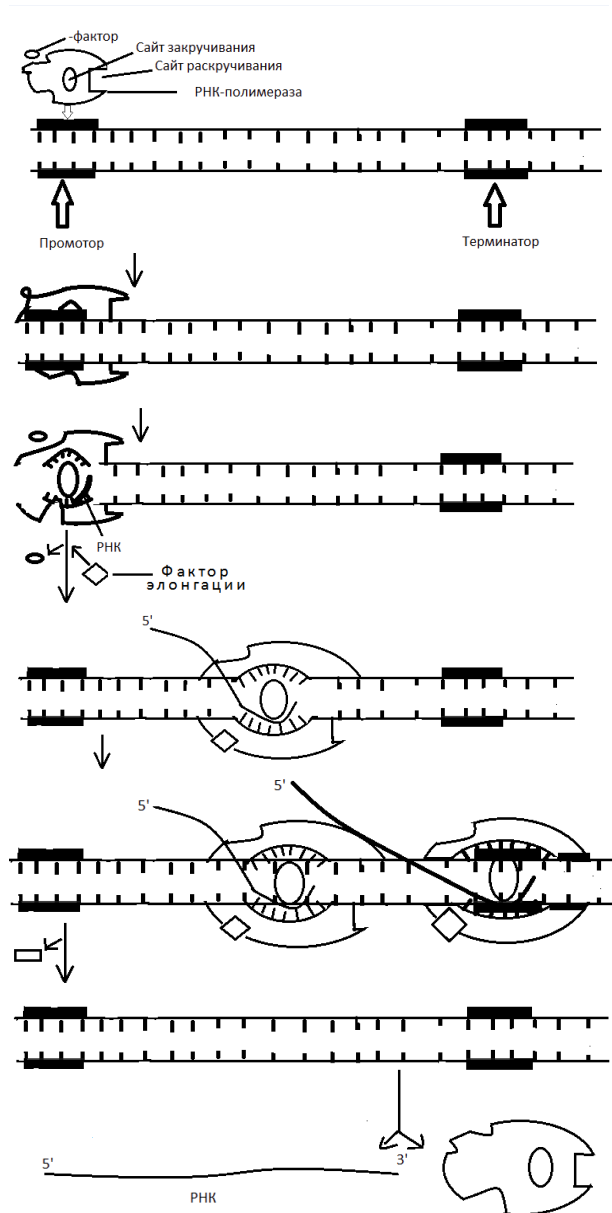


Рис. 29. Схема транскрипции, катализируемой РНК-полимеразой *E. coli*.

- 1 - осуществление РНК-полимеразой после присоединения σ-фактора (фактор инициации) поиска промотора;
- 2 - образование закрытого промоторного комплекса: РНК-полимераза связывается с зоной промотора ДНК;
- 3 - образование открытого комплекса: РНК-полимераза раскручивает двойную спираль ДНК, получает доступ к азотистым основаниям матричной цепи и начинает синтез РНК (стадия инициации);
- 4 - отсоединение σ-фактора и присоединение фактора элонгации создают условия для элонгации транскрипции: РНК-полимераза быстро продвигается по ДНК, раскручивая ее двойную спираль, синтезирует РНК и вновь закручивает спираль ДНК позади места синтеза РНК;
- 5 - завершение (терминация) синтеза РНК: РНК-полимераза достигает зоны терминатора, где синтез РНК прекращается
- 6 - высвобождение готовой РНК-транскрипта в виде копии матричной цепи ДНК. Скорость роста нуклеотидной цепи транскрипции *E.coli* оценивается в 30 -50 нуклеотидов в секунду.

Молекулы РНК, синтезированные в клетках млекопитающих, часто сильно отличаются от молекул РНК, транскрибированных в прокариотических клетках, так как первичный транскрипт (молекула – предшественник) содержит экзоны и интроны, поэтому практически все первичные транскрипты РНК у эукариот подвергаются процессингу и сплайсингу с образованием зрелой, т.е. активной мРНК (рис.30).

Процессинг – это созревание первичного транскрипта, в ходе которого происходят следующие модификации:

1. **Кэпирование - химическая модификация 5' конца идет на уровне элонгации.**
2. **Модификация 3' – конца пре-мРНК.** На 3'-конце первичного транскрипта мРНК с помощью фермента полиА-полимеразы формируется полиА-последовательность (от 100 до 200 остатков адениловой кислоты). Наличие полиА-последовательности на 3'-конце облегчает выход мРНК из ядра и замедляет ее гидролиз в цитоплазме. Молекулы тРНК и рРНК не содержат кэпа и полиА-последовательности.
3. **Сплайсинг (удаление интронов и сшивание экзонов).**

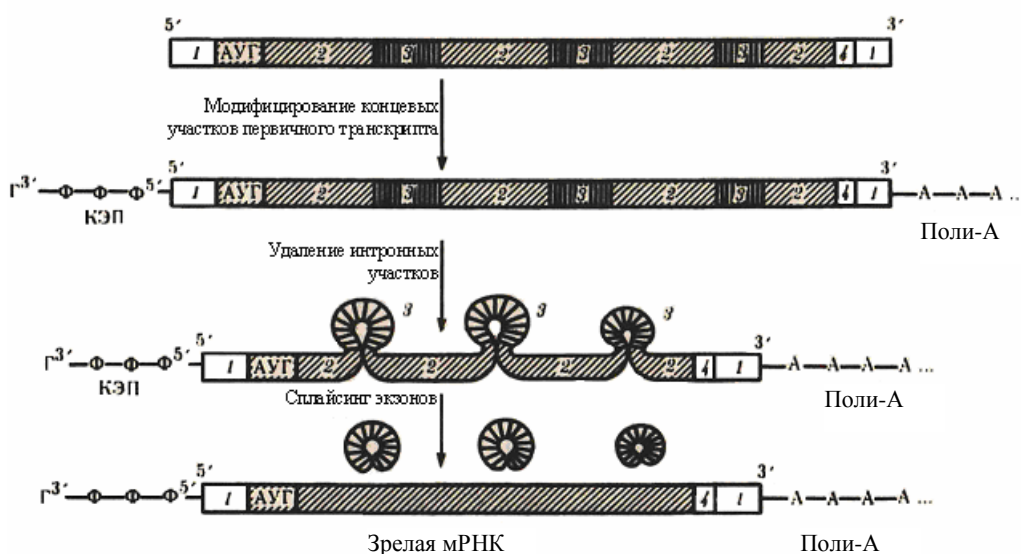


Рис. 30. Процессинг у эукариот

Процесс сплайсинга включает:

- разрезание 5' конца донорного сайта сплайсинга;
- разрезание 3' конца донорного сайта сплайсинга;
- освобождение интрона в форме лассо (напоминает ковбойское лассо);
- соединение двух экзонов, находящихся по обе стороны удаленного интрона (рис. 31).

Во время этих процессов весь комплекс удерживается сплайсосомой (рибозимой).

Сплайсосома – это комплекс рибонуклеототеина 60S, состоящий из предшественника пре-м РНК и трех различных видов мяРНК. Молекулы мяРНК иногда называют «снурп». Отдельные мяРНК по принципу комплементарности «узнают» специфические последовательности интронов первичного транскрипта, мя РНК катализируют реакцию расщепления 3'. 5' –фосфодиэфирной связи на границе экзона с интроном и последующее соединение 2 экзонов.

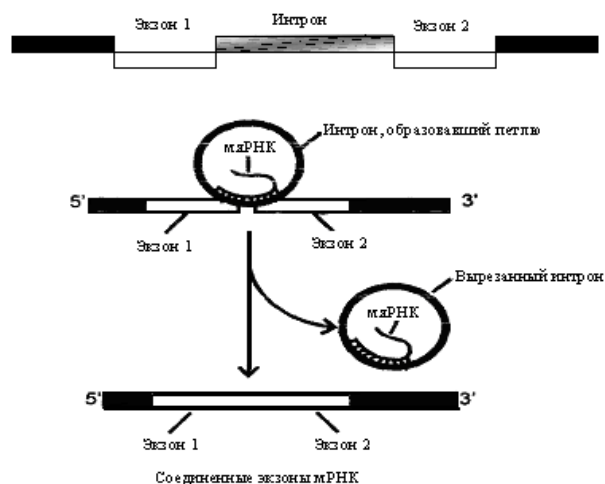


Рис. 31. Роль малой ядерной РНК (мяРНК) в вырезании интронов и воссоединении экзонов. Основания на концах интрона образуют комплементарные пары с определенными основаниями мяРНК. Процесс соединения экзонов сопровождается вырезанием интрона.

После завершения сплайсинга зрелая мРНК становится примерно в 4 раза короче пре-мРНК. Через ядерные поры она проходит в цитоплазму к рибосомам, соединяясь с малой субъединицей рибосомы.

Способность РНК к сплайсингу очень важна с точки зрения эволюции, поскольку биохимические реакции с участием ДНК и РНК могли протекать даже до развития белковых ферментов, участвующих в синтезе ДНК и РНК.

Ошибки процессинга и сплайсинга мРНК-транскриптов могут быть причиной ряда заболеваний, например, вызывать определённые виды талассемии.

Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Репликация ДНК: определение понятия, условия репликации, стадии репликации.
2. В чем суть процесса инициации репликации ДНК? Какие ферменты и белковые факторы принимают в нем участие?
3. Виды ДНК-полимераз в эукариотических клетках, их функции.
4. Особенности синтеза и строения РНК.
5. Условия транскрипции.
6. Понятие оперона (транскриптона), экзон, интрон, их биологическая роль.
7. Дайте краткую характеристику РНК-полимеразе (субъединичный состав, функции субъединиц).
8. Определите нуклеотидную последовательность участков молекулы РНК, синтезированной с помощью РНК-полимеразы, если затравка ДНК имела следующие нуклеотидные фрагмента: а) АЦТАГАА-ТАТЦ; б) ТТАЦАГГТАЦГ.

9. В чем состоит отличие пре-мРНК от мРНК
10. Посттранскрипционное созревание мРНК.
11. Ретровирус HTLV-III, вызывающий СПИД у человека, является РНК-содержащим вирусом, то есть он не имеет своей ДНК. Какой фермент вируса необходимо ингибировать или уничтожить, чтобы прекратить размножение вируса?
12. Матрица ДНК представлена следующей последовательностью нуклеотидов: (5') ЦГАЦГГЦГЦГААГТЦАГГГТГТТТААГ (3'). Зная, что нуклеотидные последовательности принято писать в направлении 5'-3':
 - a. напишите последовательность нуклеотидов участка ДНК, синтезируемого с данной матрицы ДНК ДНК-полимеразой;
 - b. напишите нуклеотидную последовательность участка мРНК, транскрибируемой РНК-полимеразой, если в качестве матрицы этот фермент использует синтезированный выше участок ДНК.
13. ДНК-полимеразы могут выявлять и исправлять ошибки, тогда как РНК-полимеразы такой способностью не обладают. Поскольку ошибка даже в одном основании как при репликации, так и при транскрипции может привести к ошибке в синтезе белка, можете ли Вы дать биологическое объяснение этому явлению?

РАЗДЕЛ 3. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

3.1. Генетический код

Перевод информации, заключенной в полинуклеотидной последовательности мРНК, в аминокислотную последовательность белка требует определенного способа кодирования, т.е. существования определенной закономерности, согласно которой чередование четырех нуклеотидов мРНК задает специфическую последовательность аминокислот в белке. Язык жизни - генетический код – основан на использовании алфавита, состоящего всего из четырех букв: **А, Т, Г, Ц**. Эти буквы соответствуют нуклеотидам, найденным в ДНК: А – дезоксиадениловый, Г- дезоксигуаниловый, Т – тимидиловый и Ц – дезоксицитидиловый нуклеотиды. Они входят в состав «трехбуквенных» кодовых «слов», названных **кодонами**. Один кодон состоит из трех нуклеотидов. Общий набор таких кодонов составляет **генетический код**. Последовательность серии кодонов, расположенных в цепи ДНК, образует определённый **ген**, по которому, как по матрице, синтезируется молекула РНК.

В нуклеотидной последовательности молекулы мРНК представлены кодоны для каждой аминокислоты. Так как для синтеза клеточных белков необходимо 20 аминокислот, то должно быть не менее 20 кодонов, составляющих генетический код.

Таблица №2

Полные и сокращенные названия аминокислот даны по международной терминологии

| Аминокислота | Сокращенное название | Аминокислота | Сокращенное название |
|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Глицин | Гли | Аланин | Ала |
| Валин | Вал | Лейцин | Лей |
| Изолейцин | Илей | Фенилаланин | Фен |
| Тирозин | Тир | Триптофан | Три |
| Лизин | Лиз | Аргинин | Арг |
| Гистидин | Гис | Аспарагиновая кислота | Асп |
| Аспарагин | Асн | Глутаминовая кислота | Глу |
| Глутамин | Глн | Цистеин | Цис |
| Метионин | Мет | Серин | Сер |
| Треонин | Тре | Пролин | Про |

Генетический код является **триплетным**, поэтому в результате различных комбинаций нуклеотидов образуется **64 кодона** (триплета, состоящего из трех нуклеотидов). **Триплетность** – это основное свойство генетического кода. Три из 64 кодонов УАА, УАГ и УГА, не кодируют каких-либо аминокислот – они были названы **«нонсенс-кодонами»**. Но оказалось, что это далеко не «бессмысленные» кодоны. По крайней мере для двух из них доказана функция **сигналов терминации** («**стоп-кодона**») -

они определяют место, где должен быть остановлен синтез полипептидной цепи белка. **Функциональное значение 61 из открытых кодонов - кодирование 20 аминокислот, обеспечение их включения в полипептидную цепь строго в «своем» месте.**

Таблица №3

Таблица триплетов генетического кода для кодонов ядерной мРНК

| Первый нуклеотид | Второй нуклеотид | | | |
|------------------|------------------|----------|---------|----------|
| | Ц | Г | У | А |
| Ц | ЦЦЦ Про | ЦГЦ Арг | ЦУЦ Лей | ЦАЦ Гис |
| | ЦЦГ Про | ЦГГ Арг | ЦУГ Лей | ЦАУ Гис |
| | ЦЦУ Про | ЦГУ Арг | ЦУУ Лей | ЦАГ Глн |
| | ЦЦА Про | ЦГА Арг | ЦУА Лей | ЦАА Глн |
| Г | ГЦЦ Ала | ГГЦ Гли | ГУЦ Вал | ГАЦ Асп |
| | ГЦГ Ала | ГГГ Гли | ГУГ Вал | ГАУ Асп |
| | ГЦУ Ала | ГГУ Гли | ГУУ Вал | ГАГ Глу |
| | ГЦА Ала | ГГА Гли | ГУА Вал | ГАА Глу |
| У | УЦЦ Сер | УГЦ Цис | УУЦ Фен | УАЦ Тир |
| | УЦГ Сер | УГУ Цис | УУУ Фен | УАУ Тир |
| | УЦУ Сер | УГГ Три | УУА Лей | УАГ стоп |
| | УЦА Сер | УГА стоп | УУГ Лей | УАА стоп |
| А | АЦЦ Тре | АГЦ Сер | АУЦ Иле | ААЦ Асн |
| | АЦГ Тре | АГУ Сер | АУУ Иле | ААУ Асн |
| | АЦУ Тре | АГГ Арг | АУА Иле | ААГ Лиз |
| | АЦА Тре | АГА Арг | АУГ Мет | ААА Лиз |

Примечание: В таблице приведены кодоны в мРНК.

Другое важнейшее свойство генетического кода - его **специфичность**. Каждому кодону соответствует только одна аминокислота. В этом смысле генетический код строго однозначен. Это свойство обеспечивает способность мРНК и тРНК образовывать комплементарные пары оснований между **кодоном мРНК и антикодоном тРНК**.

Третье свойство - **вырожденность**. Это означает, что несколько кодонов кодируют одну и ту же аминокислоту, при этом кодоны могут отличаться друг от друга третьим нуклеотидом, который в кодоне менее важен, чем первые два. Замена третьего нуклеотида не сказывается на смысле кодона. Избыточность кодирующих последовательностей – ценнейшее свойство генетического кода, так как она повышает устойчивость информационного потока к неблагоприятным воздействиям внешней и внутренней среды.

Генетический код - **неперекрывающийся**: начавшись на стартовом кодоне АУГ, который прочитывается мРНК как метионин, считывание идущих непосредственно друг за другом триплетов идет далее без каких-либо пропусков вплоть до достижения «нонсенс-кодона». В этом случае говорят, что генетический код не содержит знаков пунктуации и запись информации носит линейный характер.

Колинеарность генетического кода представлена линейным соответствием последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в белковом продукте.

Генетический код - **универсален**: все живые организмы от бактерий (вирусов) до млекопитающих используют в основном один и тот же код. Исключение составляет митохондриальная мРНК, которая содержит 4 триплета, имеющие другое значение, чем ядерная мРНК. Митохондриальный триплет мРНК АУА кодирует триптофан, АУА – метионин, а АГГ и УГА прочитываются как дополнительные стоп – кодоны.

Таким образом, генетический код – это система записи информации в виде последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК о последовательности аминокислот в молекуле белка.

Расшифровка генетического кода позволила понять механизм синтеза белка, уточнить его молекулярные основы.

Процесс перевода генетической информации, заложенной в нуклеотидной последовательности мРНК, в аминокислотную последовательность полипептидной цепи получил название **трансляция**.

Поскольку продуктом трансляции является специфический белок, то процесс трансляции называют «**биосинтезом белка**».

В биосинтезе белка выделяют 2 этапа: **цитозольный и рибосомальный**.

3.2. Цитозольный этап биосинтеза белка.

На цитозольном этапе биосинтеза белка или этапе рекогниции происходит узнавание и отбор аминокислот и присоединение их к тРНК. Все тРНК имеют общие черты, как в первичной структуре, так и в способе складывания полинуклеотидной цепи во вторичную структуру за счет взаимодействия между основаниями нуклеотидных остатков (названная первоначально конформацией клеверного листа, на самом деле эта конформация имеет неправильную, Г-образную форму).

тРНК - относительно небольшие молекулы, длина их цепей варьирует от 74 до 85 нуклеотидных остатков. Молекулярная масса от 24000 до 29000. На долю т-РНК приходится около 10-15% общего количества клеточной РНК. Все т-РНК имеют одинаковый 3'-конец (ЦЦА-конец). Именно этот конец связывается с аминокислотным остатком при образовании аминоацил-т-РНК. Нуклеотидный триплет, комплементарный кодону мРНК для аминокислоты (антикодон), находится на антикодоновой петле. Таким образом, тРНК помимо связывания определенной аминокислоты, осуществляемого ковалентной связью, обладает также специфическим триплетом (антикодоном), который узнает и комплементарно связывается с кодоном мРНК.

Для каждой из 20 аминокислот существует, по крайней мере, один вид тРНК. Все молекулы тРНК характеризуются необычайным сходством, как в функциональном отношении, так и по пространственной структуре. Взаимное узнавание тРНК и соответствующих им аминокислот происходит с помощью специальных ферментов - аминоацил-т - РНК - синтаз (АРС-аз). Их существует в клетке не менее 20 по количеству присутствующих аминокислот. При общей схожести их функции - активация аминокислот и

перенос их на тРНК - АРСазы отличаются по молекулярному весу (от 40 000 до 30 0000 ДА) и могут состоять из одной, либо из нескольких полипептидных цепей. С функциональной точки зрения АРС-азы обладают исключительно высокой тройной специфичностью по отношению к транспортной РНК, определённой аминокислоте и энергии АТФ.

В активном центре этих ферментов есть 4 участка для узнавания и связывания:

1 – для присоединения аминокислоты

2 – для взаимодействия с тРНК

3 – для АТФ

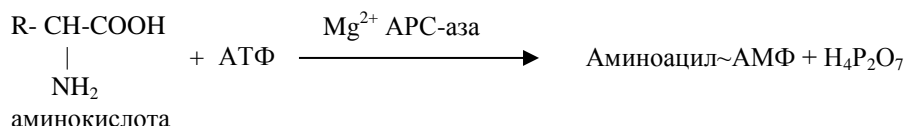
4 – для воды, которая используется для гидролитического расщепления «неправильно» присоединенной аминокислоты.

АРС-азы способны исправлять ошибки при присоединении близких по структуре аминокислот. Но такие ошибки достаточно редки: на 1300 соединений может быть одна ошибка.

АРС-азы осуществляют активацию аминокислот в 2 стадии.

Первая стадия - активация аминокислоты - происходит с участием АТФ.

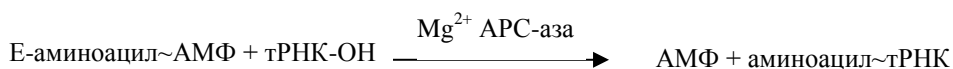
На первой стадии аминокислота присоединяется к ферменту и реагирует с АТФ с образованием богатого энергией промежуточного соединения – аминоацил АМФ.



Вторая стадия - перенос активной аминокислоты на т-РНК.

Активированный аминокислотный остаток легко атакует одну из гидроксильных групп С₂ - или С₃ - рибозного кольца в составе концевой аденилового нуклеотида на акцепторном участке тРНК. У всех тРНК этот концевой нуклеотид представлен адениловой кислотой, а весь концевой триплет акцепторного конца у всех тРНК одинаков (ЦЦА).

Аминоацильный остаток аминоациладенилата, оставаясь связанным с ферментом, взаимодействует с молекулой соответствующей тРНК с образованием аминоацил-тРНК.



В составе аминоацил-тРНК есть макроэргическая связь, энергия которой используется в биосинтезе белка, для образования пептидной связи.

В результате двух стадий активации аминокислот в цитозоле образуются комплексы аминоксил-тРНК, способные перемещаться к месту синтеза белка - к рибосомам (рис.32).

Суммарное уравнение цитозольного этапа трансляции.

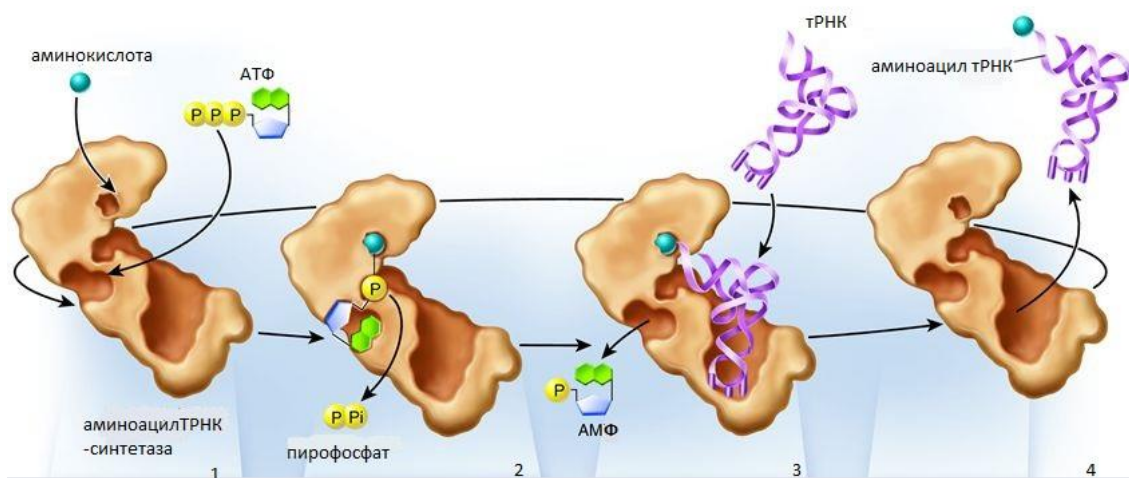
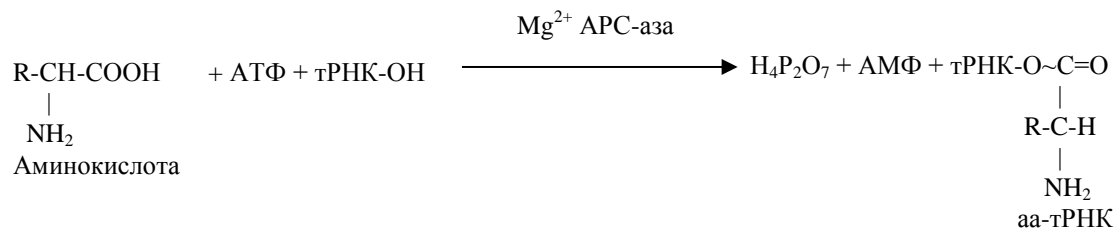


Рис. 32. Схема образования aa-тРНК

Далее аминоксил-тРНК путем простой диффузии переносит аминокислоты к рибосомам, где происходит **рибосомальный этап синтеза белка**.

3.3. Рибосомальный этап синтеза белка

Рибосомы - очень мелкие сферической формы органеллы (диаметром около 20нм). Они локализованы в основном в цитоплазме, но обнаруживаются также в ядре и в митохондриях. У эукариот различают рибосомы двух «типов»: «свободные», которые находятся в цитоплазме, и связанные с ЭР. Рибосомы, ассоциированные с ЭР, синтезируют белки на «экспорт», которые выходят через каналы ЭР в плазму крови и участвуют в обновлении белков ЭР, мембраны аппарата Гольджи, митохондрий, лизосом.

Число рибосом в цитоплазме живых клеток чрезвычайно велико как у прокариот, так и у эукариот. В обычной бактериальной клетке содержится до 10000 рибосом, а в эукариотических клетках число их в несколько раз больше. Рибосомы состоят из примерно равных по массе количеств р-РНК и белка, то есть представляют собой рибонуклеопротеиновые частицы (надмолекулярные комплексы), физически они представляют собой компактную частицу специфической формы, лишенную внутренней и внешней

симметрии. Каждая рибосома состоит из **2 субъединиц - большой и малой** (рис. 33).

По размерам и молекулярной массе все изученные до сих пор рибосомы делят на 3 группы:

1 группа - относительно мелкие бактериальные рибосомы; имеют константу седиментации 70S и $M 3 \times 10^6$. 70S рибосомы состоят из малой 30S и большой 50S частицы. Весовое соотношение р-РНК/белок составляет 2:1.

2 группа - крупные рибосомы эукариотических клеток. Они имеют константу седиментации 80S и $M 4,5 \times 10^6$. 80S рибосомы состоят из малой 40S и большой 60S субъединиц. Весовое отношение р-РНК/белок: 1:1.

3 группа - рибосомы митохондрий и хлоропластов эукариотических клеток - 70S.

Малая субъединица изогнута в виде телефонной трубки, а большая напоминает ковш.

В ходе синтеза белка рибосомы изменяют свою конформацию. Рибосома служит местом, где эти молекулы могут занять по отношению друг к другу совершенно определённое положение.

Рибосома - молекулярная машина, протягивающая вдоль себя цепь мРНК, считывающая закодированную в мРНК генетическую информацию, и параллельно, в соответствии с кодом, синтезирующая полипептидную цепь белка из поступающих в нее аминокислотных остатков. В процессе работы рибосома потребляет энергию гидролиза ГТФ.

