

Учреждение образования «Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Факультет биологический
Кафедра зоологии, физиологии и генетики

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

 — Г.Г. Гончаренко

06/05 2016 г.

СОГЛАСОВАНО

Декан факультета

 В.С. Аверин

06/05 2016 г.

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ПО УЧЕБНОЙ
ДИСЦИПЛИНЕ**

Молекулярная биология

для специальности

1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность)

Рассмотрено и утверждено
на заседании кафедры зоологии, физиологии и генетики
21 марта 2016 г., протокол № 10

Составители:

Г.Г. Гончаренко, член-корр. НАН Б, доктор биологических наук, профессор
Е.М. Курак, ассистент кафедры зоологии, физиологии и генетики

Рассмотрено и утверждено
на заседании научно-методического совета УО «ГГУ им. Ф. Скорины»
11.05. 2016 г., протокол № 6

Содержание учебно-методического комплекса по дисциплине «Молекулярная биология»

Титульный лист.

Содержание.

Пояснительная записка.

1 Теоретический раздел.

1.1 Тексты лекций.

1.2 Глоссарий.

2 Практический раздел.

2.1 Руководство к практическим занятиям.

3 Контроль знаний.

3.1 Перечень вопросов к экзамену.

3.2 Критерии оценок по дисциплине

4 Вспомогательный раздел.

4.1 Учебная программа дисциплины.

4.2 Перечень рекомендуемой литературы.

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Электронный учебно-методический комплекс «Молекулярная биология» рассчитан на студентов 3 курса биологического факультета, изучающих дисциплину «Молекулярная биология».

Подготовка высококвалифицированных специалистов-биологов требует овладения ими знаний в различных областях современной биологии. Наиболее развивающейся областью биологической науки в настоящее время является молекулярная биология, занимающая расшифровкой молекулярных основ жизнедеятельности про- и эукариотических организмов. Изучение данной дисциплины – важный этап в подготовке высококвалифицированных специалистов-биологов.

Целью электронного учебно-методического комплекса «Молекулярная биология» является формирование у студентов представлений об основных процессах, протекающих в живой клетке на молекулярном уровне.

В задачи ЭУМК входит изучение молекулярных основ жизнедеятельности, включая механизмы таких процессов как репликация, транскрипция, трансляция, репарация и рекомбинация ДНК и др. Полученная студентами информация позволит им более глубоко понимать современные проблемы и достижения биологии, а также подготовит к восприятию новых сведений по различным аспектам регуляции метаболизма в прокариотических и эукариотических клетках и осуществлению направленного генно-инженерного конструирования организмов.

ЭУМК построен по принципу совместной работы с теоретическим материалом и выполнения практических работ. Теоретический материал построен по принципу конспекта лекций по каждой предусмотренной учебной программой курса теме, включая также и темы для самостоятельного изучения. Каждая лекция сопровождается иллюстративным материалом.

Практическое руководство к занятиям содержит практические работы, в которые включены тематика рефератов, практические задания, тесты для самопроверки усвоенных знаний, а также вопросы для самоконтроля, что значительно облегчает восприятие и закрепление нового материала студентами.

В результате изучения учебной дисциплины «Молекулярная биология» студент должен

знать:

- основные характеристики строения и функционирования нуклеиновых кислот;
- основные закономерности протекания матричных процессов в клетке;

- особенности процесса реализации генетической информации у прокариот и эукариот;
- структурные уровни организации белковых молекул;
- закономерности процесса синтеза белка, модификации, фолдинга и транспорта белковых молекул;

уметь:

- использовать терминологию молекулярной биологии и легко оперировать ее терминами;
- использовать знания молекулярной биологии для объяснения процессов, протекающих в живых организмах;
- применять знания о закономерностях молекулярно-биологических процессов при изучении научной литературы по тематике курсовых и дипломных работ, а также при изучении смежных биологических дисциплин.