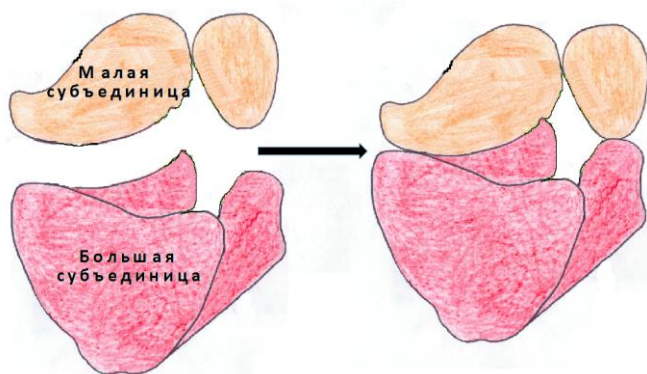


Рис. 33. Модель рибосомы

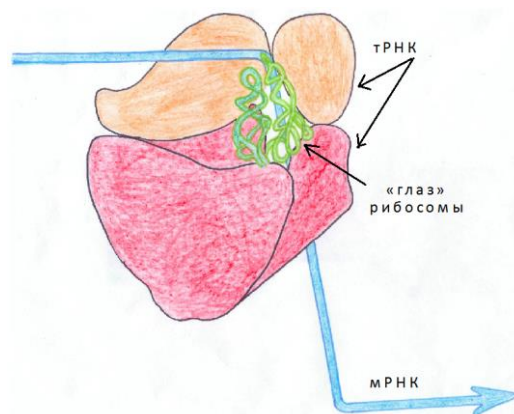


Рис. 34. Расположение функциональных центров на малой (вверху) и большой (внизу) субъединицах рибосомы.

Высокополимерная рРНК - это ядро рибосомной субъединицы, определяющее ее компактность, ее форму и организацию на ней рибосомных белков.

Согласно большинству современных эволюционных концепций, примитивный предшественник рибосомы мог состоять только из РНК и лишь в ходе эволюции постепенно дополняться белками. Молекула рРНК служит каркасом для специфического размещения (укладки) многочисленных

рибосомальных белков. Каждый белок имеет свою персональную площадку на рРНК и специфически узнает только этот участок РНК.

Многочисленные рибосомальные белки могут играть двоякую роль в современной рибосоме. С одной стороны, они могут непосредственно участвовать в функциях связывания субстратов и каталитических функциях рибосомы, локализуясь в соответствующих функциональных центрах и обеспечивая их своими активными группами. С другой – рибосомальные белки могут служить стабилизаторами или модификаторами определенных локальных структур рРНК и таким образом поддерживать их в функционально активном состоянии или способствовать их переключениям из одного состояния в другое.

Основная морфологическая черта электронно-микроскопических изображений рибосомы - борозда, разделяющая две рибосомные частицы. Эта борозда сильно расширяется в одном месте: виден так называемый «глаз» рибосомы (рис. 34). Указанная особенность отражает реальный факт существования значительной полости между двумя рибосомными частицами. Как показывают последние исследования, именно в этой полости размещаются основные субстраты рибосомы - молекулы пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК, участвующие в образовании полипептидной цепи. В рибосоме есть два центра для присоединения молекул тРНК: аминоацильный (А) и пептидильный (Р), в образовании которых участвуют обе субъединицы. Вместе центры А и Р включают участок мРНК равный 2 кодонам. В ходе трансляции центр А связывает аа-тРНК, строение которой определяет кодон, находящийся в области этого центра. Центр Р занимает пептидил-тРНК, т.е. РНК связанная с пептидной цепочкой уже синтезированной.

При рассмотрении малой субъединицы можно отметить головку и тело, разделенные глубокой бороздой - шеей - которая и представляет то место, в котором размещается участок связывания м-РНК и через которое цепь м-РНК протягивается от одного конца к другому в процессе трансляции.

У большой субъединицы тоже есть головка - это центральный выступ среди трех выступов этой субъединицы. В шее (борозде, отделяющей головку от тела) размещается главный каталитический центр рибосомы.

Таким образом, можно сформулировать **основные принципы**, лежащие в основе молекулярной организации рибосом.

- **Рибосома всегда построена из двух неравных субъединиц. Субъединицы рибосомы довольно лабильно ассоциированы друг с другом.**
- **Высокополимерная РНК каждой рибосомной субъединицы компактно свернута специфическим образом, формируя структурное ядро рибосомной субъединицы.**
- **Разнообразные рибосомные белки собраны на ядре РНК как на каркасе, так что каждый белок узнаёт свою посадочную площадку.**
Функции малой и большой субъединицы различные.

Малая субъединица рибосомы инициирует процесс биосинтеза белка, связывает мРНК, т.е. служит первичным приемником генетической информации для белок-синтезирующего аппарата, в ходе трансляции удерживает мРНК на себе, декодирует ее с помощью тРНК и последовательно перебирает ее кодоны. Все эти операции с генетическим материалом могут быть определены как **генетические**.

Большая субъединица рибосомы в трансляции выступает как фермент, ответственный за образование пептидных связей и в целом, за синтез (элонгацию) полипептидной цепи. Это главная **энзиматическая функция рибосомы**.

Никаких белков-ферментов, катализирующих образование пептидных связей и перемещение мРНК на рибосоме, не существует. Не найдено и никакого специального белка в составе рибосомы, который бы обладал такой энзиматической функцией.

Транспептидация катализируется пептидилтрансферазным центром (РТС) самой рибосомы как интегральной частью большой рибосомной частицы, и основной вклад в организацию центра вносит, по-видимому, рРНК.

Кроме реакции транспептидации большая рибосомная субъединица участвует в процессе транслокации с гидролизом энергии ГТФ в процессе трансляции.

Обе субъединицы рибосомы совместно выполняют механическую функцию - работают как «лентопротяжный механизм».

В синтезе белка участвуют:

- матричная РНК (мРНК), несущая генетическую информацию от клеточного ядра;
- транспортная РНК (тРНК), доставляющая к рибосомам требуемые аминокислоты;
- белковые факторы, ответственные за процесс трансляции.

Рибосомальный этап синтеза белка удобно разделить на 3 стадии или фазы:

- **инициацию** – начало – сборка инициирующего комплекса;
- **элонгацию** – «рождение» первого дипептида, наращивание полипептидной цепи и перемещение (транслокация) мРНК;
- **терминацию** – завершение построения первичной структуры будущего белка, сброс полипептида с рибосомы.

Инициация. Сборка инициирующего комплекса

Сигналы инициации трансляции поступают с определенных функциональных участков мРНК (рис. 35).

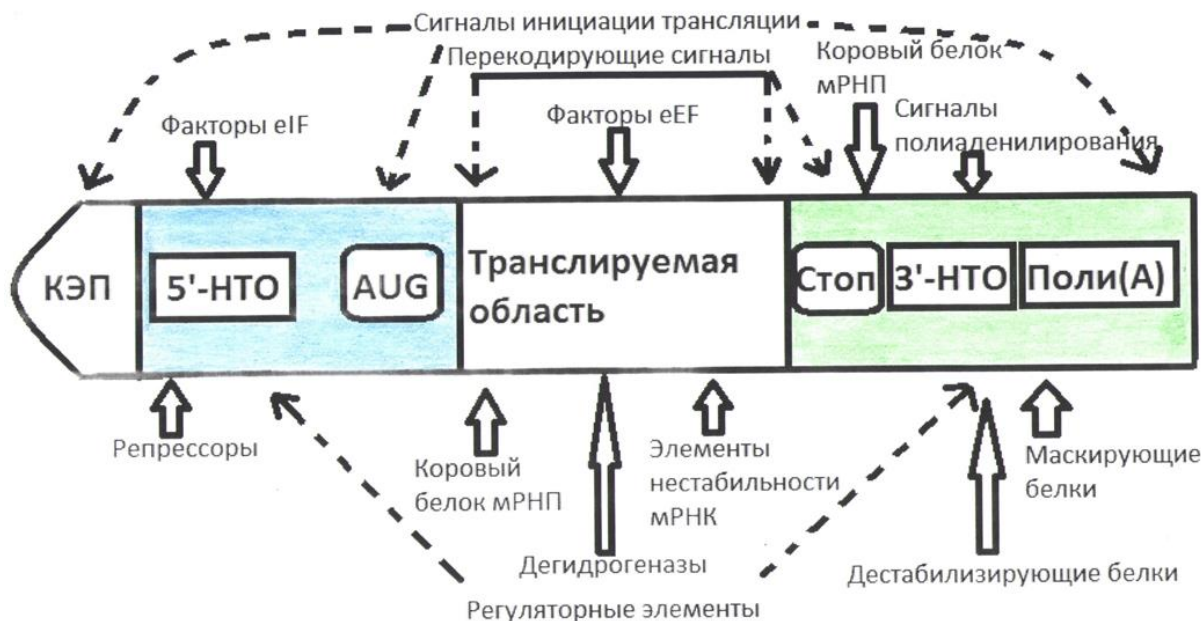


Рис. 35. Схема расположения функциональных участков в молекуле мРНК эукариот (по А.С.Спирину, 1996). Сплошные стрелки – области присоединения белков, участвующих в регуляции трансляции. Пунктирные стрелки – расположение тех или иных регуляторных последовательностей (сигналов) в различных участках мРНК

Условия необходимые для инициации:

- мРНК, несущая генетическую информацию о последовательности аминокислот в полипептидной цепи;
- N- формилметионин - тРНК-иницирующая аминокислота у прокариот и метионин- тРНК у эукариот;
- Иницирующий кодон мРНК (АУГ, ГУГ, т.е. кодоны, транскрибирующие метионин);
- 30S - малая рибосомальная субчастица;
- 50S - большая рибосомальная субчастица;
- ГТФ - источник энергии, которая идет на связывание aa-тРНК в А- центре рибосомы;
- Ионы Mg^{2+} ;
- Белковые факторы инициации – eIF, порядка 10 факторов;
- АТФ

Сборка иницирующего комплекса – самая медленная стадия рибосомального этапа биосинтеза белка. Инициация трансляции представляет собой событие, в ходе которого происходит образование комплекса, включающего мет – тРНК, мРНК и рибосому. В этом процессе участвуют не менее 10 факторов инициации, которые обозначаются как eIF (от англ. eukaryotic initiation factors) с указанием номера и буквы (рис. 36).

Первоначально малая субъединица рибосомы соединяется с фактором инициации, который препятствует ее связыванию с большой субъединицей, но стимулирует объединение с тройным комплексом, включающим мет-тРНК, eIF-2 и ГТФ. Затем этот сложный комплекс связывается с 5' -

концом мРНК при участии нескольких eIF, один из факторов инициации узнает и присоединяется к участку «кэп» на молекуле мРНК (кэп связывающий белок).

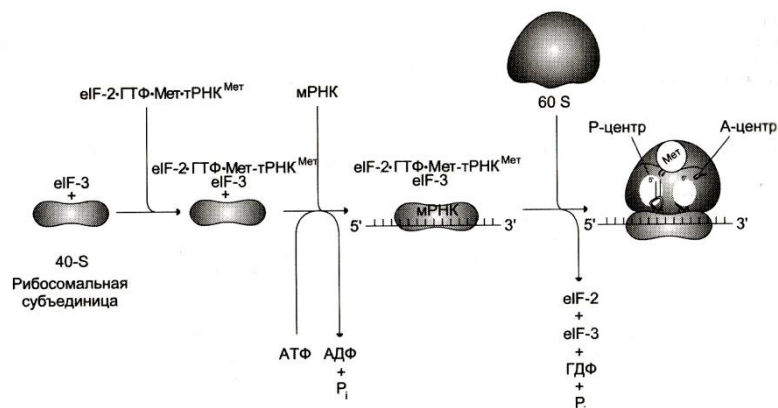


Рис. 36. Схема образования иницирующего комплекса в ходе синтеза белка у эукариот

Прикрепившись к мРНК, малая субъединица начинает скользить по некодирующей части мРНК до тех пор, пока не достигает иницирующего кодона АУГ, это скольжение сопровождается гидролизом АТФ, энергия затрачивается на преодоление участков спирализации в нетранскрибируемой части мРНК от 40 до 80 нуклеотидов и более.

Достигнув начала кодирующей последовательности мРНК, малая субъединица останавливается и связывается с другим фактором инициации, ускоряющим присоединение большой субъединицы и образование иницирующего комплекса за счет гидролиза ГТФ до ГДФ с участием ионов Mg^{++} . При этом в малой субъединице формируются А и Р-центры рибосомы. В Р-центре оказывается АУГ-кодон мРНК с присоединенным к нему мет-тРНК^T, А – центр свободный для следующей аа-тРНК.

По завершению инициации рибосома располагается на мРНК, таким образом что в Р-центре находится иницирующий кодон АУГ с присоединенной к нему мет-тРНК, а в А-центре – триплет, кодирующий включение первой аминокислоты синтезируемого белка. Далее начинается самый продолжительный этап белкового синтеза – элонгация, в ходе которого рибосома с помощью аа-тРНК последовательно «читает» мРНК в виде триплетов нуклеотидов от 5' - конца к 3' концу, наращивая полипептидную цепочку.

Элонгация

Необходимые условия:

- Функциональная 70S- рибосома (иницирующий комплекс, аминоксил-т-РНК, соответствующие второму, третьему и т.д. кодомам мРНК)
- ГТФ, Mg^{+2}
- Белковые факторы элонгации (EF-1, EF-2, EF-3)

Элонгация - это постепенное удлинение полипептидной цепи. Этот повторяющийся процесс присоединения каждого нового аминокислотного остатка к растущей полипептидной цепи происходит в направлении от N к C - концу и повторяется столько раз, сколько аминокислотных остатков нужно присоединить для создания уникальной первичной структуры конкретного белка. Скорость наращивания полипептидной цепи *in vivo* оценивается в 10 аминокислотных остатков в секунду. Схематическое изображение элонгации представлено на рис. 37.

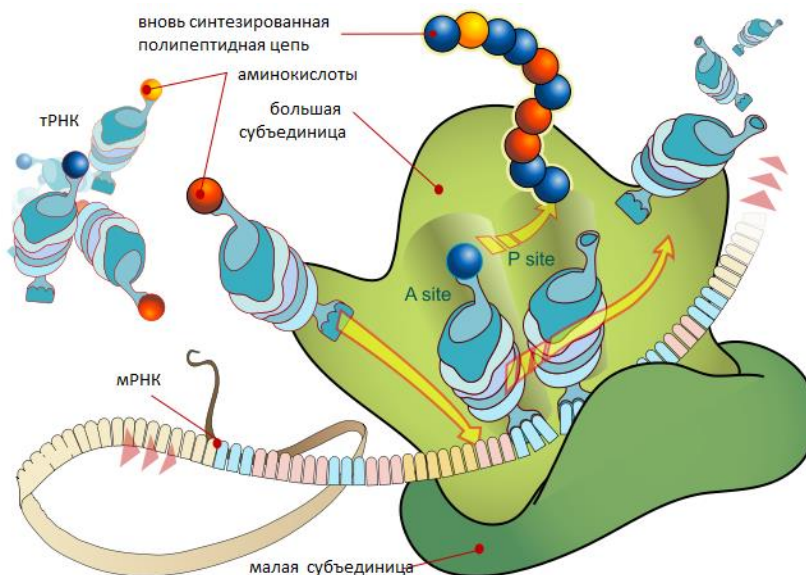


Рис. 37. Схема элонгации (Наращивание полипептидной цепи)

Включение каждой аминокислоты в белок происходит в 3 «шага»:

- aa-тРНК каждой входящей в белок аминокислоты связывается с А-центром рибосомы;
- пептид от пептидил-тРНК, находящийся в Р-центре, присоединяется к $\alpha\text{-NH}_2$ – группе аминоацильного остатка aa-тРНК А-центра с образованием новой пептидной связи;
- удлиненная на один аминокислотный остаток пептидил-тРНК перемещается из А-центра в Р-центр в результате транслокации рибосомы.

1 шаг - связывание аминоацил-тРНК в А-центром рибосомы (рис.38)

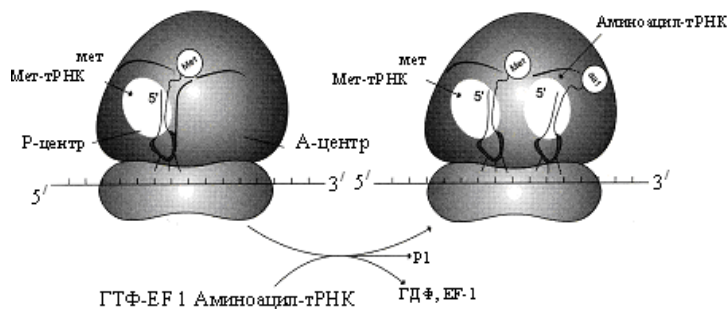
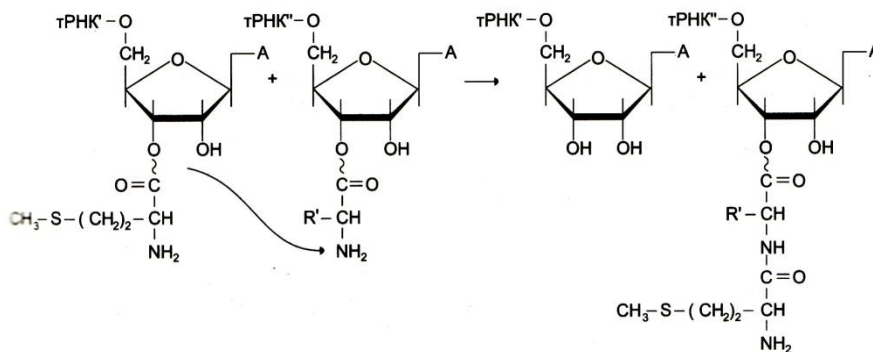


Рис. 38. Включение aa₁ –тРНК aa₁ и ГТФ в рибосому.

Кодон мРНК, располагающийся в А-центре рядом с иницирующим кодоном определяет природу aa_1 -тРНК, которая будет включена в А-центр. aa_1 -тРНК взаимодействует с рибосомой в виде тройного комплекса, состоящего из фактора элонгации EF-1, aa_1 -тРНК и ГТФ, при этом происходит комплементарное взаимодействие кодона мРНК с антикодоном aa_1 -тРНК. Связывание aa_1 -тРНК происходит за счет энергии ГТФ до ГДФ и P_i .

2 шаг - образование пептидной связи происходит сразу же после отщепления комплекса EF-1 и ГДФ от рибосомы. Эта стадия процесса получила название реакции *транспептидации*.



В ходе этой реакции остаток метионина мет-тРНК, связывается с α -аминогруппой первой аминокислоты, присоединенной к тРНК и расположенной в А-центре, образуется первая пептидная связь. Установлено, что пептидилтрансферазной активностью обладают 28 S рРНК большой субъединицы. Эти каталитически активные РНК получили названия рибозимов.

Полагают, что рибозимы- это «реликты» раннего периода эволюции, когда белки еще не приобрели такого значения, как в последующие периоды.

3 шаг - транслокация – К рибосоме присоединяется фактор элонгации EF-2 и за счет энергии ГТФ продвигает рибосому по мРНК на один кодон к 3' концу (т.е. на один тринуклеотид, на языке молекулярной генетики - "на один шаг"). В результате дипептид-тРНК, меняет свое положение относительно мРНК, из А-центра перемещается в Р-центр. Свободная от метионина тРНК покидает рибосому, а в область А-центра попадает следующий кодон для следующей aa_2 -тРНК (рис. 39).

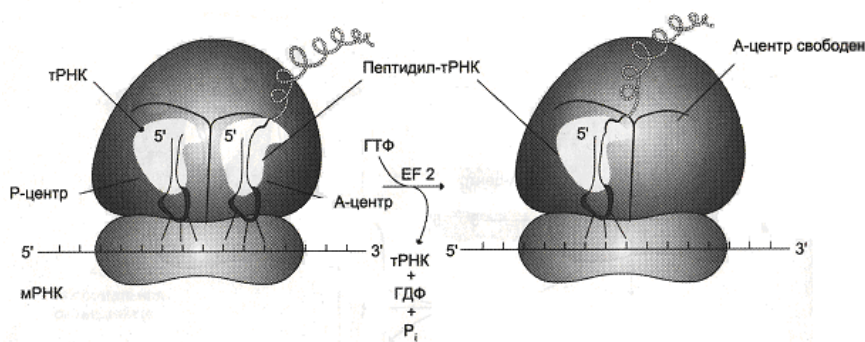


Рис. 39. Стадия транслокации.

Цикл элонгации повторяется N- количество раз.

На образование одной пептидной связи расходуется энергия четырёх макроэргических фосфатных связей (2 молекулы ГТФ и 2 молекулы АТФ).

Терминация.

Необходимые условия:

- АТФ;
- Терминирующий кодон в мРНК («стоп» - кодоны УАГ, УГА, УАА);
- Факторы терминации RF- (от англ. releasing factor).

После многих циклов элонгации, в результате которых синтезируется полипептидная цепь, в А-участке появляется один из терминирующих или «нонсен», или «стоп» кодонов - УАГ, УАА, УГА. Появление в А-участке этих кодонов распознаётся факторами терминации RF. RF-факторы при участии АТФ и большой субъединицы рибосом обеспечивают гидролиз связи между полипептидом и молекулой тРНК, занимающей Р-участок. После гидролиза и высвобождения синтезированного полипептида и тРНК 80S рибосома диссоциирует, распадается на 30S и 50S - субъединицы. Этот процесс происходит при низкой концентрации Mg^{2+} (рис.40).

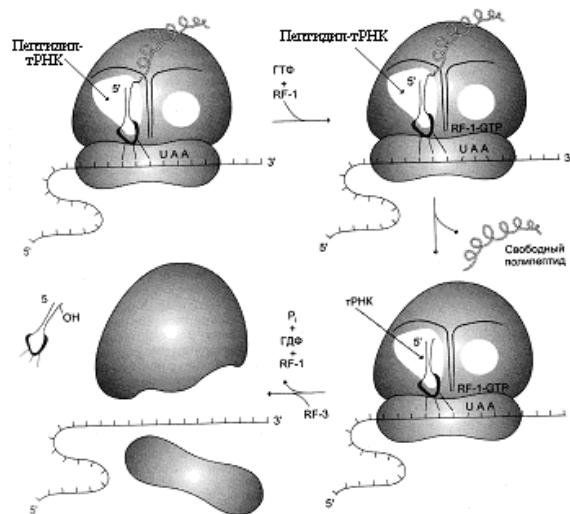


Рис. 40. Терминация синтеза белка

Полирибосомы

Одну и ту же цепь мРНК могут транслировать множество рибосом в виде полирибосомы или полисомы (рис. 41).

Каждая стадия трансляции (инициация, элонгация, терминация) осуществляется каждой рибосомой. Учитывая, что в процессе синтеза белка рибосома присоединяется к 5' концу мРНК и перемещается в направлении 3'-конца, 5'-конец освобождается, к нему присоединяется новая рибосома на которой начинается рост еще одной полипептидной цепи. Как правило,

много рибосом одновременно участвуют в синтезе белка на одной и той же мРНК, образуя комплекс, который называется полирибосомой.

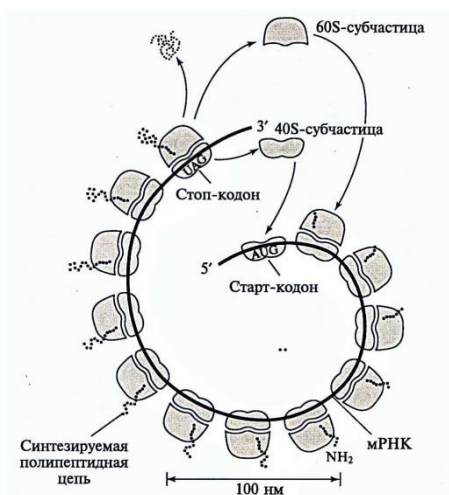


Рис. 41. Схематическое изображение полирибосомы, показывающее возможность сближения 5' и 3' концов молекулы мРНК, где расположены кэп, 5' и поли А – хвост, принимающие участие в инициации трансляции Рибосомы располагаются на мРНК с интервалом в 100 нуклеотидов.

Размер полисомальных комплексов сильно различается, но обычно он определяется размерами молекулы м-РНК. Очень большие молекулы мРНК, состоящие из нескольких тысяч нуклеотидов, могут образовывать комплексы с 50-100 рибосомами.

3.4. Посттрансляционные модификации полипептидной цепи

Полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям, либо будучи еще связанными с рибосомами, либо после завершения синтеза. Эти конформационные и структурные изменения полипептидных цепей получили название посттрансляционных изменений (процессинг) или ковалентной модификации.

Для того чтобы полипептид стал специфическим белком, часто происходят следующие дополнительные химические «доработки» полипептида:

- удаления N, или C - концевых аминокислотных остатков, присоединение кофакторов, простетических групп, частичный протеолиз сигнальных пептидов;
- ацетилирование некоторых аминокислот, фосфорилирование серина, треонина, карбоксилирование глутаминовой и аспарагиновой аминокислот;
- метилирование лизина, глутаминовой кислоты;
- гидроксилирование пролина, лизина
- гликозилирование полипептида (включение гликозильных остатков);
- образование дисульфидных мостиков;
- йодирование остатков тирозина и другие реакции.

Многие модификации осуществляются в ЭР (рис 42). Здесь происходит свертывание полипептидных цепей и формирование уникальной нативной конформации третичной или четвертичной структуры белков (фолдинг).

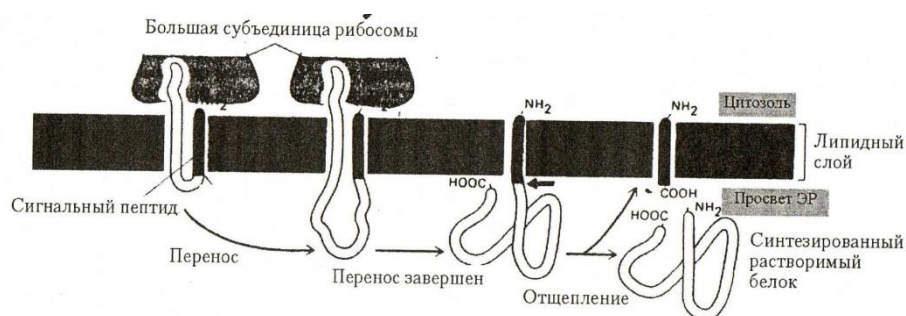


Рис. 42. Синтез белков на рибосомах и их перенос в просвет ЭР

Синтезируемые полипептидные цепи, образованные в результате последовательного соединения аминокислотных остатков, представляют собой как бы полностью «развернутые» белковые молекулы. Для того чтобы белок приобрёл присущие ему функциональные свойства, цепь должна определённым образом свернуться в пространстве, сформировав функционально активную (нативную) структуру. Сворачивание каждого белка приводит к образованию единственной нативной конформации. Процесс сворачивания белка *in vivo* не может считаться ни спонтанным, ни энергозависимым. Благодаря существующей внутри клетки высококоординированной системе регуляции, полипептидная цепочка с самого начала попадает под контроль факторов, обеспечивающих быстрое и эффективное образование нативной пространственной структуры.

Согласно современным представлениям процесс сворачивания имеет иерархическую природу.

1. Вначале очень быстро (за миллисекунды) формируются **элементы вторичной структуры**, служащие как бы «затравками» для образования более сложных архитектурных мотивов.
2. Второй стадией, проходящей очень быстро, является специфическая ассоциация некоторых элементов вторичной структуры с образованием **супервторичной структуры**: это может быть сочетание нескольких **альфа-спиралей**, нескольких **бета-цепей**, либо смешанные ассоциации данных элементов. Появляются и деспирализованные участки.
3. Следующим этапом, играющим важнейшую роль в формировании уникальной «архитектуры» белка, является образование специфических контактов между участками, значительно удалёнными один от другого в аминокислотной последовательности, но оказывающимися сближенными в **третичной структуре**. Полагают, что это главным образом гидрофобные взаимодействия, обусловленные сближением неполярных групп и вытеснениями молекул воды, расположенных между ними.

На пути, ведущем от образования элементов супервторичной структуры к окончательному сворачиванию цепи в компактную глобулу, имеется промежуточная стадия. На этой стадии молекула белка приобретает пространственную структуру, близкую к структуре нативного белка. Вместе с тем, она ещё не обладает присущей данному белку функциональной активностью. Это состояние, получившее название **«расплавленной глобулы»**, отличается от нативного меньшей степенью упорядоченности структуры.

Стадия превращения «расплавленной глобулы» в нативный белок является самой медленной, ограничивающей скорость всего процесса.

В клетке существует особая категория белков, основной функцией которых является обеспечение фолдинга - правильного сворачивания полипептидных цепей в нативную структуру. Эти белки, связываясь с развёрнутой или частично развёрнутой конформацией полипептидной цепи, не дают ей «запутаться», образовать неправильные структуры. Они удерживают частично развёрнутый белок, способствуют его переносу в разные субклеточные образования, а также создают условия для его эффективного сворачивания. Эти белки получили название **«молекулярные шапероны»** (от франц. *shaperon*-няня) (рис. 43).

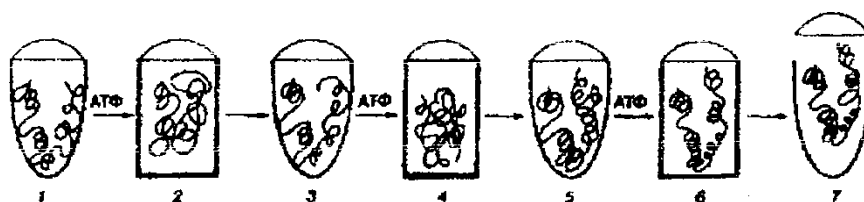


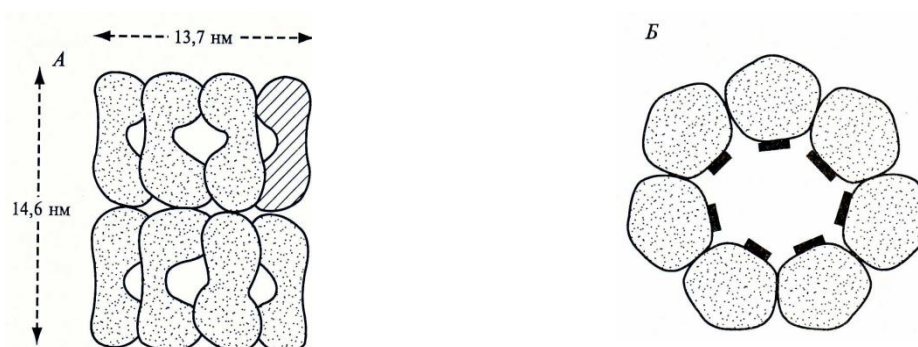
Рис. 43. Модель сворачивания белка с участием шаперонинов

В настоящее время термин «шапероны» применяется в отношении трех различных групп белков: 1) нуклеоплазминов (это ядерные белки, участвующие в сборке нуклеосом); 2) белков, называемых Hsp70 - Bip (группа белков теплового шока- Heat shock proteins); и 3) собственно белков – шаперонов, которые получили название шаперонины. Именно они имеют непосредственное отношение к сворачиванию полипептидной цепи в нативный белок

Первые две группы шаперонов взаимодействуют с синтезируемым белком ещё до схождения полипептидной цепи с рибосомы. Неспецифически связываясь с отдельными участками полипептидной цепи при участии АТФ, они удерживают белок от неспецифической агрегации и передают затем этот белок через внутриклеточные мембраны. Такой транспорт необходим, т.к. многие белки клеточных органелл синтезируются в цитоплазме, а окончательно сворачиваются в месте своей постоянной локализации. Эти шапероны устроены довольно просто и состоят из одной или двух полипептидных цепей.

Шапероны (шаперонины) - это олигомерные белки, построенные из большого числа субъединиц. В центре шаперонина имеется канал, в кото-

ром идет сворачивание полипептидной цепи. Попад в центральный канал молекулы шаперонина, единичная полипептидная цепь оказывается полностью изолированной и может осуществить медленный процесс сворачивания с образованием нативного белка (рис 44).



А – вид сбоку цилиндра, состоящего из двух колец; Б – вид сверху.

Рис. 44. Структура шаперонинового комплекса GroEL Темные прямоугольники - участки связывания полипептида и образование третичной структуры белка.

Четвертичная структура характерна для белков, построенных из нескольких полипептидных цепей. Она поддерживается силами слабых взаимодействий и представляет собой лабильное, менее прочное образование.

Среди белков, выполняющих функции шаперона, представляют интерес, так называемые, **прионовые белки**. Характерной особенностью этих белков является возможность существования их в двух формах:

1. **Нормальная** - когда данный белок участвует в передаче нервных импульсов и поддержании циркадных ритмов, регулируя циклы активности и покоя в клетках.
2. **Патологическая** - когда поступивший извне шаперон – инфекционный прион - направляет сворачивание нормального белка в аномальную конформацию, что влечет за собой изменение важнейших свойств: появляется устойчивость белка к воздействию температуры, действию протеаз и экспоненциальной динамики накопления этих белков.

С указанными белками связывают развитие так называемых конформационных болезней человека, когда, например, в мозговой ткани молодого человека развиваются изменения, сходные с таковыми при старении. Возможно, изучение прионов приведет к развитию новых направлений в биологии старения и умирания организма.

После всех пострансляционных модификаций в зависимости от того на каких рибосомах (свободных или связанных с мембранами ЭР) синтезируется белок, внутриклеточное распределение его происходит либо потоком молекул, либо потоком пузырьков (везикул) (рис. 45).

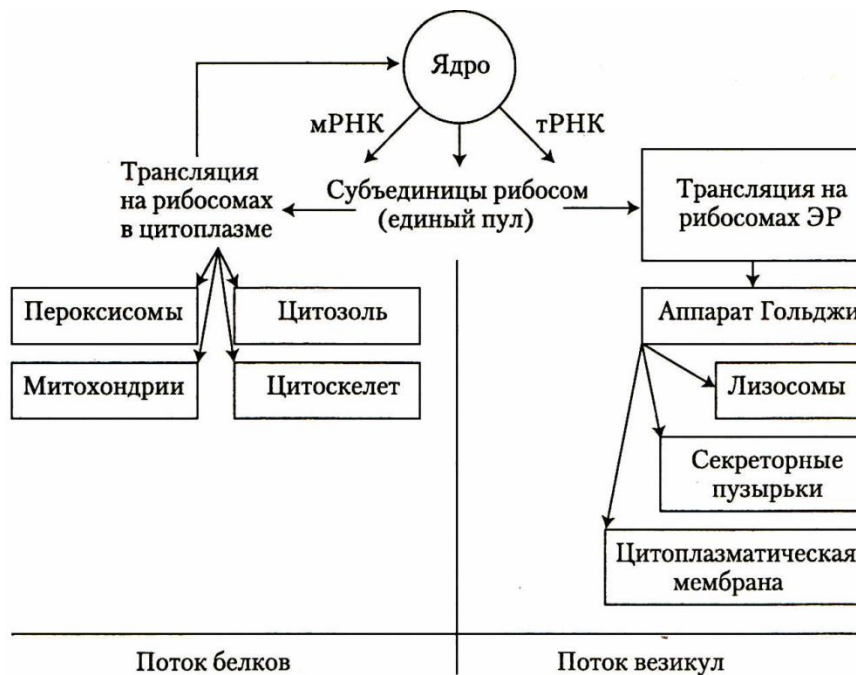


Рис. 45. Схема образования и внутриклеточного распределения вновь синтезируемых белков.

3.5. Регуляция экспрессии генов и прокариот

Реализация генетической информации, заключенной в геноме, – это сложный процесс, который требует тонкой регуляции для того, чтобы в клетках разной тканевой принадлежности в определенное время в процессе онтогенеза обеспечивать синтез специфических белков в необходимом количестве. Все клетки имеют одинаковый набор генетической информации, однако они отличаются друг от друга морфологически, биохимически, функционально. Это происходит потому, что большая часть генома находится в неактивном репрессированном состоянии и только 7 – 10 % генов дерепрессированы, то есть активно транскрибируются. Активность тех или иных генов зависит от тканевой принадлежности клетки, периода ее жизненного цикла, стадии онтогенеза. Основная масса генов, активно функционирующих в большинстве клеток на протяжении всего индивидуального развития – это гены, которые обеспечивают синтез белков общего назначения: белки рибосом, гистоны, тубулины и т. д. Транскрипция этих генов обеспечивается соединением РНК-полимеразы с промотором и не подчиняется другим регулирующим воздействиям. Такие структурные гены называют конститутивными (это тандемные гены «домашнего хозяйства»). Активность другой группы структурных генов (уникальных, кластерных) зависит от огромного количества регуляторных генов и нуклеотидных последовательностей, которые либо стимулируют соединение РНК-полимеразы с промотором, либо запрещают это соединение. При **негативном контроле экспрессии генов со стороны гена – регулятора** это белок – репрессор, который кодируется регуляторным геном и взаимодействует с оператором, расположенном между промотором и структурной частью гена, что не дает возможности РНК – полимеразе соединиться с промотором

и осуществить транскрипцию. Репрессор представляет собой белок, состоящий из 4 субъединиц с общей молекулярной массой около 150 000 Да. В активном состоянии репрессор не связан с индуктором и блокирует ген – оператор, поэтому синтез мРНК не происходит. При поступлении индуктора происходит связывание репрессора, он превращается в неактивную форму и структурные гены начинают синтезировать нужную мРНК. При **позитивном контроле экспрессии генов со стороны гена – регулятора** регуляторный белок присоединяется перед промотором ДНК, это облегчает прохождение РНК- полимеразы и ее соединение с промотором, после чего следует транскрипция. Такие белки называют активаторами (индукторами)

Общую теорию регуляции синтеза белка разработали Ф. Жакоб и Р.Моно. В 1961 году они предложили гипотезу оперона, которая объясняла механизм контроля синтеза белков у прокариот. Сущность этой гипотезы сводится к «включению» и «выключению» генов как функционирующих единиц. Эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение в опытах на бактериях и широкое признание. У бактерий была доказана индукция синтеза ферментов при добавлении в питательную среду субстратов, которые расщепляют эти ферменты.

Согласно теории Жакоба и Моно **оперонами** называют участки ДНК (цистроны), которые содержат информацию о группе функционально связанных структурных белков и регуляторную зону, которая контролирует транскрипцию этих белков (ген – оператор). Структурные гены (кластерные гены) определяют синтез группы белков - ферментов, участвующих в одной цепи биохимических преобразований. Ген – оператор находится в смежной с промотором области. Оперон как единое целое объединяется общим промотором и терминатором и находится под контролем гена-регулятора, контролирующего синтез регуляторного белка. Этот белок-посредник между регуляторным геном и структурными генами Жакобом и Моно был назван **репрессором**. Репрессор имеет сродство к гену-оператору и обратимо соединяется с ним в комплекс, блокируя функцию гена-оператора. Кроме того, репрессор обладает способностью строго специфически связываться с определенными низкомолекулярными веществами – индукторами. Когда такой индуктор соединяется с репрессором, последний теряет способность связываться с геном-оператором, который выходит таким образом из-под контроля гена - регулятора и начинается синтез мРНК.

Особенностью прокариот является транскрибирование мРНК со всех структурных генов оперона в виде одного полицистронного транскрипта, с которого в дальнейшем синтезируются отдельные пептиды.

Механизм такого **негативного контроля со стороны гена – регулятора** был доказан на примере работы лактозного оперона (lac - оперона кишечной палочки - *E. coli*) путем **индукции** работы лактозного оперона. В лактозном опероне закодированы белки - ферменты, участвующие

в расщеплении и усвоении лактозы: бета – галактозидаза (лактаза), пермеаза и белок –А (тиогалактозидтрансацилаза).

Схема индукции лактозного оперона представлена на рисунке 46.

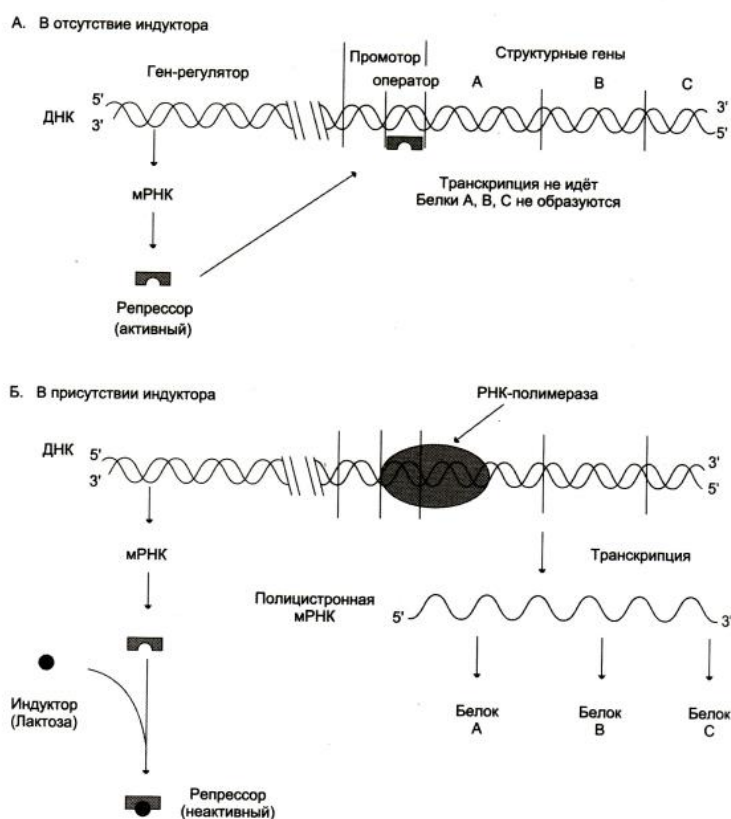


Рис. 46. Механизм индукции лактозного оперона. А. - в отсутствие лактозы (индуктора) белок – репрессор связан с оператором. РНК – полимеразы не может присоединиться к промотору, транскрипция структурных генов оперона не идет; Б. – в присутствии лактозы белок-репрессор присоединяет ее, изменяет свою конфигурацию и теряет сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены.

Клетки *E. coli* обычно растут на среде с добавлением глюкозы. Если в среде культивирования глюкозу заменить на дисахарид лактозу, то в скором времени бактерии адаптируются к изменившимся условиям. Они начинают синтезировать три белка, расщепляющих лактозу. Один из них – бета –галактозидаза- катализирует расщепление лактозы до глюкозы и галактозы. Теория оперона объясняет это явление следующим образом. В отсутствие индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. А поскольку участки промотора и гена-оператора блокируются этим белком – репрессором и РНК-полимераза не может связаться с промотором, то транскрипция структурных генов оперона не идет. Когда в среде появляется индуктор – лактоза, то он присоединяется к белку репрессору, изменяет его конформацию и понижает сродство с геном-оператором. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены.

Регуляцию биосинтеза ферментов по механизму репрессии можно показать на примере гистидинового оперона (рис 47).

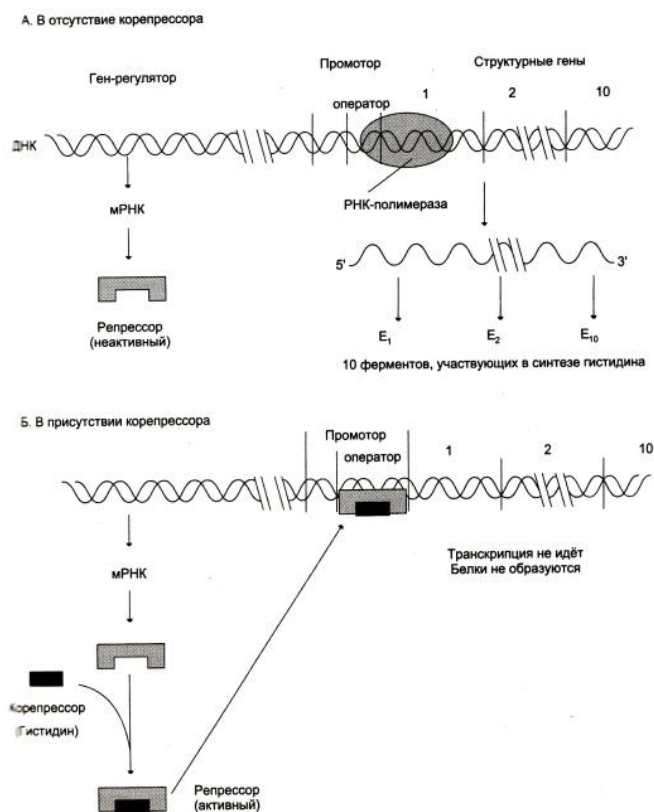


Рис. 47. Регуляция синтеза белка путем репрессии на примере гистидинового оперона.

А- в отсутствии корепрессора (гистидина) белок-репрессор не имеет сродства к оператору, РНК – полимеразе присоединяется к промотору и происходит транскрипция 10 структурных генов, кодирующих строение ферментов, участвующих в синтезе гистидина;

Б- в присутствии гистидина в среде комплекс белка-репрессора с корепрессором препятствует присоединению РНК- полимеразы к промотору и останавливает транскрипцию.

Снижение концентрации ферментов в бактериальной клетке может осуществляться путем репрессии работы оперона. Сущность этого механизма регуляции заключается в следующем: когда клетки *E.coli* растут на среде, содержащей в качестве единственного источника соль аммония, то им приходится синтезировать все азотсодержащие вещества. Такие клетки, в частности, должны содержать все ферменты, необходимые для синтеза 20 аминокислот. Однако, если в среду культивирования добавить одну из аминокислот, например, гистидин, то клетка перестанет вырабатывать весь набор ферментов, необходимых для синтеза этой аминокислоты из аммиака и источника углерода. Репрессия синтеза ферментов, катализирующих последовательность реакций метаболического пути конечным продуктом (гистидином), называется репрессией конечным продуктом. Это явление теория оперона объясняет следующим образом: при отсутствии в среде гистидина регуляторный белок-репрессор не имеет сродства к гену-оператору и происходит синтез ферментов, осуществляющих образование аминокислоты. Когда в среду добавляют гистидин, то эта небольшая молекула, получившая название «корепрессор», присоединяется к белку-репрессору. В результате конформационных изменений в молекуле репрессора комплекс белок-репрессор и кофермент гистидин приобретает

сродство к оператору, присоединяется к нему и транскрипция оперона прекращается, т.е. прекращается считывание информации о строении 10 ферментов, участвующих в синтезе этой аминокислоты. По этому механизму регулируется синтез ферментов, участвующих в процессах анаболизма.

Биологическое значение механизмов регуляций

Следует иметь в виду, что репрессия и индукция синтеза белков у прокариот реализует принципы адаптации к меняющимся условиям существования и клеточной экономии: ферменты появляются в клетках, когда в них существует потребность и перестают вырабатываться, если потребность в них исчезает.

3.6. Особенности регуляция экспрессии генов у эукариот

Регуляция экспрессии генов у эукариот отличается более сложными механизмами взаимодействия. Особенности регуляции можно свести к следующим моментам:

1. У эукариот моноцистронная, а не полицистронная модель гена.
2. Активность каждого гена регулируется большим спектром генов-регуляторов (ТАТА-блок, энхансер, расположенный перед промотором и др. (рис. 48).
3. У эукариот преобладает позитивный клеточный контроль, при котором активация небольшой части генома более экономична, чем репрессия основной массы генов.
4. Регулирующее влияние оказывают гормоны (индукторы транскрипции), через вторичные месенджеры: цАМФ, цГМФ, ионы кальция, фосфатидилинозитол (ФИ), диацилглицеролы (ДАГ), сфинголипиды.
5. Большую роль играет пространственная укладка ДНК в хроматине – комплекс ДНК с гистонами. С деспирализованного активного эухроматина идут процессы транскрипции; если хроматин спирализуется, становится более компактным – процессы транскрипции прекращаются.

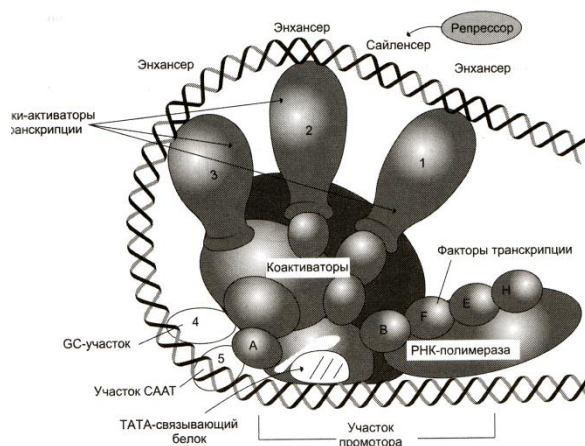


Рис. 48. Адаптивная регуляция транскрипции у эукариот. Промоторы эукариотических генов находятся под контролем большого числа регуляторных участков на молекуле ДНК: ТАТА – СААТ, энхансеров, сайленсоров – последовательностей, к которым присоединяются комплексы белков с различными лигандами (цАМФ, стероидными гормонами, метаболитами, ионами металлов и т.д.)

6. У эукариот значительно больше регуляторных механизмов, которые работают на других, кроме транскрипции, этапах:
- а) в ходе процессинга в одном и том же транскрипционе, участвующем в сплайсинге, вырезаются разные последовательности, что обеспечивает много матриц для разных пептидов;
 - б) при регуляции трансляции на стадии инициации, когда метионин с т-РНК присоединяется к малой субъединице рибосом;
 - в) в ходе реализации пострансляционных процессов.
- Таким образом, эукариоты характеризуются более сложными эволюционно сложившимися взаимосвязями между генами в геноме, зависящими от множества условий.

Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Укажите антикодон тРНК, если триплет кода ДНК АЦТ.
2. Назовите этапы синтеза белков, требующие использования энергии АТФ.
3. Напишите уравнение реакции образования аминоктил-тРНК, укажите тип связи между аминокислотой и тРНК, а также роль тРНК.
4. Укажите субстраты, специфическое взаимодействие с которыми определяет адапторную функцию тРНК.
5. Приведите структурную формулу N-формилметионил-тРНК.
6. Напишите уравнение реакции образования аргиниладенилата. Назовите фермент, катализирующий этот процесс.
7. Напишите уравнения реакций с использованием структурных формул соединений: а) лейцин \rightarrow лейциладенилат; б) лейциладенилат \rightarrow лейцил-тРНК.
8. Напишите уравнение реакции транспептидирования между N-формилметионил-тРНК и аланил-тРНК. Укажите, какие соединения при этом образуются и в каких функциональных центрах рибосомы они локализованы.
9. Назовите компонент рибосомы, обладающий пептидилтрансферазной активностью и укажите источник энергии для образования новой пептидной связи.
10. Циклофосфан, попадая в опухолевые клетки, расщепляется присутствующими там фосфатазами с образованием очень реакционноспособного алкилирующего агента, который взаимодействует с ДНК и повреждает ее структуру. Назовите матричные биосинтезы, которые ингибирует этот препарат в опухолевых клетках.
11. Определите, какая стадия и какого этапа биосинтеза белка ингибируется эритромицином, если известно, что этот антибиотик образует устойчивый комплекс с 50S-субъединицами рибосомы.
12. Укажите, в чем заключается суть реакции активации аминокислот. Назовите фермент, катализирующий эту реакцию.

13. Перечислите свойства генетического кода.
14. Укажите, какие посттрансляционные события происходят при образовании молекулы белка.
15. Дайте понятие термину белок - репрессор. Укажите его роль в регуляции процесса биосинтеза белка.
16. Что представляют собой энхансеры и сайленсоры и какова их роль в регуляции процессов передачи генетической информации?
17. Изобразите в виде схемы процессы репрессии и индукции оперонов.
18. Составьте схему, иллюстрирующую роль белков-репрессоров, ко-репрессоров и индукторов в регуляции транскрипции.

РАЗДЕЛ 4. МУТАЦИИ. ГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Генные болезни – это разнородная по клиническим проявлениям группа заболеваний, обусловленных мутациями на генном, молекулярном уровне. У человека описаны следующие виды генных мутаций: миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания, делеции, вставки, нарушения сплайсинга, увеличение числа тринуклеотидных повторов. Любая мутация может вести к наследственной болезни. Генные мутации являются причиной генных (молекулярных) болезней. В одном и том же гене может быть большое разнообразие видов мутаций, и мы можем говорить о генокопиях, когда разные мутации вызывают одну и ту же генную болезнь. Например, в гене муковисцидоза описано около 200 мутаций разных типов: делеции, миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания, нарушения сплайсинга. Более 30 мутаций известно для гена фенилкетонурии.



Результат генных мутаций

1. Миссенс-мутации – меняется смысл кодонов, что приводит к образованию другого белка:
 - А. лики-тип – образуется менее активный белок или его меньшее количество;

- В. условный тип – образуется белок, который при определенных условиях становится более активным (например, при приеме барбитуратов);
- С. комплементационный тип – характерно для сложных белков, состоящих из нескольких цепей. Если в одной цепи одна мутация, а в другой – другая, при их взаимодействии образуется нормальный белок.
2. Нонсенс-мутации – приводят к образованию бессмысленных кодонов. Белок совсем не образуется. Если это белок-репрессор, то он не подойдет к оператору, не остановит транскрипцию, что приведет к повышенному содержанию белков, которые закодированы в транскриптоне (опероне). Если это белок-индуктор – то при его отсутствии оператор остается заблокированным и синтеза белка не происходит.
3. Сеймсенс – мутации. При этом образующийся измененный триплет, согласно вырожденности (избыточности) генетического кода, тем не менее, кодирует ту же аминокислоту и поэтому не приводит к изменению белка.

Мутации — передаются по наследству, либо спонтанно возникают вновь.

Мутации – события в реальной жизни организма весьма редкие. Для клетки человека такая вероятность порядка 10^5 на все молекулы ДНК. К настоящему времени у человека найдены мутации примерно в 2500 различных генах: многие из них либо ухудшают те или иные функции, либо приводят в конечном счёте к летальному исходу.