Материал курса основывается на ранее полученных студентами знаниях по таким дисциплинам, как «Генетика», «Генная инженерия», «Биохимия» и «Микробиология».

Согласно учебной программе, общее количество часов по дисциплине – 136: для студентов 3 курса дневной формы обучения (5 семестр) из них аудиторных – 60 часов: лекционных – 32 часа, практических занятий – 20 часов. Форма отчетности – экзамен; для студентов 4 курса заочной формы обучения (8 семестр) из них аудиторных – 18 часов: лекционных – 10 часов, практических занятий – 8 часов. Форма отчетности – экзамен.

1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1 ТЕКСТЫ ЛЕКЦИЙ

ЛЕКЦИЯ 1. ВВЕДЕНИЕ. ИСТОРИЯ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗВИТИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ.

1. Молекулярная биология как наука
2. История развития молекулярной биологии
3. Задачи современной молекулярной биологии

1. Молекулярная биология как наука

Молекулярная биология - это наука о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации, о структуре и функциях нерегулярных биополимеров - нуклеиновых кислот и белков.

Начав с изучения биологических процессов на молекулярно-атомном уровне, молекулярная биология перешла к сложным надмолекулярным клеточным структурам, а в настоящее время успешно решает проблемы генетики, физиологии, эволюции и экологии.

Молекулярная биология возникла во второй половине XX в. Название этой науки чаще всего связывают с именем У. Эстбюри, который в 1939 г. назвал себя «молекулярным биологом». Через два года он же получил первую рентгенограмму ДНК и тем самым положил начало изучению тонкой структуры «самой главной молекулы», впервые выявленной Ф. Мишером еще в 1869 г. Первое официальное упоминание о молекулярной биологии, вероятно, принадлежит У. Уиверу, руководившему отделом естественных наук Рокфеллеровского фонда, который в 1938 г. написал: «В тех пограничных областях, где *химия и физика* пересекаются с *биологией*, постепенно возникает новый раздел науки — *молекулярная биология*, начинающая приоткрывать завесы над многими тайнами, окутывающими основные элементы живой клетки» (курсив наш. — Авторы).

Таким образом было постулировано возникновение нового направления современной биологии, которое интегрировало усилия биологов, химиков и физиков в области изучения объектов живой природы.

Разработка тонких физических и химических методов анализа структуры и функций молекул, свойственных всем живым системам и прежде всего клетке как элементарной и универсальной составляющей всех организмов, имела определяющее значение для рождения молекулярной биологии. Мощным стимулом для ее развития стали успехи и еще в большей мере нерешенные проблемы биохимии, ци-

тологии и генетики. Эти сформировавшиеся к середине XX в. биологические науки создали почву для молекулярной биологии, которая была призвана заняться изучением жизни на молекулярном уровне.

Центром молекулярно-биологических исследований стали работы в области изучения материальных основ наследственности, природы генов и механизмов передачи наследственных признаков из поколения в поколение.

Именно под влиянием генетиков новой формации (Т. Моргана, Н.К. Кольцова, Н.В. Тимофеева-Ресовского и др.) физики-теоретики и экспериментаторы, эмигрировавшие в конце 30-х годов из Европы в США, организовали там так называемую «фаговую группу» во главе с М. Дельбрюком, которая начала исследования в области молекулярного строения и мутагенеза вирусов и бактериофагов. Позднее эти работы были существенно развиты в нашей стране Б.Ф. Поглазовым, Н.А. Киселевым и другими учеными. Еще раньше В.А. Энгельгардт совместно с М.Н. Любимовой обосновали молекулярные механизмы мышечного сокращения, а А.Н. Белозерский впервые выделил ДНК из растений, что также относится к фундаментальным вехам становления молекулярной биологии. Впоследствии именами этих замечательных ученых были названы крупнейшие научно-исследовательские центры: Институт молекулярной биологии АН СССР им. В.А. Энгельгардта и Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского.