Вероятность появления мутаций сильно возрастает под действием **мутагенов**, к которым относятся вещества, способные изменять структуру оснований. Среди мутагенов выделяют природные факторы (пероксидсоединения, свободные радикалы) и чужеродные - химические вещества (ксенобиотики), а так же физические (излучения) и биологические факторы (вирусы).

Таблица 4.

Виды мутагенов

| Виды мутагенов | Примеры |
|----------------|---|
| Химические | Формалин, цитостатики, спирты, фенолы, циклические ароматические соединения, иприт. |
| Физические | Радиация, температура, излучение |
| Биологические | Вируса, токсины, мобильные элементы генома. |

4.1. Генные болезни.

Генные болезни – это разнородная по клиническим проявлениям группа болезней, обусловленных мутациями на генном уровне. Первичные эффекты мутантных аллелей могут проявиться в 4 вариантах: отсутствие синтеза полипептидной цепи (белка); синтез аномальной по первичной структуре полипептидной цепи (белка); количественно недостаточный синтез белка; количественно избыточный синтез белка. На основе первич-

ного эффекта мутантного аллеля уже разворачивается патогенез генной болезни, которая проявляется в разнообразных фенотипических эффектах или клинической картине.

Если в результате мутации будет вырабатываться избыточное количество продукта, то патогенез болезни в целом будет обусловлен усиленной генной активностью. Такой конкретной формы наследственной болезни пока не обнаружено.

При другом варианте патологического эффекта мутантного гена синтезируется аномальный белок. За этим следуют нарушения той системы (клетки, органа), функции которой обеспечиваются нормальным белком. Примером такого варианта болезни является серповидно – клеточная анемия. В результате замены в кодоне ГУА урацила на аденин синтезируется цепь молекулы гемоглобина с валином в 6 положении бета – цепи, вместо глутаминовой кислоты. Этого достаточно, чтобы изменить функциональные свойства гемоглобина. Такой гемоглобин уже не может выполнять кислородацепторную функцию и кристаллизуется, а эритроциты принимают форму серпа (рис 49).

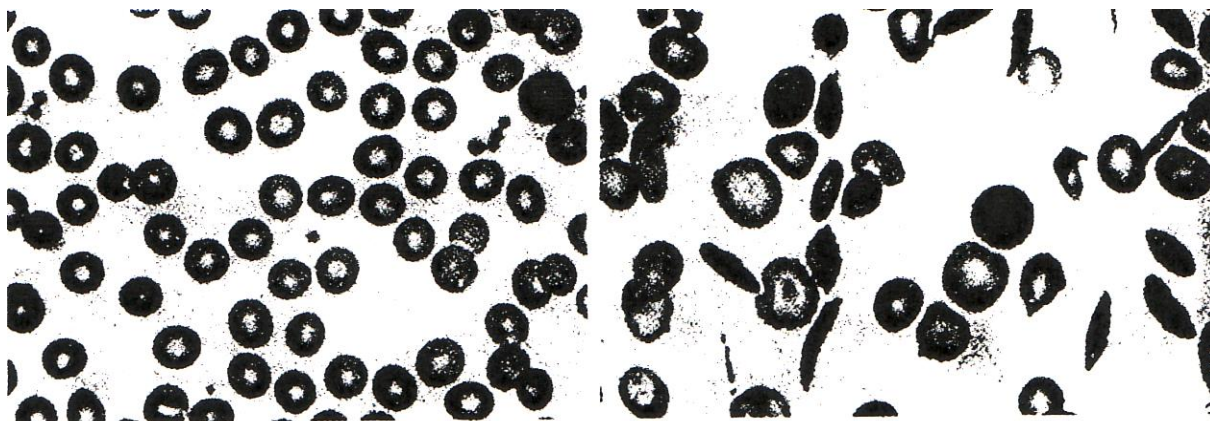


Рис 49. Мазок крови больного серповидно-клеточной анемией (справа) по сравнению с нормой (слева)

Третий вариант эффекта мутантного аллеля - отсутствие выработки первичного продукта (белка). Это встречается наиболее часто. Нарушается процесс всего комплекса нормального биохимического гомеостаза. Накапливаются токсические продукты – предшественники. Формируется соответствующая клиническая картина. Отсутствие выработки первичного продукта ведет к развитию огромной группы заболеваний, которые объединяется общим понятием «**ферментопатии**».

На рисунке 50 показаны последствия наследственных нарушений обмена аминокислот фенилаланина (фенилкетонурия, ФКУ, злокачественная ФКУ), тирозина (альбинизм) и гомогентизиновой кислоты (алкаптонурия).

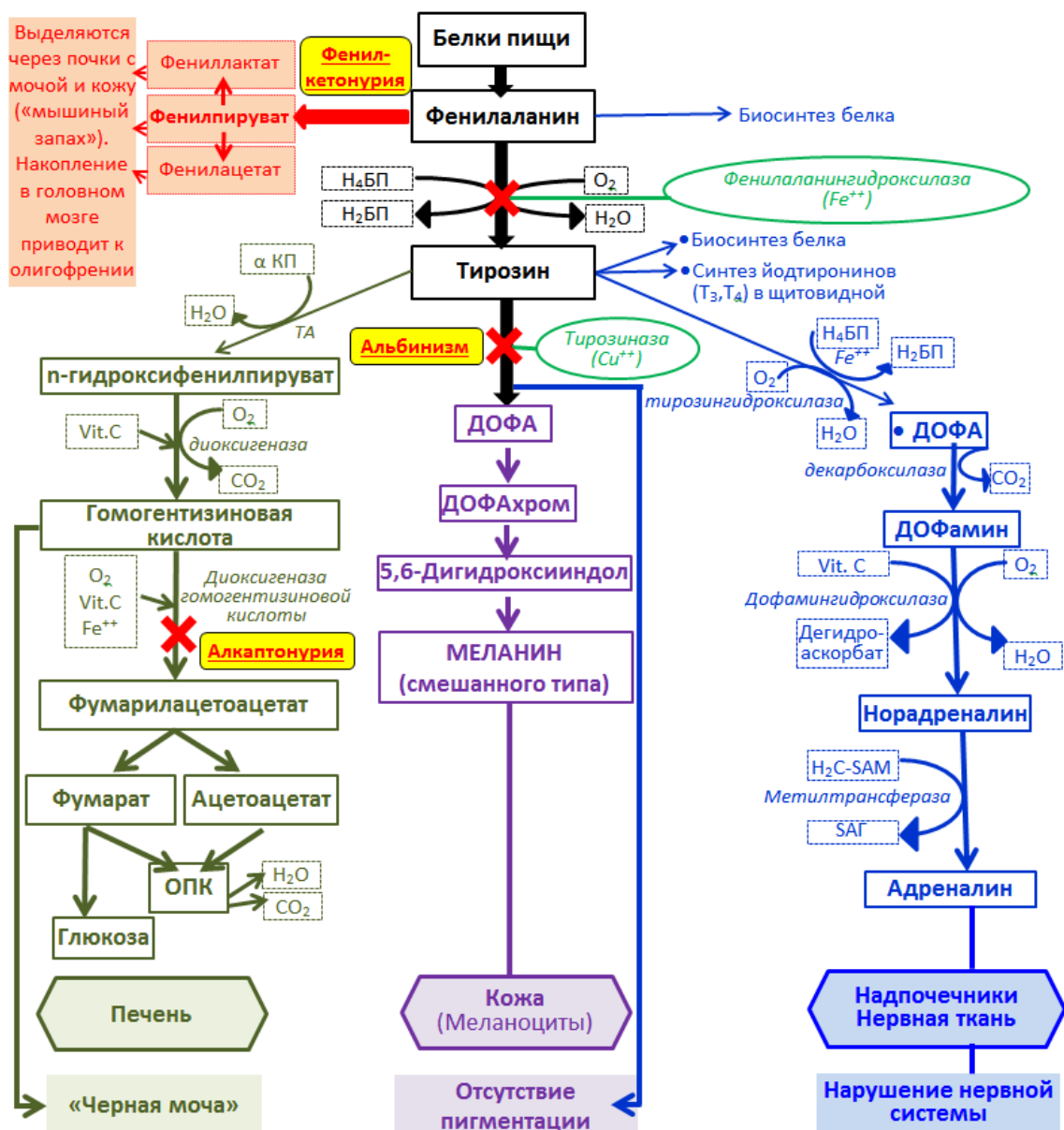


Рис 50. Нарушения метаболизма фенилаланина и тирозина

- Классическая ФКУ – аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, связанное с мутациями в гене фенилаланингидроксилазы (12q22-q24.1.). Наиболее тяжелые изменения связаны с нарушением умственного и физического развития, судорожным синдромом. Половина больных умирает до 20 лет. Частота 1:10000 новорожденных. Своевременная диагностика (неонатальный скрининг) и лечение (диетотерапия - перевод детей на искусственные смеси с низким содержанием фенилаланина) дают положительные результаты.
- Вариантная (биоптеринзависимая гиперфенилаланинемия) является следствием мутаций в генах, контролирующих метаболизм тетрагидробиоптерина (рис. 51).

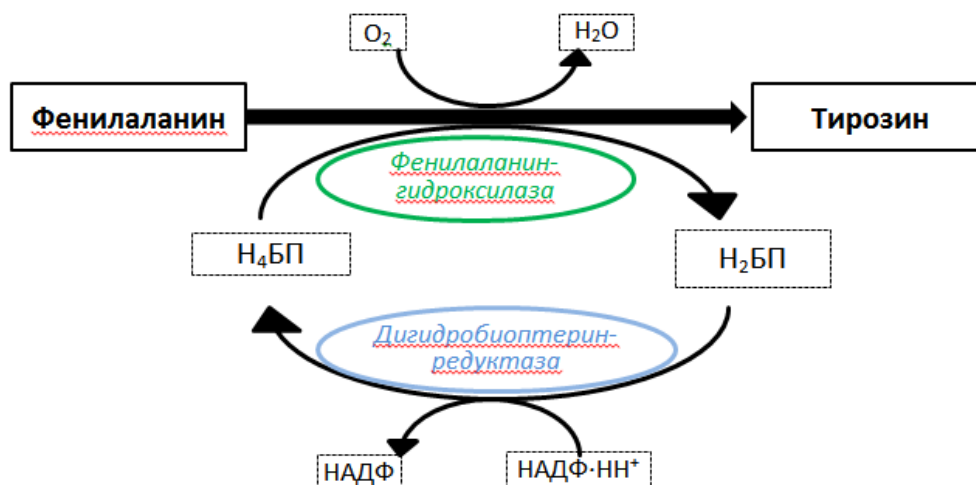


Рис 51. Схема метаболизма тетрагидробиоптерина

Клинические проявления биоптеринзависимой гиперфенилаланинемии близкие, но не совпадающие с классической ФКУ.

Тяжелые проявления ФКУ связаны с токсическим действием на клетки мозга высоких концентраций фенилаланина, фенилпирувата, фениллактата. Большие концентрации фенилаланина ограничивают транспорт *тирозина* и *триптофана* через гематоэнцефалический барьер и тормозят синтез нейромедиаторов. Заболевание характеризуется тяжелыми неврологическими нарушениями и ранней смертью.

Алкаптонурия ("черная моча ") ферментопатия отсутствие фермента *диоксигеназы гомогентизиновой кислоты*. Для этого заболевания характерно выделение с мочой гомогентизиновой кислоты, которая, окисляясь на воздухе кислородом, образует черные пигменты - алкаптоны. Алкаптоны способны откладываться в хрящевой ткани и суставах, что вызывает артриты и охроноз (черные пятна). Заболевание не является опасным для жизни и поэтому не требует специального лечения.

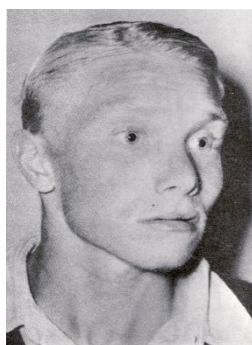


Фото 1. Больной с фенилкетонурией

Наследственный дефект *тирозины* - фермента, катализирующего в меланоцитах превращение *тирозина* в ДОФА, вызывает нарушение синтеза темных пигментов меланинов, которые приводят к альбинизму. Частота 1:20000, тип наследования аутосомно-рецессивный. Основным клиническим проявлением альбинизма (*от лат. albus - белый*) являются отсутствие

пигментации кожи и волос, радужки глаз. У больных часто снижается острота зрения и появляется светобоязнь (фотофобия). Длительная инсоляция таких больных приводит к ожогам и раку кожи.

Достаточно часто встречается галактоземия, механизм которой представлен ниже. Отсутствие галактокиназы, гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы или эпимеразы печени нарушает метаболизм галактозы. Галактоза образуется в кишечнике в результате гидролиза лактозы, которая поступает с молочными продуктами. Затем в результате реакции эпимеризации галактоза превращается в глюкозу (рис. 52).

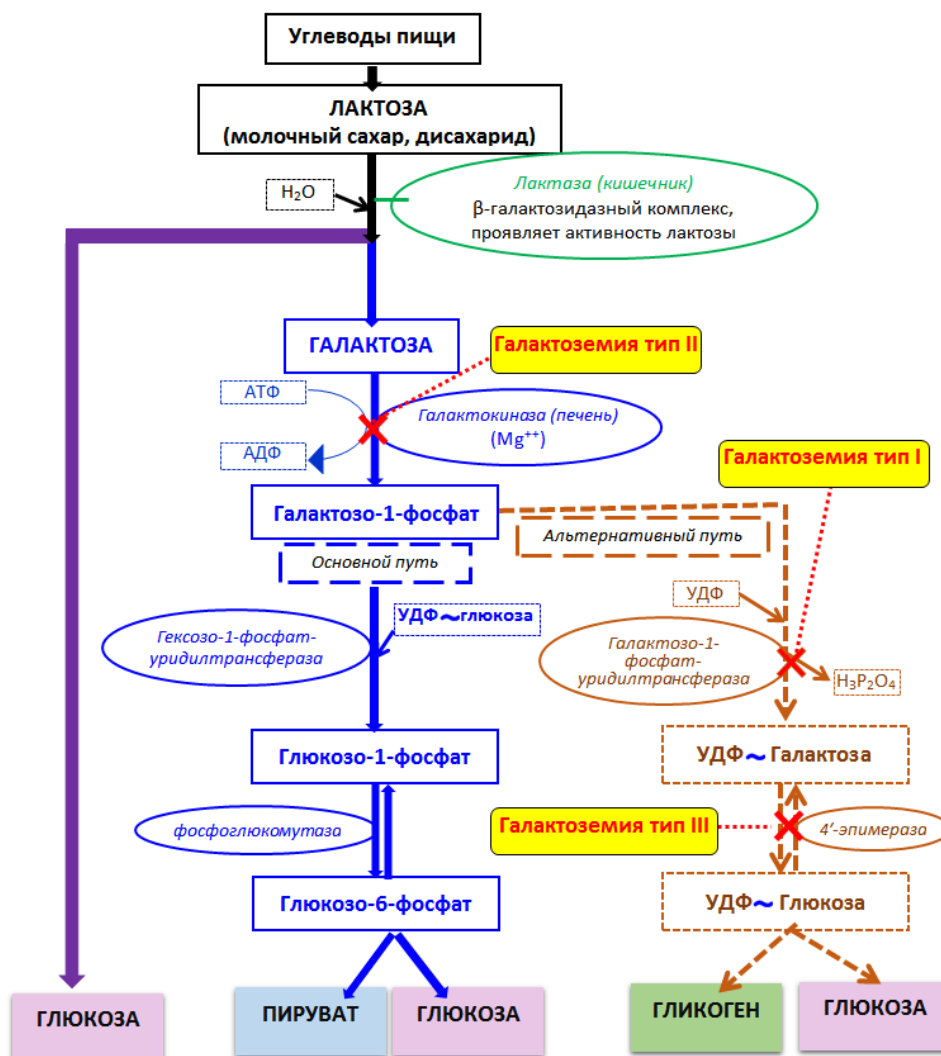


Рис. 52. Метаболизм галактозы.

Галактоземия может быть обусловлена наследственным дефектом любого из трех ферментов.

В результате отсутствия первичного продукта гена может задерживаться какой-либо важный процесс, постоянно осуществляющийся в организме. Так, мутации генов, детерминирующих синтез ферментов репарации ДНК, приводят к невозможности восстановления постоянно возникающих нарушений в структуре ДНК, что обуславливает развитие злока-

чественных новообразований (пигментная ксеродерма, атаксия-телеангиоэктазия).

Известен и четвёртый вариант первичного патологического эффекта мутантного аллеля — выработка, уменьшенного количества нормального первичного продукта (β -талассемия, акаталазия). Патогенез таких заболеваний отличается большой вариабельностью, поскольку наряду с нормальным путём обмена веществ будут протекать и патологические процессы.

Выше были описаны общие закономерности патогенеза генных болезней на молекулярном уровне на примерах нарушения обмена веществ. Тот же самый принцип патогенеза (мутантный аллель \rightarrow патологический первичный продукт) действует и для генов морфогенетического контроля, мутации в которых приводят к врождённым порокам развития: полидактилия, синдромы Холт—Орама, Крузона (фото2), Элерса –Данло (фото 3), Нунана, Лоренса—Муна, Меккеля (фото 4), миотония (фото 5). Начальное звено врождённого порока развития связано с нарушением дифференцировки клеток. Запрограммированная в геноме дифференцировка клеток, а затем и органогенез осуществляются путём смены процессов активации и выключения определённых генов в строго ограниченных временных (по отношению к онтогенезу) промежутках. Если первичный продукт морфогенетического гена аномальный, то необходимая для дальнейшего правильного развития органа дифференцировка клеток не последует. Естественно, что морфогенетических генов много, действуют они в разные периоды онтогенеза. Соответственно мутации в них будут приводить к специфическим врождённым порокам развития.



Фото2. Синдром Крузона у матери и ребенка

Фото 3. Синдром Элерса -Данло

Фото 4. Синдром Меккеля

фото 5. Миотония у матери и ребенка

Патогенетическая классификация генных болезней подразделяет их на 3 группы в зависимости от того, на что направлено основное патогенетическое звено. Патогенез болезни может привести к нарушенному обмену веществ, аномалиям морфогенеза или комбинации того и другого. В соответствии с этим различают наследственные болезни обмена веществ, врождённые пороки развития (моногенной природы) и комбинированные состояния. Наследственные болезни обмена веществ, в свою очередь, подразделяют по типам обмена (углеводный, аминокислотный, обмен витаминов, липидов, металлов и др.).

Начало патогенеза любой генной болезни и его «ключевая точка» связаны с первичным эффектом мутантного аллеля, поэтому принципиальные звенья патогенеза генных болезней можно представить следующим образом: мутантный аллель → патологический первичный продукт (качественно или количественно), цепь последующих биохимических процессов → клетки → органы → организм. **Это и есть главная общая закономерность патогенеза генных болезней при всём их многообразии.**

Клеточный уровень патогенеза

Патогенез генных болезней не заканчивается на молекулярном уровне даже в первичных звеньях. Для многих болезней главное звено патогенеза — **клетка**. При этом речь идёт не только о биологической аксиоме, что во всех генетических процессах клетка — дискретная самостоятельно регулируемая единица и в ней осуществляются все процессы реализации генетической информации (транскрипция, трансляция, синтез белка). Клеточный уровень патогенеза генных болезней означает, что в определённых типах клеток разыгрываются основные патологические процессы, характерные для конкретной нозологической формы. Клетка как бы не выпускает из себя патологические явления, а принимает на себя удар первичного патологического эффекта гена. Точкой приложения первичного действия мутантного гена являются отдельные структуры клетки, разные при различных болезнях (лизосомы, пероксисомы, мембраны, митохондрии).

Патогенетические процессы на клеточном уровне развёртываются при болезнях накопления. Это могут быть лизосомальные болезни при которых нарушается **активность лизосомных ферментов**. Примером являются **мукополисахаридозы**. В этом случае в клетках и межклеточном веществе накапливаются гликозаминогликаны (мукополисахариды). Причина избыточного содержания полимеров — гликозаминогликанов — отсутствие их гидролиза в лизосомах в результате наследственного дефекта синтеза лизосомальных гидролаз.

Другим примером болезней накопления могут служить **гликогенозы**. В клетках печени и мышц накапливаются полимеры гликогена, которые не подвергаются деградации даже тогда, когда организму необходима глюкоза в крови. Принципиально патогенез гликогенозов такой же, как и мукополисахаридозов. В клетках печени и мышц отсутствуют определённые ферменты, которые участвует в цикле расщепления гликогена.

Другие внутриклеточные структуры — **пероксисомы** — также могут являться точкой приложения первичного действия мутантного гена. В этих случаях развиваются так называемые **пероксисомные болезни**. Описано уже 18 нозологических форм. Основное патологическое звено при всех пероксисомных болезнях локализовано в пероксисомах в виде биохимических нарушений, обусловленных генными мутациями. Биохимическая сущность многих пероксисомных болезней уже раскрыта на уровне мутантных ферментов. Клинически болезни проявляются в виде множественных врождённых пороков развития, в целом сходных при разных нозологических формах (множественные черепно-лицевые дизморфии, катаракта, кожные складки на шее, почечные кисты и др.).

Мембраны как структуры клеток также могут быть ключевыми элементами патогенеза генных болезней. Так, отсутствие специфических белковых молекул-рецепторов на клеточной поверхности, связывающих липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), приводит к семейной гиперхолестеринемии. Синдром полной нечувствительности к андрогенам (синоним: синдром тестикулярной феминизации или синдром Мориса) вызывается мутациями в X-сцепленном гене, который кодирует синтез внутриклеточного рецептора андрогенов. Отсутствие чувствительности клеток к андрогенам приводит к развитию женского фенотипа при хромосомном наборе XY. У таких больных, несмотря на женский тип наружных половых органов, имеются семенники в брюшной полости и нормальный уровень андрогенов в крови.

Клиника **витамин D-резистентного рахита** (сцепленное с X-хромосомой доминантное заболевание) обусловлена дефектом рецепторов 1,25-дигидроксихолекальциферола.

При **муковисцидозе** нарушается регуляция транспорта хлоридов через мембраны эпителиальных клеток. Такая регуляция в норме осуществляется белком-продуктом гена, названным кистофиброзным трансмембранным регулятором. Одни мутации в гене *KФТР* ведут к снижению синтеза данного белка из-за незавершенности процессинга РНК, другие — к качественным изменениям мембранных СГ~-каналов. Одна только первичная биохимическая аномалия (нарушение транспорта хлоридов) обуславливает возникновение мультиорганный патологического процесса (прогрессирующее поражение дыхательных путей, хронические синуситы, недостаточность экзокринной секреторной функции поджелудочной железы, стерильность у мужчин).

Клеточный уровень патогенеза генных болезней может проявляться не только в конкретных органеллах, но и в виде **нарушения скоординированности функций клетки**. Так, мутации, затрагивающие области онкогенов, ведут к снятию контроля размножения клеток (репрессия антионкогенов) и соответственно к злокачественному росту (наследственные формы рака толстой кишки, ретинобластома).

Клетка может быть главным звеном при реализации патогенеза на молекулярном уровне. Так, прекращение синтеза мышечного белка дистро-

фина при мутациях в соответствующем гене приводит к постепенной дегенерации мышечных клеток. Это спусковой крючок патогенеза тяжёлой наследственной болезни — миопатии Дюшенна (сцепленный с X-хромосомой рецессивный тип наследования).

Органный уровень патогенеза

Органный уровень патогенеза наследственных болезней, безусловно, «производный» от молекулярного и клеточного. При разных болезнях мишенью патологического процесса служат различные органы, иногда в результате первичных процессов, иногда — вторичных. Например, отложение меди в печени и экстрапирамидной системе мозга при гепатолентикулярной дегенерации (болезнь Вильсона—Коновалова) — первичный процесс, а гемосидероз паренхиматозных органов при первичном гемохроматозе или талассемии развивается вторично вследствие усиленного распада эритроцитов. При алкаптонурии отложение гомогентизиновой кислоты в хрящах суставных поверхностей и клапанах сердца — вторичный процесс, обусловленный высокой концентрацией гомогентизиновой кислоты в крови (она не превращается в малеилацетоуксусную кислоту в результате наследственно обусловленного отсутствия гомогентизиноксидазы. Это ведёт (примерно к 40 годам) к медленному развитию пороков сердца и неподвижности суставов.

Организменный уровень

В организме человека поражение на молекулярном и клеточном уровне проявляется в сочетании с поражением на органном уровне. Патологический процесс, запущенный первичным эффектом мутантного аллеля, приобретает целостность с закономерными межиндивидуальными вариациями. Тяжесть и скорость развития болезни при прочих равных условиях (пол ребёнка, одинаковый характер мутации) зависят от генотипа организма (соматический мозаицизм, гены-модификаторы) и условий среды.

Патогенез любой наследственной болезни у разных индивидов, хотя и сходен по первичным механизмам и этапам, формируется строго индивидуально. И реализация мутаций может происходить на любом этапе онтогенеза. Большая часть проявляется внутриутробно (25%) и в допубертатном периоде (45%). Ещё 20% в пубертатном и юношеском периоде, а 10 % моногенных болезней проявляется в возрасте старше 20 лет.

Характеристика клинической картины генных болезней

Клиническая характеристика генных болезней тесно связана с принципами экспрессии, репрессии и взаимодействия генов. Поэтому в полном объёме у разных больных общие черты клинической картины при одном и том же заболевании наблюдать трудно. Однако знание общих признаков генных болезней поможет врачу заподозрить наследственную болезнь даже в спорадическом случае.

Ниже приведены **3 главные характеристики генных болезней** и их биологические основы: особенности клинической картины, клинический полиморфизм, генетическая гетерогенность.

Особенности клинической картины

К особенностям клинической картины генных болезней относятся: многообразие проявлений, варьирующий возраст начала болезни, прогрессиентность (развитие с нарастанием) клинической картины, хроническое течение, тяжесть течения, обуславливающая инвалидность с детства и сокращённую продолжительность жизни.

Симптоматика каждой генной болезни очень многообразна. Как правило, патологическим процессом затрагивается не одна система или орган, а несколько органов уже на первичных этапах формирования болезни. Это касается болезней, проявляющихся в нарушении процессов эмбрионального развития (врождённые пороки развития), наследственных болезней обмена веществ и комбинированных болезней. Биологической основой **многообразных проявлений генных болезней** служит генный контроль первичных механизмов обмена или морфогенетических процессов.

Для некоторых групп болезней вовлечение в патологический процесс многих органов и тканей обусловлено тем, что первичный дефект локализован в клеточных или межклеточных структурах многих органов. Например, при наследственных болезнях соединительной ткани нарушен синтез специфического для каждой болезни белка той или иной волокнистой структуры. Поскольку соединительная ткань есть во всех органах и тканях, то и многообразие клинической симптоматики при этих болезнях — следствие аномалии соединительной ткани. Например, при синдроме Марфана в патологический процесс вовлечены мышечно-скелетная система, сердечно-сосудистая система, наружные покровы, лёгкие, ЦНС, глаза; при синдроме Элерса—Данло — кожа, суставы, глаза, сердце, сосуды, грудная клетка, мозг, зубы.

Наряду с понятными механизмами возникновения многообразия проявлений генных болезней имеются примеры необычайно широкого клинического проявления болезни с пока неизвестными механизмами. Нейрофиброматоз 1-го типа проявляется пигментными пятнами, кожными, подкожными и плексиформными нейрофибромами, костными изменениями, опухолями нервных стволов и головного мозга, снижением способности к обучению. Эти многообразные проявления пока не удаётся связать в единый патогенетический комплекс, несмотря на то, что уже известны структура гена и его первичный продукт. Не исключается, что в этом и других подобных случаях речь идёт о первичной плейотропии, т.е. множественных эффектах действия гена в разных органах.

Другая черта клинической картины генных болезней, помимо многообразия проявлений, — **варьирующий возраст начала** болезней. Для этой группы в целом возраст начала практически не лимитирован: от ранних стадий эмбрионального развития (врождённые пороки развития) до пожилого возраста (хорея Гентингтона, болезнь Альцгеймера). Варьирующий возраст дебюта отмечается при многих генных заболеваниях. Например, хорея Гентингтона (аутосомно-доминантное заболевание) может начинаться в любом возрасте от детского (описаны случаи начала заболе-

вания в 6-летнем возрасте) и до 60-летнего; средний возраст начала заболевания составляет 38 лет. Клиническая картина миотонической дистрофии (аутосомно-доминантное заболевание) может возникать внутриутробно (врождённая форма), в юношеском возрасте (ювенильная), у взрослых (классическая) или развиваться в виде мягкой формы с поздним началом.

Возраст начала заболевания варьирует и при рецессивных болезнях. Муковисцидоз может развиваться внутриутробно (мекониевый илеус), в грудном возрасте, а у некоторых — после 3—7 лет.

Биологическая основа варьирующего возраста начала в целом для группы генных болезней заключается в строго временных закономерностях онтогенетической регуляции экспрессии генов. Функционирование каждого гена в норме начинается и заканчивается в строго определённое в отношении онтогенеза время и в строго определённых клетках. Это правило относится и к мутантному гену.

Причинами разного возраста начала одной и той же болезни могут быть индивидуальные характеристики генома больного. Действие других генов на проявление эффекта мутантного гена (взаимодействие генов) может менять время развития болезни. Какие-то комбинации генов будут способствовать более раннему проявлению действия патологических генов, какие-то — тормозить его. Небезразличны для времени проявления патологических генов и условия среды в онтогенезе индивида, особенно во внутриутробном периоде. Вместе с тем молекулярно-биологические исследования уже позволяют конкретизировать биологические основы разного возраста клинических проявлений отдельных форм генных болезней. Так, установлено, что сроки развития хореи Гентингтона могут быть связаны с импринтингом соответствующего гена у отца (унаследовавшие ген от отцов заболевают раньше), а при миотонической дистрофии — с числом тринуклеотидных повторов в гене у женщин (чем больше повторов, тем раньше развивается болезнь и тем тяжелее она протекает).

Для генных болезней характерны **прогредиентность клинической картины**, а также хроническое затяжное течение болезни с рецидивами.

При многих болезнях клиническая картина и тяжесть течения «усиливаются» по мере развития патологического процесса. Приведём несколько примеров.

Нейрофиброматоз 1-го типа начинается с возникновения безобидных пигментных пятен цвета «кофе с молоком», веснушек в подмышечных и паховых областях, далее появляются единичные нейрофибромы, затем опухоли или костные изменения и т.д. При фенилкетонурии прогрессируют умственная отсталость, гипомеланоз кожи и волос. Нарушение свёртываемости крови при гемофилии с возрастом не ослабевает, а усиливается. При ганглиозидозе G с 6-месячного возраста начинает развиваться демиелинизация нервных волокон, она продолжается вплоть до летального исхода в возрасте 2—4 лет. Затяжное или хроническое течение характерно для многих генных болезней (муковисцидоз, болезнь Рандю—Ослера—Уэбера, гепатолентикулярная дегенерация и др.).

Естественно, что прогрессивность присуща не всем болезням. При развитии некоторых болезней достигается конечный фенотип к определённому возрасту. Например, ахондроплазия полностью формируется по мере роста костей (нарушен хондрогенез) пропорционально возрасту. Темп развития болезни как бы запрограммирован без прогрессивности.

Ещё одна характерная черта большинства генных болезней — **тяжесть их течения**, что приводит к инвалидизации в детском возрасте и сокращению продолжительности жизни. Тяжесть течения болезни не всегда связана с ранним проявлением заболевания. Такие тяжёлые формы, как хорея Гентингтона, гепатолентикулярная дегенерация, миотоническая дистрофия, первичная кардиомиопатия, развиваются у взрослых.

4.2. Клинический полиморфизм

Суть одной из основных и наиболее старых аксиом клинической медицины сводится к тому, что болезнь любой этиологии (инфекционной, травматической, алиментарной, гормональной и др.) проявляется неодинаково у разных индивидов, поэтому было сформулировано правило: лечить не болезнь, а больного. Симптоматика наследственных болезней широко варьирует. При накоплении наблюдений одних и тех же нозологических форм оказалось, что клинический полиморфизм генных болезней выражен не меньше, чем ненаследственных болезней. В ряде случаев клиническая картина одного и того же генного заболевания варьирует от стёртых форм до тяжелейших клинических проявлений.

Клинический полиморфизм генных болезней проявляется в разных сроках начала заболевания, полноте и тяжести симптоматики (глубина патологического процесса), продолжительности болезни, инвалидности, толерантности к терапии, сокращении продолжительности жизни. Вместе с тем следует подчеркнуть, что для генных болезней не бывает плавных переходов от нормы к патологии. Даже самая лёгкая форма болезни отличается от нормы минимальными диагностическими критериями. Речь идёт о генетическом правиле: нормальный генотип детерминирует нормальный фенотип, а мутантный генотип детерминирует мутантный фенотип (болезнь).

Впервые явление клинического полиморфизма наследственных болезней начал глубоко анализировать ещё в 20—30-х годах выдающийся генетик и невропатолог С.Н. Давиденков. На примере изучения наследственных болезней нервной системы он показал роль окружающей среды, характера мутации и генотипа в целом (генотипическая среда для мутировавшего гена) в причинах клинического полиморфизма. Изучение причин клинического полиморфизма позволило С.Н. Давиденкову разрабатывать методы лечения болезни и профилактики осложнений, открывать новые нозологические формы.

К настоящему времени накопился огромный фактический материал по феноменологии клинического полиморфизма отдельных форм и факторам, его определяющим. В первую очередь следует рассматривать значение ха-

рактера мутации в конкретном локусе для проявления болезни или формирования фенотипа (мутантного). Первично возникшие и унаследованные от предыдущих поколений мутации имеют достаточно сходное фенотипическое проявление, т.е. длительность унаследования мутации не отражается на клиническом полиморфизме генных болезней. Как подчёркивалось выше, десятки и даже сотни разных мутаций (и даже разных типов) в одном и том же локусе ведут к одной и той же болезни. В большинстве случаев характер мутации не определяет клиническую картину болезни. Определяет её первичный эффект гена (нет продукта или мало продукта).

Мутации в одном и том же локусе, ответственные за синтез дистрофина, приводят к двум клиническим формам: миопатии Дюшенна (тяжёлая) и миопатии Беккера (лёгкая). Установлено, что миопатия Дюшенна развивается при полной блокаде синтеза РНК для дистрофина, а Беккера — при частичной блокаде. При миопатии Беккера - делеция гена по размеру меньше.

Сплайсинговые мутации, как правило, не полностью блокируют образование матричной РНК, и поэтому соответствующие формы болезни бывают «мягкими» по клинической картине и течению.

Чёткая корреляция между генотипом (характером мутации) и фенотипом (клиническая картина болезни) отмечена пока лишь при одном виде мутаций — амплификации тринуклеотидных повторов в гене. Следует отметить, что чем больше повторов в мутантном аллеле, тем тяжелее протекает болезнь. Особенно чётко это проявляется при умственной отсталости с ломкой X-хромосомой и миотонической дистрофии. Поскольку экспансия повторов формируется в мейозе у одного из родителей (разных при различных болезнях), это обуславливает явление **антиципации** — более тяжёлое течение наследственной болезни в последующих поколениях.

Клиническая картина болезни может зависеть от дозы генов (числа аллелей). Так, гомозиготность (2 аллеля) по аутосомно-доминантным болезням определяет более тяжёлую клиническую картину, а иногда даже и внутриутробную гибель плода (ахондроплазия, синдром Элерса—Данло 1-го типа). Аутосомно-рецессивные болезни проявляются в полной мере при условии гомозиготного состояния (2 аллеля) по мутантному аллелю. Однако некоторые признаки заболевания могут проявляться и у гетерозигот (1 аллель, лёгкая форма), они усиливаются до клинической картины болезни при действии провоцирующих факторов. Например, симптомы кислородной недостаточности (при подъёмах на большую высоту) проявляются у гетерозигот по серповидно-клеточной болезни; беременность у гетерозигот по р-талассемии приводит к развитию анемии.

Генетические причины клинического полиморфизма могут быть обусловлены не только патологическим геном, но и генотипом в целом, т.е. генотипической средой в виде генов-модификаторов. Геном в целом функционирует, как хорошо скоординированная система. Вместе с патологическим геном индивид наследует от родителей комбинации других генов, которые могут усиливать или ослаблять действие патологического гена. В

правильности этого положения не приходится сомневаться, хотя реально гены-модификаторы ещё только начинают идентифицировать. Сравнение спектра выраженности клинической картины у индивидов одной семьи и разных семей показывает, что межсемейные различия больше, чем внутри-семейные, но последние тоже существуют.

Одним из факторов вариабельности фенотипа или разной экспрессивности может быть соматический мозаицизм.

В развитии генной болезни, как и любого наследственного признака человека, имеет значение не только генотип, но и внешняя среда. Этому положению есть много доказательств из клинической практики и специальных исследований.

Например, симптоматика фенилкетонурии у ребёнка более тяжёлая, если во время его внутриутробного развития в рационе матери было много продуктов, богатых фенилаланином. Обострение наследственных миодистрофий наблюдается после стрессов, охлаждений, переутомления. Клиническая картина гемофилии у ребёнка усиливается с увеличением у него кровоизлияний от падений и травм. У женщин, больных нейрофиброматозом 1-го типа, резко усиливается рост нейрофибром при беременности.

Генетическая гетерогенность

Понятие генетической гетерогенности означает, что клиническая форма генной болезни может быть обусловлена мутациями в разных локусах (генокопии) или разными мутациями в одном локусе (множественные аллели). Фактически в этих случаях речь идёт о разных нозологических формах, с этиологической точки зрения объединённых в одну форму в связи с клиническим сходством фенотипа.

Генетическую гетерогенность наследственных болезней впервые подметил (и ввёл этот термин) С.Н. Давиденков в 30-х годах. Явление генетической гетерогенности носит общий характер, его можно назвать уже правилом, поскольку оно распространяется на все белки организма, включая не только патологические, но и нормальные варианты. С молекулярно-генетической и биохимически-генетической точек зрения вполне объясним тот факт, что различные патологические гены могут иметь примерно одинаковый фенотип при клинической оценке. Конечный эффект поломки какого-либо процесса на клиническом уровне может быть обусловлен наследственным нарушением синтеза разных белков или разных вариантов одного и того же белка.

Генетическая гетерогенность, обусловленная мутациями в разных локусах — межлокусная гетерогенность, — демонстративно видна на примере синдрома Элерса-Данло (11 форм), нейрофиброматоза (по меньшей мере 6 форм), гликогенозов (более 10 форм), витамин D-резистентного рахита и т.д. Гетерогенность в упомянутых формах прослеживается даже при использовании клинико-генеалогического метода. В этих группах имеются и аутосомно-доминантные, и аутосомно-рецессивные, и сцепленные с X-

хромосомой варианты болезней, т.е. речь идёт о мутациях в локусах, расположенных в разных хромосомах.

Источником генетической гетерогенности в том же локусе — **внутрилокусная гетерогенность** — могут быть множественный аллелизм и генетические компаунды. Разные мутантные аллели могут проявляться фенотипически неодинаково (например, разные β -талассемии, некоторые мукополисахаридозы).

Генетические компаунды, иногда неправильно называемые двойными гетерозиготами, — это сочетание двух разных патологических аллелей одного локуса у индивида. Фенотипы генетических компаундов отличаются от гомозиготных форм по обоим унаследованным аллелям (например, фенотип при гемоглобинопатии HbSC отличается от фенотипов обеих мутантных гомозигот - HbSS и HbCC).

Для некоторых групп болезней генетическая гетерогенность проявляется и на межлокусном, и на внутрилокусном уровне (мукополисахаридозы, гликогенозы).

Расшифровка гетерогенности генных болезней интенсивно продолжается одновременно в двух направлениях — клиническом и генетическом. Общая задача сводится к выявлению корреляции между генотипом и фенотипом.

Анализ фенотипа (клинической картины болезни) — первый этап в расшифровке генетической гетерогенности. Чем точнее изучен фенотип, тем больше возможностей в открытии новых форм болезней, в подразделении изучаемой формы на несколько нозологических единиц.

С помощью классических клинических методов открыто несколько форм нервно-мышечных дистрофий, наследственных форм карликовости. Клинико-биохимическими методами подразделены наследственные несфероцитарные анемии, гемоглобинопатии, гликогенозы. Иммунологическими методами дифференцированы первичные иммунодефицитные состояния. В клинико-физиологических исследованиях описана гетерогенность гемофилии, цветовой слепоты. Генетическая гетерогенность нескольких групп болезней была открыта с помощью методов культуры клеток (мукополисахаридозы, болезни репарации ДНК).

Все перечисленные методы с некоторыми усовершенствованиями в параклиническом плане и сейчас применяются для расшифровки природы наследственных болезней.

Генетические методы включают в себя весь арсенал генетического анализа болезни — от применения клинико-генеалогического метода до секвенирования гена. Накопление родословных по какому-либо заболеванию и их генетический анализ позволяют подразделять ранее описываемую одну болезнь на реально существующие формы, если в этой группе встречаются мутации с доминантным и рецессивным типом наследования. Именно так были подразделены синдром Марфана (доминантное наследование) и гомоцистинурия (рецессивное наследование), имеющие сходную клиническую картину (высокий рост, подвывих хрусталика, деформация

грудной клетки). Разные типы наследования обнаружены во многих гетерогенных группах болезней (синдром Элерса—Данло, мукополисахаридозы, витамин D-резистентный рахит, амиотрофия Шарко—Мари).

Изучение аллелизма рецессивных мутаций дало возможность установить гетерогенность наследственной глухоты (у глухонемых родителей рождаются нормальные дети).

Наиболее полную информацию о гетерогенности клинической формы болезни даёт применение современных методов анализа генов человека. Отнесение гена к одной или разным группам сцепления, локализация гена, его структура, сущность мутаций — всё это позволяет однозначно идентифицировать нозологические формы.

Концепция генетической гетерогенности генных болезней открывает много возможностей в понимании сущности отдельных форм и причин их клинического полиморфизма, что крайне важно для практической медицины (правильная диагностика, выбор методов лечения, медико-генетическое консультирование). Если врач не принимает во внимание генетическую гетерогенность наследственных болезней, то это приводит к неправильным или неоправданным советам и прогнозам.

РАЗДЕЛ 5. ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА. ЕГО ОСОБЕННОСТИ И ХАРАКТЕРИСТИКА.

Совокупность генов и межгенных участков одной клетки **называется геномом**.

В одной хромосоме находится одна молекула ДНК. В 46 хромосомах – 46 молекул ДНК. Длина всех молекул ДНК одной клетки около 2 м. Тело человека состоит из 5×10^{13} клеток. Общая длина ДНК всех клеток 1×10^{11} км, что в тысячи раз больше расстояния от Земли до Солнца. ДНК состоит из нуклеотидов. Гаплоидный набор ДНК одной клетки содержит $3,2 \times 110^9$ пар нуклеотидов. В одной молекуле ДНК сотни генов. Большинство генов содержит 50 000 нуклеотидных пар (н.п.), размах достаточно широк. Ген инсулина содержит 17 000 н. п., ген тиреоглобулина 300 000 н.п., а ген дистрофина – 2 000 000 н.п. В хромосомах гены располагаются в линейном порядке и образуют группы сцепления.

Геном **видоспецифичен**. Он содержит полную информацию о формировании признаков и свойств организма в онтогенезе, информацию о том, как выжить в сложных условиях и как предотвратить повреждения в наследственном аппарате. Геном человека формировался вместе с эволюцией человека. Организация генома любой эукариотической клетки иерархична: нуклеотиды – кодоны – домены – гены с межгенными участками – сложные гены – плечи хромосом – хромосомы – гаплоидный набор вместе с хромосомной и внеядерной ДНК. Поэтому различают геном **хромосом** (у человека он содержит 95 % всей массы ДНК) и **геном митохондрий** – 5% всей массы ДНК.

Раздел генетики, который изучает геном называется **геномикой**.

В развитии геномики выделяют несколько направлений:

1. структурная геномика – изучает строение генов, последовательность нуклеотидов, составляет карты хромосом;
2. функциональная геномика – определяет функции генов и их взаимодействия;
3. эволюционная геномика – изучает эволюцию генома, время и механизмы появления новых генов;
4. сравнительная геномика – изучает геномы разных организмов;
5. медицинская геномика – решает вопросы генодиагностики, генотерапии наследственных болезней.

5.1. Характеристика генома человека

Как показали исследования последних лет в геноме человека около 30 000 генов. Эта цифра пока не стабильная. В процессе изучения генома человека, количество генов неуклонно снижалось: 100 000 – 70 000 – 50 000- 30 000. Транскрибируется только 3 – 5 % всех генов, остальные – это «молчащие» гены. Функция их на сегодняшний день недостаточно изучена. Эти гены реплицируются, но не транскрибируются. Исключи-

тельно вариабельно количество генов, вовлеченных в развитие и функционирование клетки, организма: самое большое число генов необходимо для формирования мозга и его работы – 3195, самое меньшее для создания эритроцитов – 8 (рис.53). Процентное соотношение по количеству вовлеченных генов можно представить следующим образом: 22%- генов участвуют в синтезе РНК и белков; 12% - обеспечивают клеточное деление; 12% - клеточные сигналы; 12% - защиту клетки; 17% - клеточный метаболизм; 8% - клеточные структуры и 17% - функция пока неизвестна.



Рис 53. Количество генов, вовлеченных в развитие и функционирование органов и тканей человека.

В функциональном отношении наибольшее количество составляют гены, кодирующие ферменты (31,2% общего числа). В 2 раза меньше генов – модуляторов белковой функции (13,6%). Они стабилизируют, активируют или влияют иным образом на функции белка. Каждая из остальных категорий генов составляет менее 10% от общего числа.

5.2. Особенности организации генома человека

1. Избыточность генома

Хромосомная ДНК подразделяется на две группы: участки с уникальной последовательностью пар нуклеотидов (50% всей ДНК) и участки с повторяющимися последовательностями (50% ДНК). Различают два основных класса повторов: тандемные и диспергированные.

Диспергированные повторы

В геноме человека они занимают не менее 46%. В геноме они обнаруживаются повсеместно, поэтому называются «диспергированными» (т.е. рассеянными). Одна группа диспергированных повторов — ДНК-

транспозоны, перемещающиеся без участия РНК, по механизму «вырезать-вставить». Остальные распространяются по геному при участии РНК — ретротранспозоны. Механизм их расселения по геному при помощи обратной транскрипции называют ретропозицией по механизму «копировать—вставить». Он также характерен для большой группы ретровирусов. Самый известный ретровирус — вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Около 200 тысяч ретровирусов геном человека носит с собой как «кейс с наручниками». У нас есть и собственные, эндогенные вирусы. Со своими эндогенными ретровирусами человек рождается, умирает. Значение их для хозяйского организма все еще остается загадкой.

Больше трети человеческого генома занимают два самых успешных класса ДНК — длинные и короткие рассеянные повторы. Длинные диспергированные повторы (у человека самый распространенный это LINE1, 17% генома), интересны тем, что при анализе их ДНК были найдены две открытые рамки считывания. Экспериментально выделили соответствующие белки. Оба белка обладают свойствами, необходимыми для ретропозиции. С длинного повтора считывается РНК, которая обратно транскрибируется, то есть на ней синтезируется ДНК-копия. ДНК-копия при помощи белков встраивается в геном в новом месте. Короткие диспергированные повторы (у человека преобладает семейство Alu-повторов, 11% генома) тоже встречаются повсеместно, в том числе в интронах и регуляторных областях генов. Они ничего не кодируют. В отношении транспозиции короткие повторы несамостоятельны. Они используют белки, кодируемые длинными повторами.

После опубликования в 2002 году генома мыши стали возможны некоторые сравнения. И у человека, и у мыши обнаружилась строгая корреляция: там, где много генов, много и коротких диспергированных повторов; там, где мало генов — много длинных диспергированных повторов. При том, что их функции в геноме неизвестны, можно предположить, что короткие повторы помогали при расстановке генов и организации их экзон-интронной структуры.

Тандемные повторы

Тандемные повторы — один из первых изученных классов ДНК. На них отработывались тривиальные теперь приемы генной инженерии. Определение «тандемный» означает, что эти последовательности устроены из очень простых, относительно небольших последовательностей, уложенных тандемно — «голова к хвосту». Участки с повторяющимися последовательностями отличаются по длине и по числу повторов.

По числу повторов: а) - умеренно повторяющиеся последовательности (до 1000 повторов в одном локусе);

б) – высокоповторяющиеся последовательности (больше 1000 повторов).

К тандемным повторам относятся теломерные и сателлитные ДНК.

Структура всех хромосом принципиально одинакова: два плеча, посередине первичная перетяжка — центромера; на концах теломеры. Тело-

мерные ДНК занимают фиксированную позицию на самом конце хромосомы, и ограничивают ее, не давая ей слиться с другими хромосомами. Теломерный повтор очень консервативен. Практически у всего живого царства он устроен одинаково.

Название «сателлитная ДНК» (сатДНК) — результат исторического курьеза. Название дали по первому способу выделения. Ничьим эта ДНК спутником не является, но название прижилось. Устроена она принципиально так же, как и теломерная ДНК. Но в отличие от эволюционно консервативных теломер сателлиты переменны до такой степени, что могут быть систематическим признаком, то есть они видоспецифичны. Более того — внутри вида существуют хромосомоспецифичные варианты сатДНК. У человека можно различить самые разнообразные классы сатДНК. По длине каждого повтора: а) — микросателлиты — 2-8 пар нуклеотидов; б) — мини-сателлиты — от 10 до 100000 пар нуклеотидов.

Положение сатДНК на хромосоме стабильно. Из нее состоит центромерный район, большие поля сатДНК его окружают, подстилают. Сходным образом огромные поля сатДНК подстилают концы хромосом, где находятся теломерные повторы. Встречаются отдельные вставки сатДНК и на плечах хромосом, между теломерами и центромерой.

Тандемные повторы играют важнейшую роль в самом существовании хромосом. Любая хромосома должна быть отграничена от остального генетического материала (это обеспечивается уникальными свойствами теломерной ДНК) и должна нормально наследоваться, правильно «растаскиваться», при делении клетки (центромерная ДНК). Без клонированных теломерных и центромерных участков невозможно и создание искусственных хромосом, необходимых для манипуляций с генами.

Повторы могут находиться в одном локусе хромосомы; в разных локусах одной хромосомы; в разных локусах разных хромосом. Мини- и микросателлитные повторы разбросаны по всему геному и представляют собой уникальную для каждого человека комбинацию по числу тандемных повторов в разных локусах и по числу таких локусов. Именно они характеризуют генетический полиморфизм каждого человека. Главной формой генетического полиморфизма является **однонуклеотидный полиморфизм (ОНП)**. Под этим термином понимают варианты последовательностей ДНК у разных людей с вовлечением одной пары нуклеотидов. Это наиболее частый источник вариаций между людьми. Эти вариации встречаются на протяжении всей ДНК (в экзонах, интронах, межгенных участках, повторах) и отражают прошлые мутации. 93% генов содержат однонуклеотидный полиморфизм. Расчеты показывают, что два человека на 99,9% идентичны по нуклеотидным последовательностям, т.е. только 0,1% различий по одному нуклеотиду создает такие огромные индивидуальные фенотипические вариации, которые легко видеть в любой группе разных людей.

Оценка генетического полиморфизма используется в медико-генетических и судебно-медицинских целях. Предполагают, что различия

по одному основанию между определенными отрезками генома лежат в основе генных болезней (миссенс-мутации), в основе чувствительности к возбудителям или защиты от них, в основе приспособительных реакций и наследственного предрасположения к мультифакториальным болезням. Главное использование карты ОНП – выяснение вклада индивидуальных генов в болезни многофакторной и полигенной природы. Сравнение частот определенных типов ОНП у пациентов и в контрольных группах позволяет идентифицировать ОНП, с которыми ассоциируется заболевание.

Повторяющиеся гены образуются путем **амплификации** - многократного копирования участков ДНК. Значение амплификации велико. Это прежде всего материал для эволюции. Благодаря этому, появилась возможность реконструировать этапы и время дивергенции белков и их разновидностей.

Явление амплификации используется в эксперименте, в генодиагностике и в генно-инженерных работах для получения копий необходимых генов.

Избыточность генома, помимо многочисленных повторов, представлена участками, не несущими информацию. К таким участкам относятся:

- спейсеры – последовательности нуклеотидов, которые отделяют один транскриптон от другого;
- сайты рестрикции - последовательности нуклеотидов по которым с помощью рестриктаз можно разрезать ДНК и выделить нужный ген;
- интроны - последовательности нуклеотидов между экзонами, благодаря которым, в геноме может происходить перекомпоновка и образование новых генов.
- донорные сайты сплайсинга – последовательности нуклеотидов по которым происходит вырезание интронов во время процессинга.

2. Дискретность генома

Гены дискретны. Структура гена является прерывистой, о чем свидетельствует современное представление о строении транскриптона (рис. 54).



Рис 54. Схема строения транскриптона

Промотор – область узнавания РНК – полимеразой. СААТ – блок - ответственный участок за начало связывания с РНК – полимеразой (на расстоянии 60-80 н.п. от точки инициации). ТАТА – блок находится на расстоянии 10 н.п. от стартовой точки инициации транскрипции. Эхансер – усилитель транскрипции находится на расстоянии 1400 н.п. СИ – сайт инициации представлен нуклеотидами ТАЦ (что будет соответствовать АУГ на и-РНК) – это стартовая точка транскрипции. Экзоны - участки несущие информацию о белке, интроны – участки не несущие информацию. ДСС – донорные сайты сплайсинга – объединяют ген в одно функциональное целое (цистрон), который и кодирует один полипептид. Терминатор – это участок гена, где прекращается рост цепи РНК, и она освобождается от матрицы ДНК.

Терминатор содержит поли – А, комплементарно этому участку образуется последовательность нуклеотидов поли - У в информационной РНК. ССР – спейсерный сайт рестрикции, который отделяет один транскриптон от другого.