К началу 50-х годов XX в. в недрах биохимии были получены фундаментальные данные об элементарном строении белков и нуклеиновых кислот, включая сведения о способах организации полипептидных цепей белков, и, что особенно важно, о структуре нуклеотидов и закономерностях их количественного содержания в молекулах ДНК и РНК (Э. Чаргафф). Именно указанные работы, а также биофизические исследования структуры ДНК, выполненные в Англии методом рентгеноструктурного анализа Розалиндой Франклин и Морисом Уилкинсом, вплотную подвели воспитанника «фаговой группы» Джеймса Уотсона и английского физика Френсиса Крика к раскрытию молекулярной природы генов и механизма их воспроизведения (репликации) в составе ДНК.

Создание модели двойной спирали ДНК и открытие принципа, комплементарности стали важнейшим событием современной биологии, вскрывшим фундаментальные принципы функционирования живых систем и определившим дальнейшие направления исследований современной биологии. Современное естествознание обязано именно молекулярной биологии тем, что в период с середины 50-х до середи-

ны 70-х годов XX в. с невероятной быстротой были раскрыты природа и основные пути передачи и реализации генетической информации.

2. История развития молекулярной биологии

Основополагающие открытия молекулярной биологии:

1869 — Ф. Фишер (F. Miesher) впервые выделил ДНК из лейкоцитов и молок лосося.

1935 — А.Н. Белозерский выделил ДНК из растений.

1939 — В.А. Энгельгардт открыл АТФазную активность миозина.

1940 — У. Эстбюри (W. Astbury) получил первую рентгенограмму ДНК.

1944 — О.Т. Эвери (O.T. Avery) установил, что ДНК (а не белок, как полагали ранее) является носителем генетической информации.

1951 — Л. Полинг и Р. Кори (L. Pauling, R. Corey) обосновали существование основных типов укладки аминокислотных остатков в полипептидных цепях белков (α -спираль и складчатый β -слой).

1953 — Дж. Уотсон и Ф. Крик (J. Watson, F. Crick) создали модель двойной спирали ДНК на основе рентгенограмм, полученных Р. Франклин и М. Уилкинсом (R. Franklin, M. Wilkins).

1953 — Ф. Сангер (F. Sanger) расшифровал первичную структуру инсулина быка.

1956 — А. Корнберг (A. Kornberg) открыл ДНК-полимеразу.

1957 — А.Н. Белозерский и А.С. Спирин предсказали существование мРНК.

1960 — Дж. Кедрю (J. Kendrew) впервые описал трехмерную структуру миоглобина кашалота, а М. Перутц (M. Perutz) — структуру гемоглобина.

1960 — одновременно в нескольких лабораториях был открыт фермент транскрипции — РНК-полимераза.

1961 — Ф. Жакоб и Дж. Моно (F. Jakob, J. Monod) разработали модель оперона.

1965 — 1967 — Р. Холли (R. Holley) выяснил первичную структуру аланиновой тРНК, а А.А. Баев — валиновой тРНК.

1966 — М. Ниренберг, С. Очоа и Х.-Г. Корана (M. Nirenberg, S. Ochoa, H.-G. Khorana) расшифровали генетический код.

1967 — М. Геллерт (M. Gellert) открыл ДНК-лигазу — фермент, способный соединять фрагменты ДНК.

1970 — Г. Темин и Д. Балтимор (H. Temin, D. Baltimore) открыли обратную транскриптазу (РНК-зависимую ДНК-полимеразу) в онкогенных вирусах.

1972 — П. Бозр, С. Коэн и П. Берг (P. Boyer, S. Cohen, P. Berg) разработали технологию клонирования ДНК, заложили основы генетической инженерии.

1972 — Х.-Г. Корана (H.-G. Khorana) осуществил химический синтез гена аланиновой тРНК.