Классификация генов в геноме

Открытие дискретности позволило выделить две основные группы генов:

1. **структурные гены**, которые кодируют структурные белки и белки – ферменты.
2. **регуляторные гены**, которые кодируют белки, контролирующие работу структурных генов.

Таблица 5.

Классификация генов и их функции

| | | | |
|--------------------------|---|---|--|
| Структурные гены | Независимые (уникальные последовательности) | Транскрипция не связана с другими генами | Активность этих генов регулируется гормонами |
| | Тандемные гены (умеренно повторяющиеся гены, высоко повторяющиеся гены) | | |
| | Кластерные гены | Группы генов, объединенные в домены общей функцией | |
| Регуляторные гены | Неспецифические: ТАТА – блок, СААТ – блок, входящие в область промотора | | |
| | Специфические: энхансеры, инсуляторы, сайленсоры | энхансеры – усиливают транскрипцию, инсуляторы – ингибируют транскрипцию, сайленсоры отключают работу гена, действуя через инсуляторы | Регуляция транскрипции идет через белки, кодируемые этими генами |

Гены в геноме собраны в **домены**. Домены образуют петли, которые прикрепляются к внутренней ядерной мембране. Длина петли сильно варьирует, так как один домен может содержать либо один ген, либо несколько генов, образующие кластеры или тандемы. Петли фиксируются к мембране инсуляторными участками ДНК. Спейсеры – отделяют один ген от другого. Транскрипцию домена целиком усиливают энхансеры, а выключают сайленсоры. Эти гены могут находиться на достаточно большом расстоянии от промоторов и действуют через инсуляторные белки (рис. 55)



Рис. 55. Ядерные домены, прикрепленные инсуляторными участками к ламине (пластинке), примыкающей к внутренней ядерной мембране

3. Наличие мобильных генетических элементов

Особенность организации генома заключается в наличии мобильных (подвижных) генетических элементов, так называемых «прыгающих» генов. Они относятся к диспергированным повторам и составляют 10 – 30% генома животных и 50% генома растений. Это короткие нуклеотидные последовательности, которые активно перемещаются либо внутри генома из одного сайта в другой в пределах одной хромосомы, так и между хромосомами, либо из одного генома в другой геном. Различают два основных класса подвижных генетических элементов: транспозоны и ретротранспозоны. В основу классификации заложен механизм их перемещения.

Транспозоны. Это элементы, которые ограничены последовательностями, направленными друг к другу. Примером является Р-элемент дрозофилы и Ас – элемент кукурузы (рис.56).

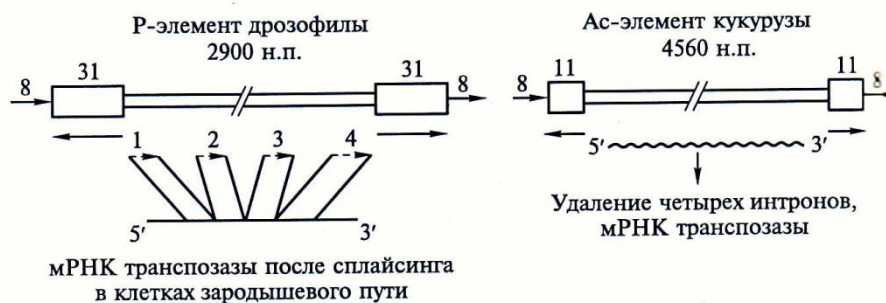


Рис. 56. Транспозоны эукариот

Транспозоны перемещаются с участием комплекса белков, которые обеспечивают активность фермента **транспозазы**, которая узнает транспо-

зон и переносит его в новое место. Транспозоны на концах имеют инвертированные участки (повторы), которые сближаются и точно отрезаются от участков ДНК – хозяина. Разрыв и зашивание обеспечивает транспозаза и вспомогательные белки. Транспозаза может кодироваться как самим подвижным элементом, так и его копией.

Описано два варианта транспозиции транспозона:

1. ДНК (исходный донорный сайт) → копия сайта (транспозон) → ДНК-мишень и далее реплицируется вместе в ней.
2. Транспозон вырезается из исходной ДНК → перемещается и встраивается в ДНК-мишень и далее реплицируется вместе в ней.

Схема транспозиции показана на рис 57.

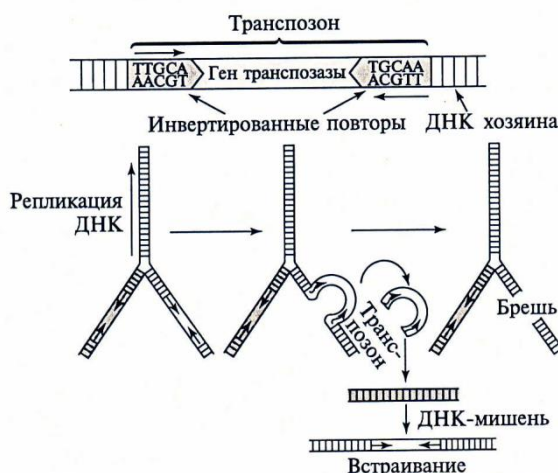


Рис. 57. Схема транспозиции транспозона. Инвертированные повторы транспозона сближаются и отрезаются от соседних участков ДНК хозяина. Вырезанный транспозон внедряется в район ДНК- мишени, разрыв который был подготовлен транспозазой и с ее же помощью сшивается с ДНК в новом месте, а затем реплицируется вместе с ней.

Роль транспозонов в геноме:

1. индуцируют хромосомные перестройки (вставки, делеции, точковые замены);
2. копии транспозонов обеспечивают возможность рекомбинаций между хромосомами;
3. участвуют в регуляции активности гена, выполняя функцию промотора;
4. геном, несущий активные транспозоны, более выживаем. В ходе эволюции эти элементы обеспечивают селективные преимущества организму.

Ретротранспозоны сходны по своей структуре с проретровирусами, которые внедряются в геном, используя механизмы обратной транскрипции, Обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНК- полимераза) была открыта в 1970 году американскими учеными Д. Балтимором и Г. Теминым. Ретротранспозоны – внутригеномные элементы способные к самовоспроизведению, они широко распространены у эукариот, живут внутригеномно «подзаряжая «геном». Эти элементы содержат «тело» размером 5 – 8 тыс.

н. п., ограниченное длинными концевыми повторами (ДКП). Число копий этих элементов достаточно постоянно для вида. В составе «тела» элемента обнаруживаются открытые рамки считывания для обратной транскриптазы и интегразы (нуклеазы - которая вырезает место встраивания). Один из способов перемещения ретротранспозонов предполагает его транскрипцию с помощью РНК-полимеразы II (рис. 58). Синтезируемая молекула РНК транслируется с образованием ферментов, необходимых для синтеза ДНК и внедрения ее в геном. Эта схема полностью повторяет схему образования и интеграции провируса.

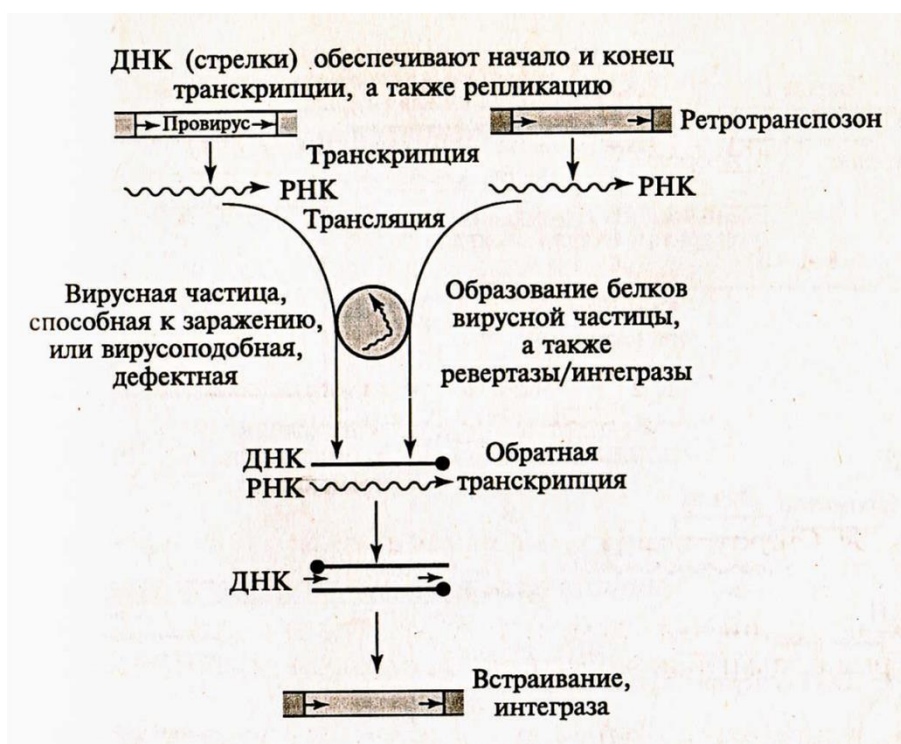


Рис. 58. Перемещение ретротранспозона

Остается открытым вопрос: произошли ли ретровирусы из ретро-транспозонов или ретротранспозоны возникли из вирусов, потерявших способность к заражению? Большинство ретротранспозонов (при сравнении их с ретровирусами) либо потеряли ген белковой оболочки, либо еще не приобрели его.

Роль ретротранспозонов в геноме

1. Во многих случаях внедрение ретротранспозона приводит к инактивации гена.
2. Может резко активизировать экспрессию гена. Если подвижный элемент оказался около протоонкогена, то запускается онкогенная программа, ведущая к злокачественному перерождению клетки.
3. Транспозиция подвижного элемента изменяет регуляторные системы клетки. Именно такой промотор может перепрограммировать характер

работы гена как от внешних сигналов, так и от внутриклеточных регуляторных систем

4. Перемещение элементов по геному способствует распространению регуляторных сигналов (сайтов инициации транскрипции, сигналов полиаденилования, энхансеров), что делает значительной роль мобильных элементов в эволюции системы регуляции.
5. Ретротранспозоны без длинных концевых повторов сохраняют концы хромосом в ряду поколений, удлиняя концы ДНК, спасая хромосому от укорачивания, если отсутствует теломеразная активность.
6. Участвуют в ликвидации разрывов ДНК, сохраняя ее целостность.

Таким образом, подвижные генетические элементы, являясь факторами изменчивости генов и участвуя в перестройках хромосом, имеют огромное значение в процессах эволюции генома.

5.3. Митохондриальный геном

Митохондрии содержат кольцевую двухцепочечную ДНК, которую обозначили 25-й хромосомой человека (мтДНК). В каждой соматической клетке в среднем содержится около 1000 митохондрий. Суммарно ДНК митохондрий составляет 5% общего количества ДНК в организме. ДНК митохондрий реплицируется (транскрибируется) полуавтономно от ядерной ДНК.

Геном митохондрий человека был полностью секвенирован еще в 1981 г. Он содержит 16 569 пар нуклеотидов и кодирует 2 рибосомные РНК (12S и 16S), 22 транспортные РНК и 13 полипептидов. Полипептиды являются субъединицами ферментных комплексов окислительного фосфорилирования. Другие 66 субъединиц дыхательной цепи кодируются в ядре.

Митохондриальный геном как целое отличается от ядерного генома несколькими признаками.

- мтДНК наследуется по материнскому типу. Доля отцовской мтДНК в зиготе составляет от 0 до 4 митохондрий, а материнских — 2500. К тому же не исключается, что после оплодотворения репликация отцовских митохондрий вообще блокируется.
- Комбинативная изменчивость мтДНК (мейоз) отсутствует. Нуклеотидная последовательность меняется в поколениях только за счёт мутаций.
- Митохондриальный геном непрерывен, т.е. не содержит интронов. В нём имеется всего лишь несколько межгенных пар нуклеотидов или их вообще нет. Известно только одно исключение — около 1000 пар нуклеотидов — интрон в области промоторов (Д-петля). В мтДНК нет защитных гистонов.
- Большинство генов мтДНК чередуются с одним геном транспортной РНК или более, которые служат разделяющими сигналами для дальнейшего процессинга первичных транскриптов.
- Внутри одной клетки могут функционировать митохондрии с разными типами мтДНК. Это состояние называют *гетероплазмией*. Присутствие

в клетках митохондрии с одним типом мтДНК называется *гомоплазмией*. В мтДНК транскрибируются или транслируются обе цепи. Код мтДНК слегка отличается от универсального (UGA кодирует триптофан, ALA кодирует метионин, AGA и AGG являются стоп-кодонами).

Мутации генов мтДНК лежат в основе митохондриальных болезней, отличающихся от моногенных болезней не только особенностями передачи из поколения в поколение по материнской линии, но и своеобразными чертами клинической картины.

Примером полной генетической карты может быть геном митохондрий человека (рис.59), наиболее точно расшифрованный и секвенированный.

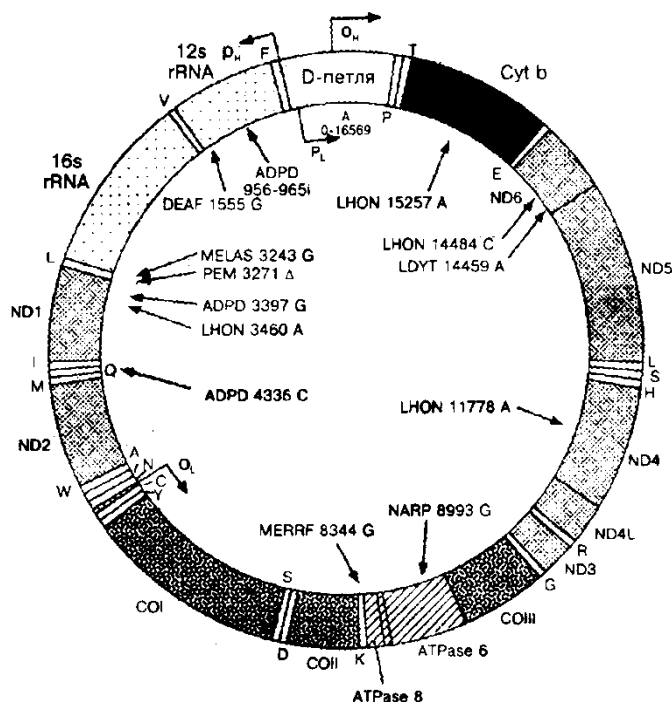


Рис. 59. Структура митохондриального генома и примеры митохондриальных болезней. Каждый ген митохондрий занимает своё положение. ADPD - Болезнь Альцгеймера / болезнь Паркинсона; DEAF — нейросенсорная потеря слуха; LHON — наследственная нейрооптальмопатия Лебера; LDYT — LHON и дистония MELAS (митохондриальная миопатия, энцефалопатия, молочнокислый ацидоз и приступы судорог); MERRF — миоклональная эпилепсия в сочетании с необычно красными мышечными волокнами; NARP — нейропатия, атаксия и пигментный ретинит; PEM — летальная прогрессирующая энцефаломиопатия.

5.4. Геномика микроорганизмов и вирусов

Геномика микроорганизмов имеет прямое отношение к клинической медицине. Закономерности геномной организации патогенных бактерий и вирусов позволяют более точно понять природу инфекционного процесса, определить направление создания вакцин, уточнить патогенные мишени микроорганизмов для создания лекарств.

Секвенирование генома бактерий началось в конце 80-х годов XX века, когда уже были созданы методические предпосылки. Первым секвенированным бактериальным геномом был геном *Mycoplasma genitalium*

(1995). За последние годы список полностью секвенированных геномов бактерий увеличился до 20 видов, среди которых представители таких родов патогенных бактерий, как *Streptococcus*, *Slaphylococcus*, *Corynebacterium*, *Yersinia* и др.

Как показали геномные исследования, патогенные бактерии весьма разнообразны по комбинаторике генов, определяющих патогенность. У них имеются специфические гены, контролирующие синтез факторов вирулентности (адгезины, инвазины, порины, токсины, гемолизины). Большинство таких генов собрано в кластеры («островки патогенности»). Они могут быть локализованы в хромосоме бактерии или в плаزمиде.

5.5. Программа «Геном человека»

Изучению генома посвящена обширная международная программа «Геном человека» (1990 – 2000), которая закончилась грандиозным открытием – расшифровкой нуклеотидных последовательностей всех ДНК одного человека. Это самый дорогостоящий проект XX века.

Работа проводилась в следующих направлениях:

1. компьютерный анализ полного генома человека;
2. идентификация новых генов на основе картирования, клонирования и секвенирования, структурный анализ генов и регуляция их активности;
3. установление генетических взаимоотношений между генами и предрасположенностью к заболеваниям различной этиологии;
4. развитие методов генной и геномной диагностики заболеваний человека;
5. разработка методов генной терапии моногенных заболеваний;
6. разработка юридических, этических, законодательных, правовых, социальных аспектов исследований генома и использование информации о структуре и свойствах геномов отдельных людей;
7. развитие медицины на принципиально новом уровне знаний о геноме человека и формулирование соответствующих практических предложений.

В ходе проекта создавались **три типа карт хромосом**:

1. **генетические** – определялась локализация гена в хромосомах и расстояние между генами в морганидах;

2. **физические** – изучение последовательности и положения сайтов ДНК с помощью специального окрашивания и расстояние между ними в парах нуклеотидов в изучаемых хромосомах; (под микроскопом хорошо видны бэнды – неактивные последовательности ДНК). Физические карты показывают расположение экзонов по отношению к этим бэндам. Расположение бэндов индивидуально у каждой ДНК и для определения последовательности изучаемых фрагментов используют дополнительно метод фингерпринтинга («отпечатки пальцев»: хромосомы разделяют на фрагменты, клонируют и упорядочивают, устанавливая соответствие полос и генов.

3. **секвенсовые карты** – определение последовательности нуклеотидов в ДНК.

Значение этого открытия грандиозно. В недалеком будущем могут быть решены проблемы:

1. генодиагностики;
2. генотерапии;
3. доставки лекарств в пораженные клетки;
4. замещения дефектных генов;
5. создания генного паспорта человека;
6. реконструкции этапов антропогенеза;
7. генетического тестирования и выявления группы риска по болезням с наследственным предрасположением;
8. геномной дактилоскопии.

В ходе выполнения программы решались **стратегические задачи**:

1. изучение генетических различий между популяциями;
2. выявление географических районов повышенного риска;
3. выявление производств с большой опасностью поражения геномов персонала.

История создания и выполнения программы «Геном человека»

В 1988 г. по инициативе американских ученых У. Гилберта и Дж. Уотсона была создана международная организация «Геном человека» для координации работ по определению полной нуклеотидной последовательности всей ДНК человека. **Цель этой международной программы – создать подробную карту человеческого генома, то есть изучить полный набор генов отдельного человека.**

Дж. Уотсон стал научным организатором. Он построил лучший биологический институт мира и организовал программу «Геном человека». В 1990 году был основан Международный консорциум по секвенированию генома человека. Программа «Геном человека» не имеет аналогов в истории человечества по масштабности и вложению денежных средств. Важно отметить, что с самого начала работ научный мир договорился об открытости, доступности получаемой информации для его участников. Существует гигантская база данных, в которых накоплена информация о структуре не только генома человека, но и геномов многих других организмов. 80 российских исследователей были членами этой организации: А. Баев, А. Мирзабеков и др.

В разработке разных направлений программы участвовали десятки стран. Наряду с Международным консорциумом в США появилась «фабрика» с автоматическими секвенаторами. Она была организована Вентером Крейгом на деньги фармацевтических кампаний, на основе японских технологий. Именно в Японии в 1998 году впервые был построен автоматический высокопроизводительный капиллярный секвенатор ДНК. Благодаря Уотсону, результаты исследований разных стран по клонированию и

секвенированию ДНК включались в международную базу данных и были доступны для всех.

В нашей стране эта программа была создана в 1988 году академиком Александром Баевым. Это известный российский молекулярный биолог и биохимик. Начало работ по изучению генома человека в нашей стране и в США было синхронным. Также как американцы мы получили 20 млн. долларов на исследования. Вице – президентом совета по программе «Геном человека» в нашей стране был академик А.Д. Мирзабеков, который возглавил его после смерти А. Баева. Но в 1991 году в стране произошел обвал финансирования, и реального участия в секвенировании наша страна не принимала, а в 2002 году министерство промышленности, науки и технологий закрыло программу «Геном человека» полностью. Несколько десятков ученых специалистов в этой области тут же уехали за границу. Американская фирма «СЕЛЕРА», возглавляемая Дж. Вентером, используя 250 роботизированных автоматических установок, достигла огромных успехов, секвенируя по 10 млн. нуклеотидных пар в сутки. В феврале 2001 года в крупнейших научных журналах были опубликованы результаты исследований Международной организации по изучению генома и приведены полные нуклеотидные последовательности генома человека, включающие 90% его длины. Проект практически выполнен, причем 85 % информации абсолютно достоверны. Уточнено количество генов, кодирующих белки, их около 25 тысяч, а не 80 000 - как считалось 2-3 года назад, доказана вариабельность генома, что дает уникальную возможность для молекулярной идентификации отдельного организма.

В результате завершения программы «Геном человека» и анализа последовательностей ДНК, которые накопились в базе данных, были сделаны неожиданные открытия.

Самое поразительное открытие программы — в геноме человека очень мало генов, кодирующих белки (структурных генов). Ожидалось, что обнаружится не меньше ста тысяч генов. По окончании тотального секвенирования, разные компьютерные программы выдали оценки от 21 до 39 тысяч (можно задавать критерии с разной степенью строгости). Одна из лучших программ насчитала 26688 генов. Точное количество структурных генов, кодирующих белки, до сих пор не известно. Сейчас принято считать, что в геноме может поместиться около 30000 генов. Со всеми экзонами и интронами, промоторными районами и другими обслуживающими транскрипцию последовательностями, все это вместе занимает около 5% генома. **Если считать только то, из чего получается белок (не считая интроны, промоторы), получается 1% генома. Один!** А 99% ДНК генома не имеют никакого выражения в белке. В основном это повторяющаяся ДНК.

Белков же у человека гораздо больше, чем генов — около 150 тысяч. Самое большое разнообразие белков - в нервной ткани и в половых клетках. Почему же белков в пять раз больше? Во-первых, белок - это не только цепочка аминокислот, образующаяся при трансляции. Белки включают

и другие компоненты: углеводы, липиды, молекулы пигментов и производных витаминов, ионы металлов. При образовании функционально активных белков часто посттрансляционные модификации меняют исходную цепочку аминокислот до неузнаваемости. Во-вторых, с одного гена может синтезироваться несколько различных белковых продуктов. Есть много случаев, когда синтезированная в клетке белковая молекула разрезается на короткие фрагменты, которые функционируют как гормоны или ферменты. Например, в гипофизе человека из одного гена образуется шесть гормонов и два нейрорегулятора – бета-эндорфин и мет-энкефалин. Кроме того, альтернативный сплайсинг, который поначалу посчитали просто игрой природы, оказывается мощным фактором увеличения разнообразия белков. По оценкам специалистов, более половины генных продуктов подвергаются альтернативному сплайсингу. Легко представить, что количество возможных вариантов белков значительно возрастает. Результирующее множество белков организма называют **протеомом**.

После завершения геномного проекта первейшая задача — разобраться в хаосе уже открытых белковых продуктов (каталогизация белков). Изучение многообразия белков в постгеномную эру выливается в становление новой науки — **протеомики** (по аналогии с геномикой). В 2001 году создана международная организация по изучению протеома человека. Время открытий в области протеомики еще впереди.

Авторы программы «Геном человека» в первых публикациях старались не акцентировать тот факт, что их геном далеко не полон. Но когда были представлены результаты секвенирования генома мыши, подчеркивалось, что полученные данные «представляют собой 96% эухроматической части генома» и не более того. Что же такое эухроматическая часть генома?

Полуторавековые исследования клеточного ядра создали представление о том, что плотно упакованная в хромосомы ДНК после деления клетки разворачивается в рабочее состояние. Развернутые хромосомы в ядре клетки называют хроматином. Но разворачиваются хромосомы не полностью. Два метра развернутой ДНК в ядро клетки не влезут. Ту часть, которая разворачивается и на которой происходит активный синтез РНК, назвали эухроматином (настоящим хроматином). Районы хроматина, которые остаются почти такими же компактными, как в хромосоме, называются гетерохроматином. Сюда относятся прицентромерные и прителомерные части хромосом. Гетерохроматиновые районы хромосом не прочитаны при выполнении программ «Геном человека» и «Геном мыши».

Технология чтения ДНК разрабатывалась для генов, с которых транскрибируется РНК, имеющая выражение в белке. С помощью этих методов можно заполнить довольно длинные разрывы между генами, но невозможно прочесть и положить на карту хромосомы огромные поля почти одинаковых тандемных повторов, которые в большинстве клеток не транскрибируются. В рамках традиционного подхода невозможно даже определить размер таких блоков. Центромерные и прителомерные районы представ-

ляют собой «белые пятна» на картах хромосом человека и мыши. Часть генома, организация которой еще неизвестна, весьма велика — это десятки процентов.

Пока нет надежных подходов для распознавания генов, продуктом которых является только РНК, — транскрибируемых, но не транслируемых. В части генома без генов около 40% занимают повторяющиеся последовательности разных типов, которые можно распознать. А вот еще 20% — это последовательности, которые никто никогда не клонировал, не секвенировал. Они расположены в так называемых «генных пустынях» — огромных пространствах вдоль плеч хромосом, где вообще нет генов. Что это такое — никому не известно и не понятно. Еще одно свидетельство нашего невежества и, вероятно, неверной установки, положенной в основу программы «Геном»: прочесть все гены, которые там находятся.

Существующие парадигмы: «от гена к признаку», «один ген — один белок», «наследственная информация реализуется в процессе синтеза белка» не предполагали наличия того количества некодирующей ДНК в геноме, которая там оказалась.

Сравнительная геномика

После того, как в мире построено несколько фабрик, круглые сутки считывающих нуклеотиды, стало возможным организовать дочерние от «генома человека» программы. В результате уже через год был опубликован геном мыши. Сейчас в процессе прочтения находятся геномы многих организмов.

К началу 2000 года были полностью расшифрованы геномы ряда многоклеточных (плодовой мухи дрозофилы, цветкового растения арабидопсиса) и одноклеточных организмов (около 300 разных видов бактерий). Прочитан геном кишечной палочки и пекарских дрожжей. Завершено изучение геномов круглого червя ценорабдитис, сельскохозяйственной культуры риса; продолжаются проекты по расшифровке генома собаки, курицы, аквариумной рыбы данио и рыбы фугу. Обсуждаются такие проекты как чтение генома кишечнорастворимого животного гидры и низшего хордового — асцидии. Так на наших глазах возникает новая наука геномика, или точная зоология, которая позволит выявить закономерности эволюции геномов. Понадобится время, чтобы довести до конца чтение геномов животных, находящихся в ключевых точках эволюционного дерева, а еще больше времени понадобится, чтобы осознать и привести в порядок полученные данные.

Самые большие надежды ученые и общество возлагают на возможность применения результатов секвенирования генома человека не только для диагностики, но и для лечения генетических заболеваний. Замена дефектного гена здоровым! Мы стоим уже на пороге этого величайшего достижения человеческой мысли. По данным ВОЗ общий генетический груз планеты в настоящее время составляет 5%. Более 1000 генных болезней открыты благодаря методам молекулярной диагностики.

Исследования генома человека повлекли за собой изучение геномов других организмов. В настоящее время изучены геномы более 1000 организмов: 600 вирусов, 205 плазмид, 185 органелл, 32 эубактерии, 1 вид грибов, 5 видов животных и 5 видов растений.

Практическое значение

1. диагностика и лечение наследственных заболеваний по результатам секвенирования генов;
2. идентификация генов и выявление предрасположенности к заболеваниям;
3. предотвращение отрицательных реакций у людей на лекарства (геномная фармакогенетика);
4. геномная дактилоскопия и этногенетика, установление родственных связей.

У каждого человека помимо гражданского паспорта будет «генетический паспорт», в котором будет указано, какую несет данный человек мутацию опасную для здоровья. Конечно, величайшие открытия порождают массу морально – этических, юридических проблем, особенно работы по трансгенозу, создание организмов с другими видами генов. Ведь изъять из биологической системы введенный ген уже невозможно. А ведь он может мутировать и предсказать его последствия нереально. Например, в Америке создали сорт картофеля, куда включен бактериальный ген, кодирующий токсин, убивающий личинок колорадского жука. Этот токсин считается безвредным для человека и животных, но в Европе этот сорт не разрешили вывозить. На юге Франции ген устойчивости к насекомым введенный в культурные растения «перескочил» к сорнякам. В Шотландии трансгенный лосось набирает вес в 10 раз быстрее, чем обыкновенный. Если он попадет в океан, то может нарушить сложившееся популяционное равновесие.

Однако человек во имя сохранения цивилизации просто обязан преодолеть все опасности, связанные с открытием генома!

РАЗДЕЛ 6. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. УСПЕХИ И ПЕРСПЕКТИВЫ.

Нормальный биологический обмен между генами или объединением генов из разных источников с образованием измененной ДНК в хромосоме, способной после этого реплицироваться, транскрибироваться и транслироваться, называется *генетической рекомбинацией*. Она широко встречается в природе в различных биологических ситуациях.

Одним из видов генетической рекомбинации является *трансформация* бактерий, под действием экзогенной ДНК.

Такой вид трансформации описан в эксперименте Т.Эвери, К.Мак-Лерда и М.Мак-Карти в 1943г. в Рокфеллеровском институте.

В этом эксперименте ДНК из вирулентного штамма пневмококка попадала в клетки неvirulentного штамма и превращала этот штамм в вирулентный. При этом ген вирулентности присутствующий в ДНК донорной клетки, включался в геном реципиентной клетки. Такая трансформация бактериальных клеток, реализуемая вследствие рекомбинации генов, может наблюдаться не только в лаборатории, но и в естественных условиях.

Другим протекающим в природе процессом генетической рекомбинации является *лизогения*.

При этой форме фаговый ген встраивается в хромосому клетки-хозяина, может реплицироваться в ее составе в течение многих поколений не проявляя, себя- однако спустя некоторое время какое-нибудь событие может "включить" механизм экспрессии этих ""спящих" фаговых генов, в результате чего начинается образование фаговых частиц и наступает лизис клетки-хозяина.

Еще одним типом генетической рекомбинации является *трансдукция* (в переводе - "перенос"). Это природный процесс, который в лабораторных условиях используется для картирования бактериальных хромосом при заражении клетки вирусами и фагами, которые могут переносить информацию от одной бактериальной клетки в другую.

Примером генетической рекомбинации служит *конъюгация*. В процессе конъюгации часть одной из цепей (или вся цепь ДНК донорной клетки переносится в реципиентную клетку того же вида с образованием новых комбинированных генов. Это характерно для половой конъюгации бактерий и инфузорий в результате которой реципиентная клетка приобретает несколько новых генов, которые встраиваются в ее хромосому.

У эукариот генетическая рекомбинация происходит: во время кроссинговера (профаза мейоза I), когда гомологичные хромосомы обмениваются аллельными генами; во время независимого расхождения хромосом (анафаза мейоза I) когда созревают половые клетки и во время оплодотворения, когда происходит случайное сочетание гамет. В результате потомство обладает комбинацией фенотипических признаков, принадлежащих обоим родителям.

Новые комбинации генов можно создать и искусственным путем в лабораторных условиях с помощью **клонирования**. Слово "клон" имеет греческое происхождение и означает побег или черенок, применяемый для размножения растений. Оно используется в двух смыслах. Во-первых, под термином **клонирование клеток** понимают образование группы генетически идентичных клеток, (например, в случае синтеза определенного типа антител). Под термином же **молекулярное клонирование** или клонирование генов имеют в виду образование множества идентичных копий гена, полученных в результате репликации одного гена, введенного в клетку хозяина.

В 1972 г. Пол Берг с сотрудниками (США) получили *in vitro* рекомбинантную (гибридную) молекулу ДНК, состоящую из фрагментов фаговой, бактериальной и вирусной ДНК. Так родилась новая отрасль молекулярной биологии, получившая название "**генетическая (генная) инженерия**". Своей целью она имеет создание новых генетических структур и, в конечном счете, создание организмов с новыми наследственными свойствами.

А.А. Баев был первым в нашей стране ученым, который поверил в перспективность генной инженерии.

Генетическая или генная инженерия по его определению - это конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинативных ДНК) или иначе - создание искусственных генетических программ.

Создание генной инженерии имело огромное значение для молекулярной биологии. Благодаря ее методам практически структура и функции любого гена и продуктов его экспрессии (РНК и белки) стали доступны для исследования. Появилась возможность изучения интимных механизмов функционирования генетического аппарата эукариот, включая человека, что другими приемами сделать невозможно. Появилась возможность целенаправленного изменения структуры геномов высших организмов. Вместе с тем, генная инженерия ставит перед собой обширные практические задачи, немало из которых уже решено. Прежде всего, это создание трансформированных видов микроорганизмов, растений и животных, способных стать продуцентами биологически активных соединений (гормонов, ферментов, антибиотиков и др.

Важнейшим достижением является создание диагностических препаратов, в частности, для выявления такого опасного заболевания как СПИД.

Получение, так называемых, трансгенных растений открыло принципиально новые возможности для растениеводства в создании сельскохозяйственных культур, устойчивых к экстремальным воздействиям и инфекционным поражениям.

За четверть века своего существования генная инженерия не причинила никакого вреда самим исследованиям, не принесла ущерба ни природе, ни человеку.

Теоретические предпосылки генной инженерии представлены наличием:

1. Молекулярных механизмов матричного синтеза: ДНК→ДНК – репликация; ДНК →РНК-транскрипция; м-РНК → белок – трансляция.
2. Кольцевых двуспиральных молекул ДНК, автономно размножающихся в бактериальной клетке и несущих маркерный ген - плазмиду.
3. Наличием ферментов, способных расщеплять ДНК в строго определенном месте с образованием липких концов у образуемых фрагментов, в частности рестриктаз. Рестриктазы впервые выделены в 1970 г. американцами Келли и Смит с сотрудниками. Эти ферменты широко используются в генной инженерии.

Стремительное развитие генной инженерии связано с появлением новых методов исследования, среди которых можно выделить главные:

- **расщепление ДНК (рестрикция)** – это необходимо для выделения генов с помощью рестриктаз и создания рекомбинантных молекул ДНК;
- **гибридизация нуклеиновых кислот.** благодаря их способности связываться по принципу комплементарности, что позволяет выявлять специфические последовательности ДНК и РНК, совмещать разные генетические элементы и амплифицировать нужные нуклеотидные последовательности;
- **клонирование ДНК**, которое осуществляется путем введения фрагментов ДНК в быстро реплицирующиеся плазмиды или вирусы, что дает возможность размножать гены в клетках бактерий, дрожжей или эукариот;
- **секвенирование нуклеотидных последовательностей** в клонируемом фрагменте ДНК, что позволяет определить структуру гена и последовательность кодируемого белка;
- **химико – ферментативный синтез полинуклеотидов**, необходимый для целенаправленной модификации генов и манипуляций с ними.

Практическое применение генной инженерии в медицине - получение человеческого инсулина в промышленных масштабах. Инсулин уже давно получают из органов животных и используют в медицинской практике. Однако многолетнее применение животного инсулина ведет к необратимому поражению многих органов из-за иммунологических реакций, вызываемых инъекцией чужеродного человеческого организму животного инсулина. Но даже потребности в животном инсулине удовлетворялись на 60-70%. Без лечения инсулином больные умирали.

Генные инженеры в качестве первой практической задачи решили **клонировать** ген инсулина. Клонированные гены человеческого инсулина были введены с плазмидой в бактериальную клетку, где начался синтез гормона, который природные микробные штаммы не синтезировали.

Начиная с 1982 г. фирмы США, Японии, Великобритании и других стран производят **генно-инженерный инсулин**. Проблема решена: из 100

литров бактериальной культуры получают приблизительно 200 г. инсулина, что равно количеству, получаемому из 1600 кг поджелудочной железы животных. При этом была решена проблема иммунологического поражения организма диабетиков животным инсулином.

Более 20 фирм Японии и несколько американских фирм разрабатывали другой очень важный медицинский препарат - **интерферон**, который необходим при лечении вирусных заболеваний и злокачественных новообразований. Еще один противораковый препарат - **интерлейкин** - производится в Японии и США. Около 200 новых лечебных препаратов введены в медицинскую практику (табл.4) и более 100 генно-инженерных лекарственных веществ находятся на стадии клинического изучения. Среди них лекарства, излечивающие артрозы, сердечно-сосудистые заболевания, некоторые опухолевые процессы, и, возможно, даже СПИД.

Неблагоприятная экологическая обстановка и целый ряд других подобных причин приводят к тому, что все больше детей рождается с серьезными наследственными дефектами. В настоящее время известно 4000 наследственных заболеваний, для большинства из которых не найдено эффективных способов лечения.

Генные инженеры уже внесли свой вклад в решение этой проблемы, разработав диагностические препараты, позволяющие обнаружить генетические аномалии в период беременности, что дает возможность предотвратить рождение больного ребенка, страдающего физическими и умственными нарушениями, которые могут привести к ранней смерти ребенка.

Ученые используя достижения генной инженерии поставили цель разработать методы исправления генетических повреждений путем введения в организм "здоровых" генов. В 1989 г. в США впервые была предпринята попытка провести в клинической практике **генотерапию** для лечения заболевания «тяжелый комбинированный иммунодефицит» (ТКИД).

В настоящее время генотерапия ТКИД проходит завершающую стадию клинических испытаний. Исследования ведутся очень интенсивно, хотя до реализации программы лечения для большинства наследственных заболеваний предстоит еще длинный и многотрудный путь. Возможность излечения таких заболеваний путем введения нормальных генов - это такая благодарная задача, что в некоторых странах исследования в области генотерапии считаются наиболее приоритетными и финансируются в первую очередь.

В таблице приведены названия белков, которые получены генно-инженерными способами и с успехом применяются в практической медицине.

Таблица.6

Генно - инженерные препараты, используемые в медицине

| Белок | Применение в медицине |
|---|---|
| Адренокортикотропный гормон | Ревматизм |
| Альфа ₁ - антитрипсин | Эмфизема |
| Гемоглобин | Анемия |
| Гормон роста (соматотропин) | Задержка роста |
| Инсулин | Сахарный диабет |
| Интерлейкины | Злокачественное новообразование, иммунные заболевания |
| Интерфероны (α , β , γ) | Вирусные заболевания, злокачественное новообразование |
| Кальцитонин | Остеомаляция |
| Лимфотоксин | Злокачественное новообразование |
| Релаксин | Роды |
| Рецептор интерлейкина - 1 | Астма, ревматоидный артрит |
| Соматолиберин | Задержка роста |
| Соматомедин С | Задержка роста |
| Сывороточный альбумин | Дефицит белков плазмы |
| Тиреотропный гормон | Рак щитовидной железы |
| Тканевой активатор плазминогена | Тромбообразование |
| Тромбоцитарный фактор роста | Атеросклероз |
| Урогастрон | Язвы |
| Урокиназа | Тромбообразование |
| Фактор, активирующий макрофаги | Злокачественное новообразование |
| Фактор некроза опухоли | Злокачественное новообразование |
| Фактор роста нервов | Повреждение нервной ткани |
| Фактор роста эпидермиса | Ожоги |
| Фактор VIII | Гемофилия |
| Фактор IX | Гемофилия |
| Факторы роста В-лимфоцитов | Иммунные заболевания |
| Хорионический гонадотропин | Женское бесплодие |
| Эндорфины и энкефалины | Боль |
| Эритропоэтин | Анемия, заболевания почек |

Генетическая трансформация. Методами генетической инженерии можно не только получать отдельные генные продукты, но и конструировать клетки и даже целые организмы. Первая такая попытка была сделана американским ученым Дж. Гордоном в 1980 году: методом микроинъекции в оплодотворенную яйцеклетку мыши была введена рекомбинантная плазида рBR322, которая содержала ген тимидинкиназы вируса герпеса и фрагмент генома вируса SV40, вызывающего опухолевую трансформацию. В дальнейшем, в геном мыши и других животных, удалось ввести гены ин-

терферонов, гормона роста человека и др. Такие животные получили название **трансгенных**.

Получены популяции трансгенных лососей, в которых масса тела годовалых особей в 10 раз больше чем у обычных рыб. Кроме того, генетически трансформированные животные могут быть использованы как «биофабрики» по производству молока, в котором много белков человека, необходимых для лечения ряда заболеваний. Получены линии трансгенных свиней, у которых накапливается в крови гемоглобин человека.

Получение трансгенных животных (генетическая трансформация) это сложный процесс, так интеграция чужеродных генов носит случайный характер и могут повреждаться соседние гены реципиента, расположенные вблизи участка внедрения чужеродной ДНК.

Получение трансгенных растений. Этот метод имеет огромное значение для увеличения пищевых ресурсов человека. По данным ЮНЕСКО к 2050 году население Земли будет составлять 11 млрд. Традиционными способами нельзя будет обеспечить рост продовольствия, поэтому надежды связаны с генно-инженерными биотехнологиями. Важным преимуществом растений по сравнению с животными является способность их клеток и протопластов развиваться в целое растение - **тотипотентность**, что, естественно используется в работах по получению трансгенных растений. Генетическая трансформация растений может осуществляться либо векторным способом (с использованием агробактерий и вирусов, рис. 60), либо путем прямого переноса генов.

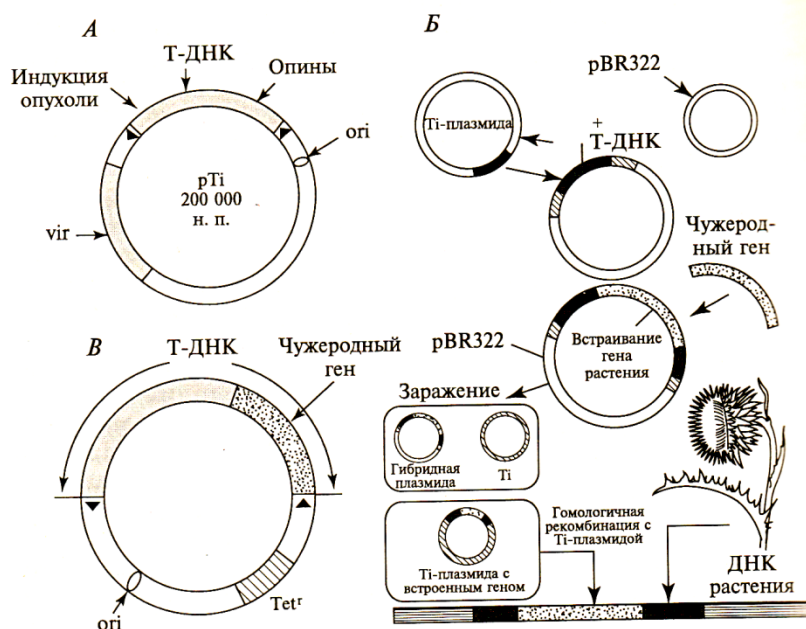


Рис. 60. Использование Ti- плазмиды в качестве вектора для переноса генов в растительные клетки (по Я.И. Бурьянову, 1999): А - строение Ti-плазмиды: *vir* - область вирулентности; треугольниками показаны прямые повторы длиной 25 н.п., между которыми можно вставлять нужный ген; *ori* - точка начала репликации; Б - получение челночного вектора, который служит для переноса генов в растительные клетки; В - челночный вектор на основе T-ДНК и R - плазмиды *E. coli*; *Tet^r* - ген устойчивости к тетрациклину; - точка начала репликации плазмиды с широким кругом хозяев

При повышении эффективности выращивания культурных растений реализуются два взаимодополняющих момента: улучшаются пищевые качества, повышается устойчивость к биотическим и абиотическим факторам внешней среды. Клонирование и введение генов запасных белков злаковых растений значительно обогащает аминокислотный состав зерна. Получены трансгенные растения устойчивые к насекомым вредителям, фитопатогенам, вирусным заболеваниям. Антивирусный эффект у растений можно вызвать введением в их геномы генов человеческих интерферонов. Таким образом, генная инженерия создала основу для современной биотехнологии, которая базируется на использовании живых клеток микроорганизмов, дрожжей, культурах клеток животных и высших растений. В биотехнологических работах принципиально важное значение имеют три момента оперирования с генами: репликация, рекомбинация и экспрессия генетического материала.

В заключение следует сказать несколько слов о перспективах генной инженерии. На основе детального анализа возможностей и достижений генной инженерии составлены научные прогнозы на XXI век. Высказаны, например, надежды, что будут определены гены, которые связаны со злокачественными новообразованиями, установлены механизмы возникновения всех видов рака, завершена разработка препаратов, предотвращающих рак.

Таким образом, XXI век должен стать веком молекулярной биологии и новых биотехнологий, призванных освободить человечество от тяжкого груза болезней, пороков, лишений и заложить основы его будущего процветания (А.С. Коницев, Г.А. Севастьянова, 2005)

РАЗДЕЛ 7. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

На современном этапе генную терапию определяют как введение нуклеиновых кислот, в частности ДНК, в соматические клетки пациентов. Это **соматическая генная терапия**. Целью введения ДНК в эти клетки является либо коррекция имеющегося генетического дефекта, либо придание клетке новых свойств за счет экспрессии терапевтически полезных белков.

Генная терапия-самое молодое направление в медицине. Первые испытания методов генной терапии относятся к 1989 г. В самом начале эта область медицины занималась лечением наследственных заболеваний, но уже в настоящее время она ищет подходы к лечению практически всего спектра болезней, включая так называемые «болезни цивилизации» (рак, атеросклероз, диабет, СПИД и др.).

Выделяют три наиболее важных направления генной терапии. Прежде всего это восстановление утраченных функций. С этой целью в клетки вводят здоровый ген и создают условия для его экспрессии. Второе направление-это модификация клеток организма с целью усилить иммунный ответ на действие инфекции или опухоли. Третье направление подразумевает нормализацию избыточной функции в клетке, например, при инфекции или опухолевом росте. В этом случае введение гена должно привести к подавлению избыточной функции.

Доставка необходимых генов в организм может осуществляться с помощью клеток данного организма, например, стволовых клеток, а также с помощью других систем доставки. Успех генной терапии зависит от того, насколько эффективно пройдет процесс от момента введения трансгена до реализации его биологического эффекта. Системы доставки генетического материала в определенные ткани и клетки получили название **векторы**. Введение соответствующего вектора может быть локальным в виде инъекции в ткани или системным, непосредственно в кровь. Векторы первого поколения использовали природную способность вирусов доставлять генетическую информацию в человеческие клетки. К недостаткам вирусных векторов относится их цитотоксичность и возможность развития иммунной реакции в ответ на его введение. В настоящее время активно разрабатываются невирусные векторы, которые в отличие от вирусных безопасны, не вызывают развития иммунного ответа, поэтому их можно использовать неоднократно. Производство невирусных векторов простое и дешевое, в них можно встроить гены больших размеров. К недостаткам можно отнести более низкую по сравнению с вирусами способность к внедрению ДНК в клетку и ядро. Невирусные векторы доставляют в организм физическими методами: прямая инъекция в ткани, электропорация с подключением электрического поля для увеличения проницаемости мембран, бомбардировка частицами золота или вольфрама, покрытыми плазмидной ДНК. Химические методы доставки генов используют упаковку ДНК путем ее конденсации с липидами, белками, искусственными полимерами.

Особое внимание привлекает возможность использовать для доставки генетического материала модифицированные стволовые клетки. Генетически модифицированные стволовые клетки в настоящее время проходят тестирование на пригодность для генной терапии СПИДа, болезни Паркинсона и др.

Для того, чтобы уменьшить побочные эффекты и увеличить терапевтическое воздействие, важно направить гены к строго определенному типу клеток. Эта адресная доставка терапевтического гена получила название **таргетинг**. Таргетинг может быть физический, биологический и транскрипционный. Примером физического таргетинга является введение генов в определенные зоны циркуляции с помощью катетера. Гены можно вводить в питающие артерии сердца, конечностей, печени, а также внутримышечно, подкожно или непосредственно в опухоль. Биологический таргетинг использует модификации белков вирусной оболочки или поверхности синтетических векторов (например, липосом). В качестве лигандов широко используют антитела. Искусственно реконструированное антитело присоединяет дополнительные сигнальные последовательности, которые будут направлять его в различные компартменты клетки: ядро, ЭПС, цитозоль и так далее. При транскрипционном таргетинге в векторы встраиваются специфические промоторы, которые позволяют экспрессировать ген только в определенной ткани или при определенных условиях (заболеваниях).

Одним из направлений генной терапии является подавление работы «вредного» гена. Такая необходимость возникает, например, при генной терапии рака или СПИДа. Подавление функции какого-либо белка в клетке можно добиться путем введения генно-инженерной конструкции, кодирующей антитело против этого белка. Другой подход основан на подавлении эффектов гена на уровне мРНК. При этом в клетку вводятся конструкции, приводящие к синтезу РНК, комплементарной мРНК вредного гена. Такая РНК называется антисмысловой. Подобные РНК связываются со смысловыми РНК и нарушают их способность служить в качестве матрицы для синтеза соответствующего белка. Кроме этого весьма перспективным направлением генной терапии является создание рибозимов, которые специфически могли расщеплять заданную РНК. Рибозим-это катализатор, и его нужно совсем немного для расщепления большого количества РНК.

Еще одним подходом в генной терапии является использование антисенс олигонуклеотидов. Это олигонуклеотиды, комплементарные определенной матричной РНК, которые специфически связываются с ней и ингибируют ее трансляцию. Такие олигонуклеотиды могут выключать из работы матричные РНК вирусов, РНК онкогенов. Они, благодаря содержанию в своем составе серы, обладают большой устойчивостью к разрушительному действию ферментов в организме.

Генная терапия представляет широчайшие возможности в плане лечения огромного числа заболеваний, но она еще очень несовершенна и далека от широкого практического использования. Несмотря на возможные

осложнения и высокую стоимость научных исследований и испытаний, генная терапия продолжает разрабатываться и совершенствоваться. Остается ожидать, что она оправдает возлагаемые на нее надежды и станет «медициной XXI века».

7.1. Олигонуклеотиды – новый класс синтетических аффинных реагентов

Нуклеиновые кислоты играют важную роль в сохранении и реализации генетической информации. Однако в последние десятилетия особое внимание стали уделять изучению **функциональных нуклеиновых кислот**, к которым относятся оцДНК(одноцепочечная ДНК) или РНК со специфическими биологическими функциями, формирующие трехмерные структуры и способные связываться с различными мишенями.

Среди функциональных нуклеиновых кислот выделяют две наиболее важные группы – рибозимы и аптамеры. Рибозимы и дезоксирибозимы – ферменты, катализирующие специфические химические реакции.

Аптамеры – аналоги белковых антител, представляющие собой олигонуклеотиды, связывающиеся со специфическими лигандами. Одной из основных причин, по которым нуклеиновые кислоты начали широко использоваться в научных исследованиях, является то, что их можно легко синтезировать, амплифицировать и модифицировать.

Аптамеры представляют собой новый класс синтетических аффинных реагентов на основе олигонуклеотидов, которые получают с помощью процедуры селекции *in vitro* или *in vivo*. Впервые они были получены тремя независимыми исследовательскими группами в 1990 году (Ellington A.D., 1990; Robertson D.L., 1990; Tuerk C., 1990). Благодаря уникальным вторичным и третичным структурам, аптамеры обладают высокой селективностью и аффинностью к своим мишеням.

По своей химической природе аптамеры представляют собой короткие одноцепочечные фрагменты ДНК либо РНК длиной от 30 до 80 нуклеотидов, формирующие трехмерные структуры и связывающиеся с лигандами за счет комплементарных взаимодействий. Каждый олигонуклеотид имеет константные области, необходимые для посадки праймеров при амплификации, состоящие из 20 нуклеотидов, и область случайных нуклеотидных последовательностей.

Функционально аптамеры являются аналогами белковых антител, обладающих в силу своих физико-химических свойств и способа получения рядом преимуществ: высокой специфичностью, стабильностью, слабой иммуногенностью. Различия между аптамерами и антителами представлены в таблице 6.

Практических приложений для использования аптамеров множество. Наиболее важные из них можно подразделить на следующие группы:

1. аптамеры для диагностики (аналоги антител);
2. аптамеры для терапии (лекарственные препараты, средства доставки лекарств к мишени);

3. аптамеры для управления клеточными процессами;
4. аптамеры для выделения и очистки белков и пептидов;
5. аптамеры, как инструменты для исследований клеточной сигнализации.

Таблица 6

Различия между аптамерами и антителами

| Аптамеры | Антитела |
|---|---|
| ДНК/РНК олигонуклеотиды | Белки |
| Длина (15-80 нуклеотидов, 5-25 кДа) | Молекулярная масса (150 кДа) |
| Стабильны | Нестабильны |
| Синтезируются химически | Невозможно искусственно синтезировать. Для получения необходимы животные. |
| Легко модифицируются | Не модифицируются |
| Слабо иммуногенны | Иммуногенны |
| Высоко чувствительны к молекулярным мишеням | Высоко чувствительны к молекулярным мишеням |

Использование аптамеров в качестве диагностических средств

Наибольший интерес связан с применением аптамеров (рис. 61) для создания диагностических тест-систем. В 2009 году рынок диагностических аптамеров составил 26 млн. долларов, предполагают, что к концу 2014 года он возрастет до 659 млн. долларов с ежегодным приростом до 124 % (National Resistance Alert 3 ADDENDUM, 2013). Хотя первые разработки в области аптамеров касались в основном терапевтических средств, в ближайшие годы прогнозируется рост средств диагностики с помощью аптамеров.

В качестве диагностических молекул аптамеры имеют ряд существенных преимуществ по сравнению с классической основой современных диагностикумов – антителами. При сходном или даже более высоком уровне специфичности они обладают не менее высокой аффинностью, однако отбор аптамеров не требует продолжительных этапов подготовки антигена, иммунизации, получения гибридомных клонов. Степень разнообразия синтетических библиотек ДНК-аптамеров в настоящее время очень высока. Аптамеры намного дешевле в производстве, чем антитела, химический синтез аптамеров позволяет вводить в них любые метки. Кроме того, аптамеры стабильны. Важным преимуществом использования аптамеров для разработки диагностикумов является высокая чувствительность детекции, достигающаяся, в частности, технологией иммуно-аптамерного ПЦР в режиме реального времени.