1975 — 1977 — Ф. Сангер (F. Sanger), а также А. Максам и У. Гилберт (A. Maxam, W. Gilbert) разработали методы быстрого определения первичной структуры ДНК.

1976 — Ф. Сангер (F. Sanger) расшифровал нуклеотидную последовательность ДНК фага φX174.

1976 — У. Гилберт (W. Gilbert) открыл мозаичное строение генов эукариот.

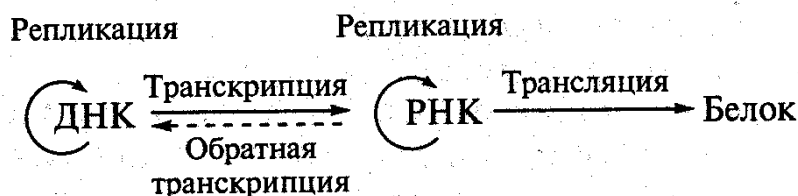
1976 — С. Ким, А. Рич и А. Клут (S. Kim, A. Rich, A. Klug) определили третичную структуру тРНК.

В результате выдающихся открытий Дж. Уотсона, Ф. Крика, Х. - Г. Кораны, А. Корнберга и других крупнейших молекулярных биологов, удостоенных нобелевских премий, уже в середине 60-х годов XX в. окончательно утвердился *основной постулат молекулярной генетики*, формулирующий магистральный путь реализации генетической информации в клетке:

ДНК → РНК → Белок

Затем были детально изучены механизмы воспроизведения (репликации) ДНК, транскрипции (биосинтеза РНК) и трансляции (биосинтеза белка). Параллельно развивались работы по изучению внутриклеточной локализации этих процессов, что привело к осознанию функционального значения внутриклеточных компонентов (ядра, митохондрий, рибосом и др.) и дало основание Дж. Уотсону в 1968 г. для определения молекулярной биологии: «Молекулярная биология изучает связь структуры биологических макромолекул и основных клеточных компонентов с их функцией, а также основные принципы и механизмы саморегуляции клеток, которые опосредуют согласованность и единство всех протекающих в клетке процессов, составляющих сущность жизни».

Впоследствии центральный постулат молекулярной генетики был дополнен представлениями о существовании процесса обратной транскрипции (о биосинтезе ДНК на матрице РНК) и репликации РНК, что позволило придать ему следующий вид:



Одновременно все более детализировались представления о строении и функциях белков, необходимых для катализа (ферменты) и регуляции (регуляторные белки, пептидные гормоны) всех важнейших молекулярно-генетических процессов.

Открытие и разработка методов целенаправленного использования целого ряда ферментов (обратной транскриптазы, ДНК-рестриктаз и др.) привели к созданию технологии получения рекомбинантных ДНК, возникновению генетической инженерии, что стало поистине революционным событием в истории молекулярной биологии.

В конце 70-х и начале 80-х годов XX в. молекулярная биология вступает в период расцвета. В это время выясняются механизмы сплайсинга (В. Келлер и др.), происходит открытие РНК-ферментов (рибозимов) и аутосплайсинга (Т. Чек), активно изучаются механизмы генетической рекомбинации и подвижные генетические элементы (Д. Хогнесс, Г. П. Георгиев), на новый уровень выходят работы в области структуры ферментов и биологических мембран (Ю.А. Овчинников), начинаются работы по расшифровке структуры геномов высших организмов (включая геном человека), создаются основы новых (генно-инженерных) биотехнологии, обнаруживаются и синтезируются каталитически активные антитела (абзимы), возникает белковая инженерия.

Бурное развитие молекулярной биологии привело в начале 80-х годов XX в. к возникновению новой науки — биоинформатики (вычислительной биологии, компьютерной генетики), возникшей на стыке молекулярной генетики и информатики. Толчком к ее возникновению послужило появление быстрых методов определения нуклеотидных последовательностей ДНК, разработанных в 1975 — 1976 гг. Ф. Сангером и А. Коулсоном, а также А. Максамом и У. Гилбертом. В 1982 г. были организованы банки нуклеотидных последовательностей: Gen Bank в США и EMBL в Европе, в которых концентрировалась информация о расшифрованных нуклеотидных последовательностях ДНК различных организмов. Постепенно биоинформатика включилась в разработку ряда важных молекулярно-биологических проблем, включая: статистический анализ нуклеотидных последовательностей ДНК; предсказание функций по первичной структуре биополимеров (ДНК, РНК и белков); анализ (моделирование) пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот; теорию молекулярной эволюции и систематики.

Прогресс в области определения нуклеотидных последовательностей (секвенирования) ДНК различных организмов, достигнутый в

конце XX в. (в 1995 г. был секвенирован первый бактериальный геном, в 1997 г. — геном дрожжей, в 1998 г. — геном нематоды, в 2000 г. — геном дрозофилы и почти полностью — геном человека), привел к возникновению *геномики* — науки, изучающей наборы всех генов данного организма как единое целое. Одновременно возникла *протеомика* — наука, исследующая полные наборы белков, функционирующих на различных этапах развития того или иного организма.

3. Задачи современной молекулярной биологии

В конце XX в. расширяются и становятся все более целенаправленными в научно-практическом отношении задачи молекулярной биологии, среди которых:

- расшифровка 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 болезней, вирусных заболеваний;
- создание новых биотехнологий производства пищевых продуктов и разнообразных биологически активных соединений (гормонов, антигормонов, релизинг-факторов, энергоносителей и др.)

Начало нового тысячелетия ознаменовалось выдающимся событием — расшифровкой нуклеотидной последовательности генома человека, с которой связаны надежды на решение многих проблем человечества (коррекция наследственных заболеваний, продление жизни и т.д.).

Таким образом, по праву считается, что XXI в. должен стать веком молекулярной биологии и новых биотехнологий, призванных освободить человечество от тяжелого груза болезней, пороков и лишений и заложить основы его будущего процветания.

ЛЕКЦИЯ 2. СТРОЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.

1. Химический состав нуклеиновых кислот.
2. Первичная структура нуклеиновых кислот.
3. Открытие двойной спирали ДНК. Вторичная структура ДНК
4. Физико-химические свойства ДНК
5. Строение и свойства РНК

1. Химический состав нуклеиновых кислот.

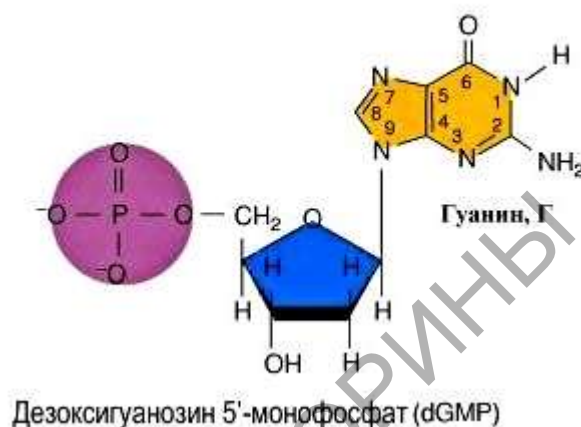
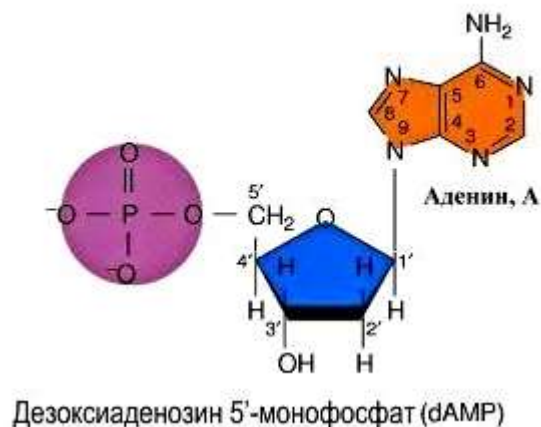
В 1869 г. – Ф. Мишер из ядер лейкоцитов человека, а затем из спермы лосося выделил вещество, которое он назвал «нуклеином». В конце XIX века было установлено, что кислый компонент «нуклеина» является нуклеиновой кислотой, которая содержит азотистые основания (пурины и пиримидины), углевод и фосфорную кислоту (рис. 1).