В качестве примера рассмотрим метод легкого и быстрого обнаружения малых количеств кокаина. В случае с детектированием кокаина иссле-

дователи остановили свой выбор на двухцепочечных ДНК-аптамерах. В отсутствие лиганда такой аптамер представляет собой две отдельные молекулы ДНК. Добавление даже малых «доз» кокаина приводит к формированию двухцепочечных комплексов аптамера с лигандом. Известна способность золотых наночастиц связывать одноцепочечную ДНК, при полном отсутствии сродства к двухцепочечной ДНК. В отсутствие кокаина наночастицы золота будут связываться с ДНК, а при его появлении и образовании комплекса двухцепочечного аптамера с лигандом – высвободятся. Так как золотые частицы размером 13 нм имеют синий цвет в свободном состоянии, и розовый – в случае связывания с одноцепочечной ДНК, то различия в цвете видны невооруженным глазом. Такой тест позволяет определять присутствие кокаина в концентрациях около 20 мкМ, причем на анализ требуется всего несколько минут.

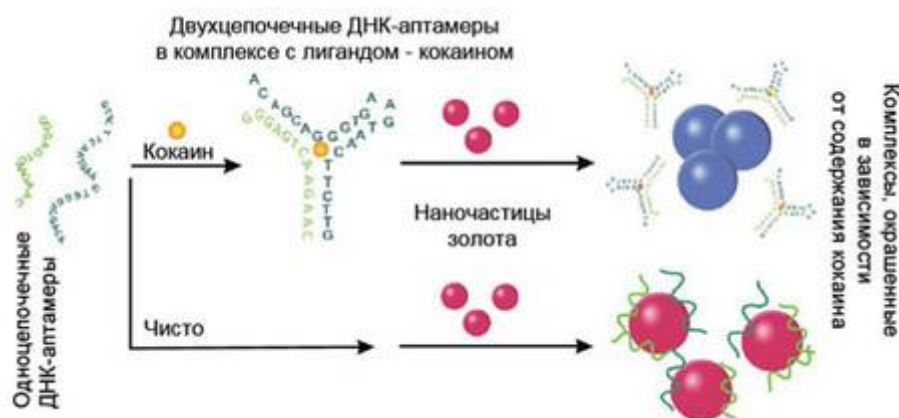


Рис. 61. Использование аптамеров для тестирования наркотиков в крови.

Таблица 7

Сравнение традиционных методов диагностики и инновационных методов, основанных на применении аптамеров (Красноярск, ООО «АптаМир»)

| Традиционная (сальмонеллез) | Аптамеры (сальмонеллез) |
|---|--|
| Диагностика 4-5 дней | Диагностика 15-30 минут |
| Низкая чувствительность, [С] возбудителя 10 ⁴ на 1 мл. пробы | Высокая чувствительность, [С] возбудителя 10 ² на 1 мл. пробы |
| Трудоемкий процесс определения (4 стадии, стоимость 250 рублей) | Простота диагностики (1 стадия, стоимость 130 рублей) |
| Традиционная (рак легкого) | Аптамеры (рак легкого) |
| Позднее выявление IV стадия | Выявление на любой стадии |
| Несколько стадий диагностики | Точный результат в один этап |
| Время диагностики до нескольких месяцев | Время диагностики 15-30 минут |

На сегодняшний день создано 250 различных аптамеров использующихся для анализа ионов металлов, органических красителей, лекарственных и наркотических препаратов, аминокислот, кофакторов, антибиотиков и нуклеиновых кислот. Эти аптамеры способны отличить даже хирально-

сти молекул и вторичные структуры белков. Распознавание аналита аптамером должно проводиться в непосредственной близости от поверхности преобразователя сигнала. Таким образом, аптамер должен быть иммобилизован непосредственно на поверхности датчика. По аналогии с иммуносенсорами и ДНК-чипами аптасенсоры действуют на основе:

1. конкурентных или сэндвич-анализов с флуорофорами, ферментами или окислительно-восстановительными метками;
2. изменения проницаемости для электрохимического датчика (например, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$);
3. изменения доступности меток или маркеров (например, интеркаляторы, наночастицы);
4. безметочной оценки изменений состояния слоя распознавания на основе аптамеров при связывании с ним аналитов с помощью полевых транзисторов, измерения потенциала, емкости и импеданса.

Датчики на основе аптамеров имеют несколько особенностей:

1. аналит при связывании с аптамерами может вызвать резкие конформационные изменения олигонуклеотида, которые могут привести к нестандартной флуоресценции или неожиданному изменению электрохимических сигналов;
2. использование аптамеров, в отличие от антител, позволяет осуществлять регенерацию датчика и даже делает его пригодным для "Онлайн измерений".

Вопросы и упражнения для самоподготовки и контроля усвоения темы

1. Дайте определение генетической рекомбинации, укажите ее виды.
2. Перечислите теоретические предпосылки появления генной инженерии.
3. Практическое использование достижений генной инженерии (генотерапия, генетическая трансформация).
4. Генодиагностика и перспективы ее использования в медицине.
5. Основные направления генной терапии.
6. Векторы и таргетинги виды и способы их реализации при генотерапии.
7. Общая характеристика аптамеров и их преимущества перед белковыми антителами.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Адаптор – молекула тРНК, транспортирующая аминокислоты к информационной РНК (мРНК) при трансляции.

Активация аминокислоты - процесс образования аминоацил-тРНК.

Акцепторная точка сплайсинга – участок ДНК между правым концом интрона и левым концом экзона.

Акцепторный конец тРНК – короткий дуплекс в составе тРНК, заканчивающийся последовательностью ССА, к которой присоединяется аминокислота.

Аминоацил-тРНК – транспортная РНК, несущая аминокислоту.

Аминоацил-тРНК – транспортная РНК, несущая аминокислоту.

Аминоацил-тРНК-синтетаза – фермент, осуществляющий ковалентное присоединение аминокислоты к 2' - или 3' - ОН концам тРНК.

Аминоацильный центр рибосомы – участок рибосомы, к которому присоединяется аминоацил-тРНК, если антикодон этой РНК комплементарен кодону мРНК, находящемуся в аминоацильном центре.

Антикодон – триплет тРНК, комплементарный кодону мРНК; их взаимодействие в процессе трансляции определяет место аминокислоты в полипептидной цепи.

Антипараллельные цепи двойной спирали – противоположная ориентация цепей ДНК, так что 5'-конец одной цепи взаимодействует с 3'-концом другой цепи.

Аутосинтетическая функция ДНК – способность ДНК контролировать собственную репликацию, благодаря наличию в ней генетической информации, обеспечивающей осуществление всех необходимых процессов и механизмов для синтеза комплементарной молекулы.

Биохимическая генетика – раздел генетики, изучающий механизмы генетического контроля метаболизма химических соединений и других биохимических процессов в течение жизненного цикла организмов.

Бреши – это отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в одной из цепей дочерней ДНК.

Ведущая цепь ДНК – одна из дочерних цепей, синтезируемая непрерывно в направлении $5' \rightarrow 3'$.

Ген – ограниченный участок геномной ДНК (или РНК у некоторых вирусов), отвечающий за определенную и специфическую функцию. Гены делятся на структурные и функциональные.

Генетический код – система записи генетической информации в ДНК или мРНК в виде определенной последовательности нуклеотидов.

Генная инженерия – раздел молекулярной биологии и генетики, предметом которого является создание организмов и структур с определенной генетической программой.

Генная мутация - мутация, при которой происходит изменение структуры отдельного гена.

Геном – полный набор последовательностей генетического материала организма. Кроме последовательностей всех хромосом включает в себя последовательности ДНК органелл.

Ген-оператор – участок оперона или транскриптона, обеспечивающий доступ РНК-полимеразы к структурным генам путем взаимодействия с регуляторными белками.

Ген-регулятор – ген, ответственный за синтез белка-репрессора, посредством которого регулируется работа оперона или транскриптона.

Гены репликации – гены, содержащие сайты, отвечающие за начало и конец репликации ДНК.

Гистоны – низкомолекулярные высококонсервативные белки, богатые основными аминокислотами, содержащиеся в ядре и участвующие в упаковке ДНК.

Двунаправленная репликация – репликация, при которой с ориджина в противоположных направлениях стартуют две репликативные вилки.

Дезоксирибонуклеаза – фермент, атакующий связи в ДНК, при этом может разрезать одну цепь или обе цепи дуплекса.

Дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК – высокополимерное природное соединение, содержащееся в ядрах клеток всех живых организмов, носитель генетической информации; отдельные участки ДНК соответствуют определенным генам.

ДНК-лигаза – фермент, образующий связь между смежными (3'-ОН и 5'-Р) концами одноцепочечного разреза в цепи ДНК.

ДНК-полимераза – фермент, синтезирующий дочернюю цепь ДНК.

ДНК-праймаза – фермент, синтезирующий в процессе инициации репликации РНК-затравку.

ДНК-связывающие белки (SSB-белки) – белки прокариот, кооперативно связывающиеся с ДНК и сохраняющие ее в растянутом состоянии.

ДНК-топоизомераза – ферменты, обеспечивающие релаксацию сверхспиральной ДНК, снимающие ее внутреннее напряжение путем внесения одно- и двухцепочечных разрывов с последующим их восстановлением.

ДНК-хеликаза – ДНК-зависимая АТФ-аза, использующая энергию гидролиза АТФ для расплетения двойной спирали ДНК в процессе репликации.

Затравка (или праймер) – короткая одноцепочечная ДНК или РНК, взаимодействующая с комплементарной одиночной цепью ДНК.

Индуктор – небольшая молекула, которая запускает транскрипцию генов, связываясь с белком-регулятором.

Инициация – начальные этапы транскрипции вплоть до образования первой связи в РНК. К инициации относится связывание РНК-полимеразы с промотором и плавление короткого участка ДНК на одиночные цепи

Иницирующий кодон – особый кодон (обычно АУГ), с которого начинается синтез белка.

Интрон – сегмент гена, который транскрибируется, но впоследствии исключается из транскрипта во время сплайсинга, когда экзоны смыкаются друг с другом.

Кодирующая цепь ДНК – по своей последовательности идентична мРНК.

Кодон – триплет нуклеотидов, транслируемый как конкретная аминокислота или как сигнал терминации.

Корепрессор – небольшая молекула, которая связывая белок-регулятор, запускает репрессию транскрипции.

Кэп – специфическая структура на 5'-конце многих мРНК эукариот (метилованный гуанозин).

Кэпирование – образование на 5'-конце мРНК эукариот особой структуры – кэпа (шапочки), необходимой для прикрепления мРНК к рибосоме.

Малая субъединица рибосомы – связывающая мРНК субъединица рибосомы с коэффициентом седиментации 30S (для бактерий) или 40S (для эукариот).

Малые ядерные РНК (мяРНК) – малые РНК, обнаруженные только в ядре. Некоторые из мяРНК участвуют в процессах сплайсинга и ряде других реакций процессинга РНК.

Матричная РНК (мРНК) – РНК, в последовательности нуклеотидов которой содержится информация о синтезе специфического белка.

Моноцистронная мРНК – РНК, кодирующая один белок.

Нуклеазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие реакции расщепления фосфодиэфирных связей в полинуклеотидной цепи нуклеиновых кислот с образованием моно- и олигонуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты – биологические полимеры, мономерами которых являются нуклеотиды, связанные между собой фосфодиэфирными связями. Различают два вида нуклеиновых кислот: ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота и РНК- рибонуклеиновая кислота.

Нуклеосома – основная структурная единица хроматина, состоящая из ДНК и октамера гистонов.

Обратная транскрипция – синтез ДНК на матрице РНК при участии фермента обратной транскриптазы.

Оператор – сайт ДНК, с которым связывается белок- репрессор, чтобы помешать инициации транскрипции с близлежащего промотора.

Оперон - единица экспрессии и регуляции бактериальных генов; помимо структурных генов, включает в себя контрольные элементы, узнаваемые продуктами генов регуляторов.

Ориджин – последовательность ДНК, на которой иницируется репликация.

Отстающая цепь – цепь ДНК, в процессе репликации синтезируемая прерывисто в виде коротких фрагментов (фрагменты Оказаки), которые затем ковалентно соединяются между собой.

Пептидил-трансфераза – фермент большой субъединицы рибосом, представленный рРНК, который синтезирует образование пептидной связи в растущей полипептидной цепи.

Первичный транскрипт - исходный немодифицированный продукт транскрипции РНК.

Полиаделирование - ферментативное присоединение остатков адениловой кислоты к 3'-концу молекулы эукариотической мРНК после завершения ее синтеза под действием фермента поли (А)-полимеразы, использующей АТФ в качестве субстрата.

Полирибосома – мРНК, транслируемая одновременно несколькими рибосомами.

Полуконсервативная репликация – расхождение двойной спирали ДНК на полинуклеотидные цепи, на которых осуществляется сборка комплементарных им полинуклеотидных цепей. В итоге из одной материнской ДНК образуются две дочерние, каждая из которых содержит родительскую цепь и цепь, синтезированную заново.

Праймаза – разновидность РНК-полимеразы, синтезирующей короткие фрагменты РНК, предназначенные для использования в качестве затравок при репликации ДНК.

Прайсосома - комплекс белков, принимающих участие в иницировании синтеза фрагментов Оказаки в процессе прерывистой репликации ДНК.

Прерывистая репликация – синтез ДНК на отстающей цепи репликативной вилки путем образования коротких фрагментов (фрагментов Оказаки), которые затем соединяются в единую полинуклеотидную цепь ДНК-лигазой.

Пре-мРНК – ядерный транскрипт, подлежащий процессингу – будущая мРНК.

Промотор – участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза для инициации транскрипции.

Процессинг РНК изменения, происходящие с РНК после транскрипции (модификация 5' и 3'-концов, метилирование внутренних сайтов, сплайсинг).

Репликативная вилка – часть молекулы ДНК, которая расплетена и в данный момент служит матрицей для синтеза дочерней ДНК.

Репликационный глазок – область реплицирующей ДНК внутри протяженного нереплицирующегося района.

Репликация ДНК – синтез двух новых цепей, комплементарных родительским, обеспечивающий точное копирование генетической информации и передачу ее от поколения к поколению.

Репликон - единица генома, в котором реплицируется ДНК; содержит ориджин инициации репликации.

Реплисома - мультиферментный комплекс, формирующийся в бактериальной репликативной вилке для осуществления синтеза ДНК.

Репрессор – белок, который ингибирует экспрессию гена.

Рибонуклеаза H – фермент гидролаза, катализирующая гидролиз цепи только РНК в дуплексе РНК/ДНК.

Рибосома – крупное образование, состоящее из РНК и белков, которое осуществляет синтез белка на матрице мРНК. Бактериальные рибосомы имеют коэффициент седиментации 70S, эукариотические рибосомы - 80S. Рибосома состоит из двух субъединиц.

Рибосомальная РНК – главный компонент рибосомы, входящий в состав двух субъединиц.

РНК-лигаза – фермент, участвующий в сплайсинге тРНК, образующий фосфодиэфирную связь между экзонами.

РНК-полимеразы – ферменты, синтезирующие РНК на матрице ДНК.

Сигма-фактор (δ) - субъединица бактериальной РНК-полимеразы, необходимая для инициации; имеет огромное влияние на выбор промотора.

Сплайсинг РНК – этап процессинга транскриптов, при котором происходит вырезание интронов и соединение экзонов в непрерывную мРНК.

Сплайсосома – комплекс, формируемый рибонуклеопротеинами (в состав входят мРНК) и наряду с другими белковыми факторами участвующий в сплайсинге.

Стоп-кодон (нонсенс кодон) – один из трех триплетов (УАГ, УАА, УГА), вызывающих терминацию синтеза белка.

Транскрипт - РНК, продукт копирования одной из цепей ДНК, который нуждается в процессинге для превращения в зрелую мРНК.

Транскриптон - единица транскрипции, участок ДНК, на котором идет синтез определенных РНК.

Транскрипция – биосинтез РНК на матрице ДНК.

Транслокация рибосомы – перемещение рибосомы на один кодон по матрице мРНК после добавления очередной аминокислоты к синтезируемому полипептиду.

Трансляция – синтез белка на матрице мРНК.

Транспортная РНК – посредник при синтезе белков, переносит ковалентно присоединенную аминокислоту и содержит в своем составе антикодон, комплементарный кодону мРНК.

Фрагменты Оказаки – короткие отрезки ДНК (по 1000-2000 нуклеотидов каждый) – промежуточный продукт полунепрерывной репликации отстающей цепи.

Хеликаза – фермент, разделяющий цепи ДНК при участии энергии АТФ.

Холофермент РНК-полимеразы – РНК-полимераза, состоящая из четырех субъединиц основного фермента ($\alpha_2 \beta \beta'$) и фактора δ .

Шапероны – класс белков, связывающих незрелые белки для того, чтобы помочь их созреванию.

Экзон - сегмент прерывистого гена, представленный в зрелой мРНК.

Элонгация - стадия синтеза, на которой нуклеотидная или полипептидная цепочка удлиняются за счет добавления новых субъединиц.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Биологическая химия с упражнениями и задачами / под ред. С. Е. Северина. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2012. – 612 с.

Дополнительная литература

1. Льюин Б. Гены: пер. с англ. / Б. Льюин. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с.
2. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: пер. с англ. В 3 т. Т 2 / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 682 с.
3. Спирин А.С. Молекулярная биология. Рибосомы и биосинтез белка: /А.С.Спирин. – М.: Академия, 2011. – 513 с.
4. Эллиот В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М.: Изд – во РАМН, 2000. – 585 с.
5. Коничев А.С. Молекулярная биология: / А.С.Коничев, Г.А.Севастьянова. – М.: АСАДЕМА, 2005. – 396 с.
6. Нуклеиновые кислоты / под ред. С. Мюллер; пер. с англ. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 413 с.
7. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. / под ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер; пер. с англ. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 848 с.
8. Таганович А.Д. Патологическая биохимия: /А.Д.Таганович, Э.И.Олецкий, И.Л.Котович. – М.: Бином Лаборатория знаний, 2013. – 448 с.
9. Кнорре Д.Г. Биологическая химия: /Д.Г.Кнорре, С.Д.Мызина. – М.: наука, 2002. – 479 с.

Приложение 1.

Азотистые основания - производные ароматических гетероциклических соединений - пурина и пиримидина. В состав нуклеиновых кислот входят два производных пурина - аденин и гуанин, и три производных пиримидина - цитозин, урацил и тимин (рис.1). Все пять азотистых оснований называются главными (мажорными).

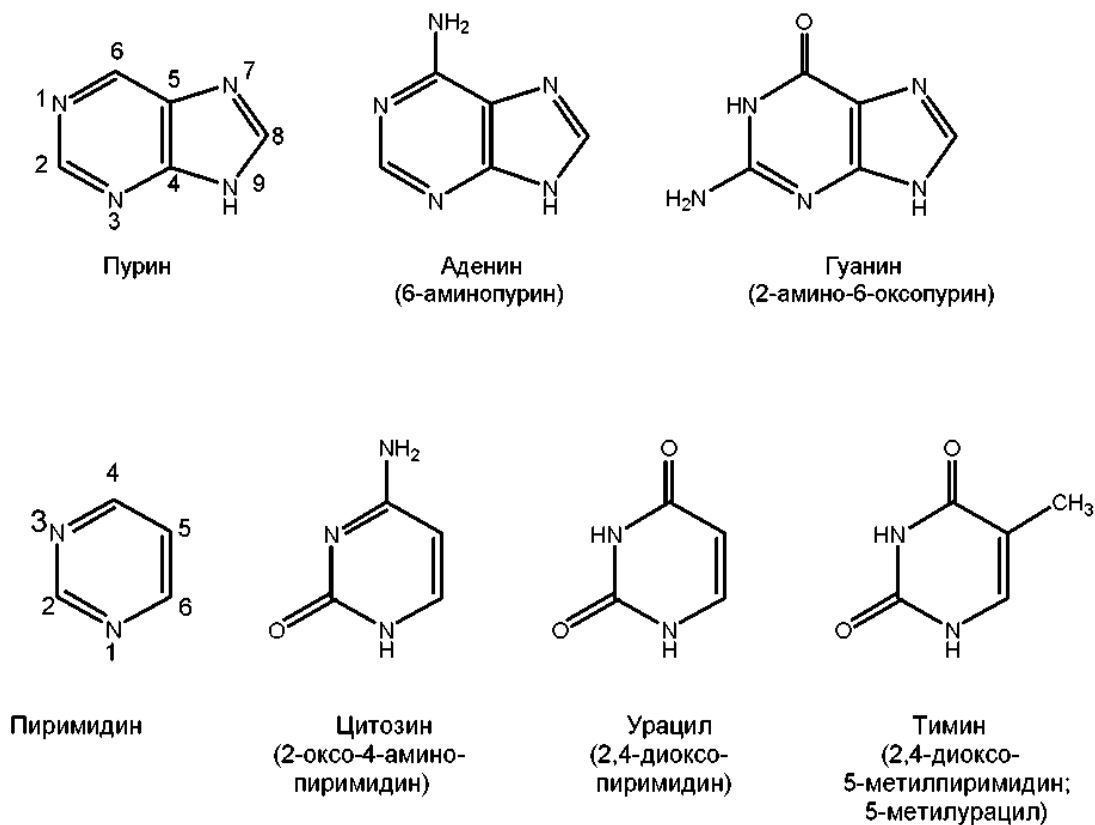


Рис. 1. Основные азотистые основания

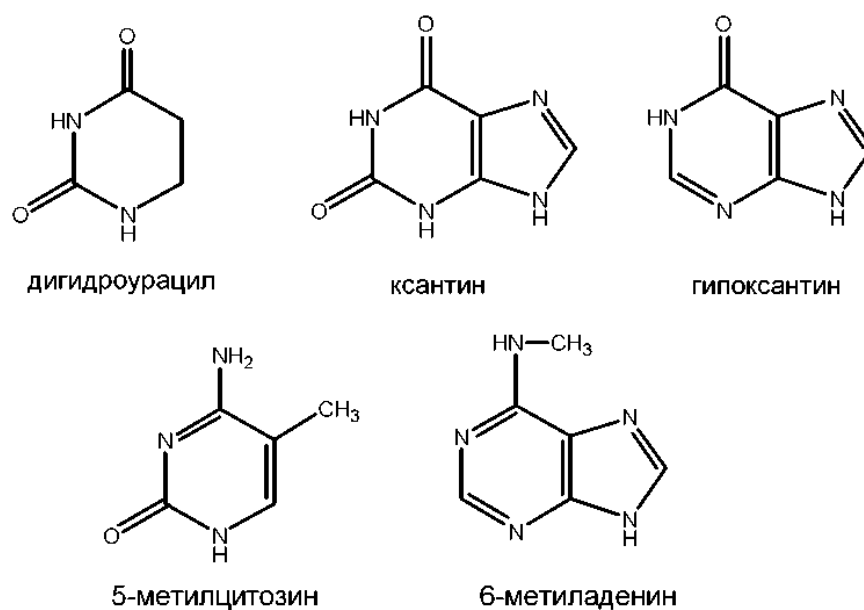


Рис. 2. Минорные азотистые основания

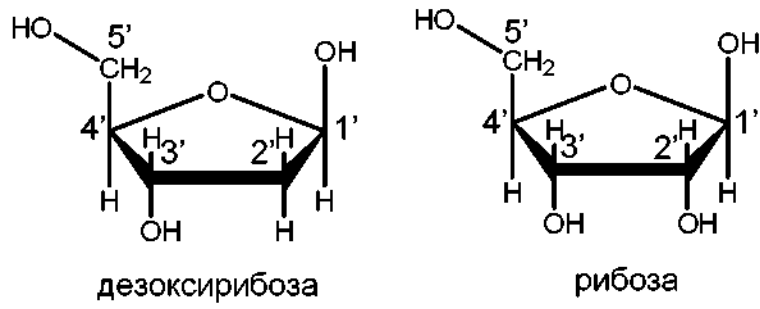


Рис. 3. Углеводные компоненты нуклеотидов

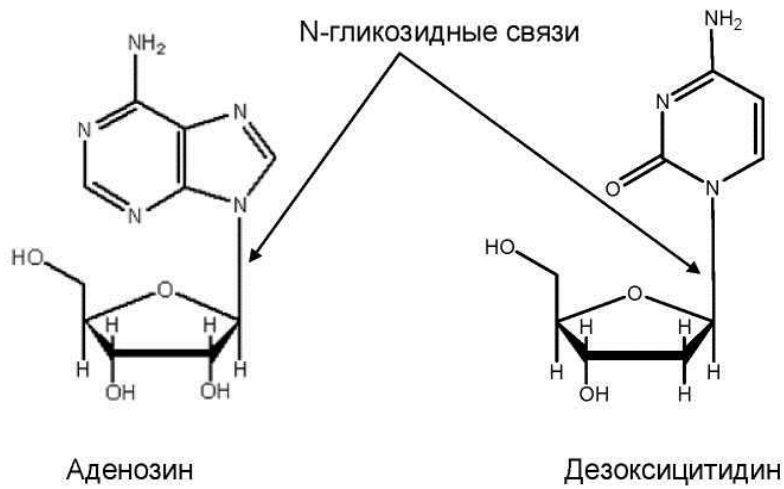


Рис. 4. Образование гликозидной связи между азотистым основанием и углеводным компонентом

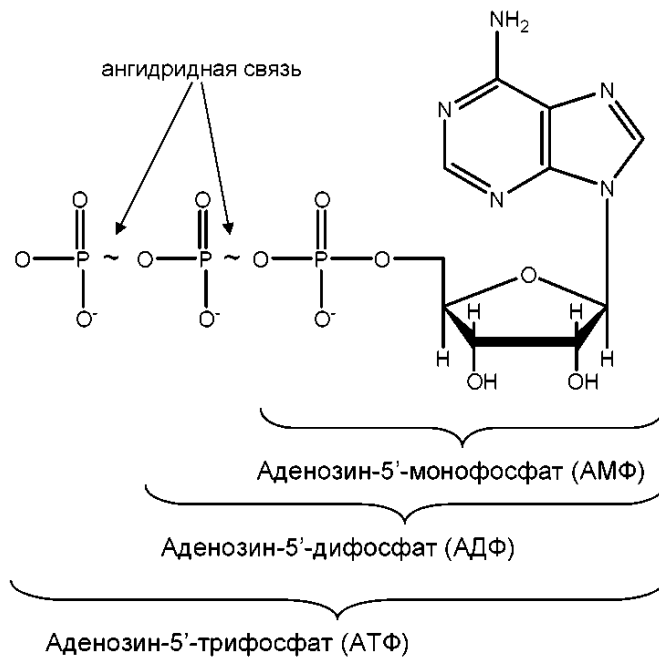


Рис. 5. Структура АМФ, АДФ и АТФ