Рисунок 1. Компоненты нуклеиновых кислот: азотистое основание (аденин, гуанин, цитозин и тимин), дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты.

К 30-м годам XX века П. Ливен с сотрудниками установил, что азотистое основание, углевод и фосфорная кислота соединены в блоки – **нуклеотиды** расположенные вдоль линейной молекулы нуклеиновой кислоты. Нуклеотидов оказалось четыре: **аденин, гуанин, цитозин и тимин**. (рис. 2), Поскольку углеводный компонент оказался **дезоксирибозой**, кислота получила название **дезоксирибонуклеиновой** – **ДНК**. Вместе с ядерной была выделена цитоплазматическая нуклеиновая кислота, которая в качестве углевода содержала **рибозу** и поэтому получила название **рибонуклеиновой** – **РНК**.

Пуриновые нуклеотиды



Пиримидиновые нуклеотиды

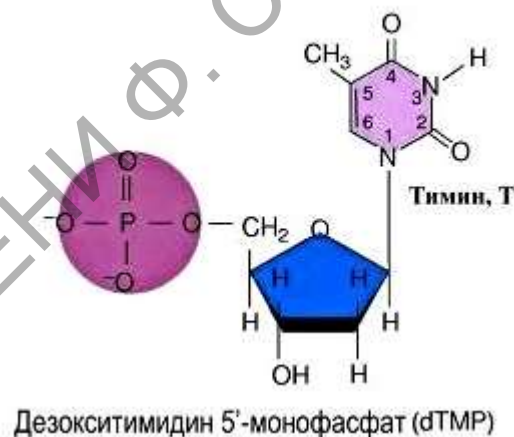
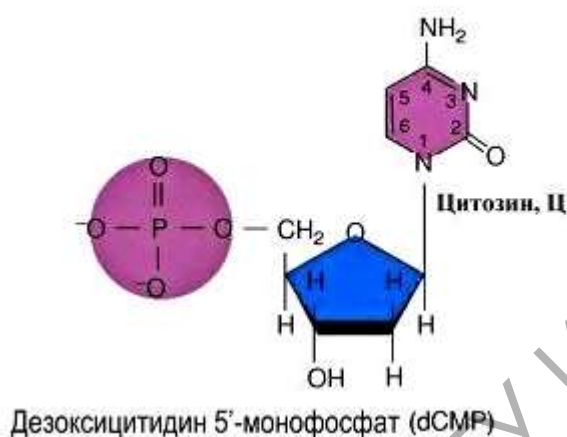


Рисунок 2. Нуклеотиды аденин, гуанин, цитозин и тимин, каждый из которых состоит из дезоксирибозы, остатка фосфорной кислоты и соответствующего азотистого основания

2. Первичная структура НК

Нуклеиновые кислоты являются биологическими полимерами. Мономерными звеньями ДНК и РНК являются нуклеотиды. Мономерные остатки в нуклеиновых кислотах связаны между собой фосфодиэфирными связями (рис. 3).

Как в ДНК, так и в РНК, эта связь осуществляется только за счет 3'-ОН одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН другого. Такую межнуклеотидную связь называют 3',5'-фосфодиэфирной.

Цепи ДНК и РНК обладают определенной полярностью, или направлением, поскольку все межнуклеотидные фосфодиэфирные связи ориентированы вдоль цепи одинаково.

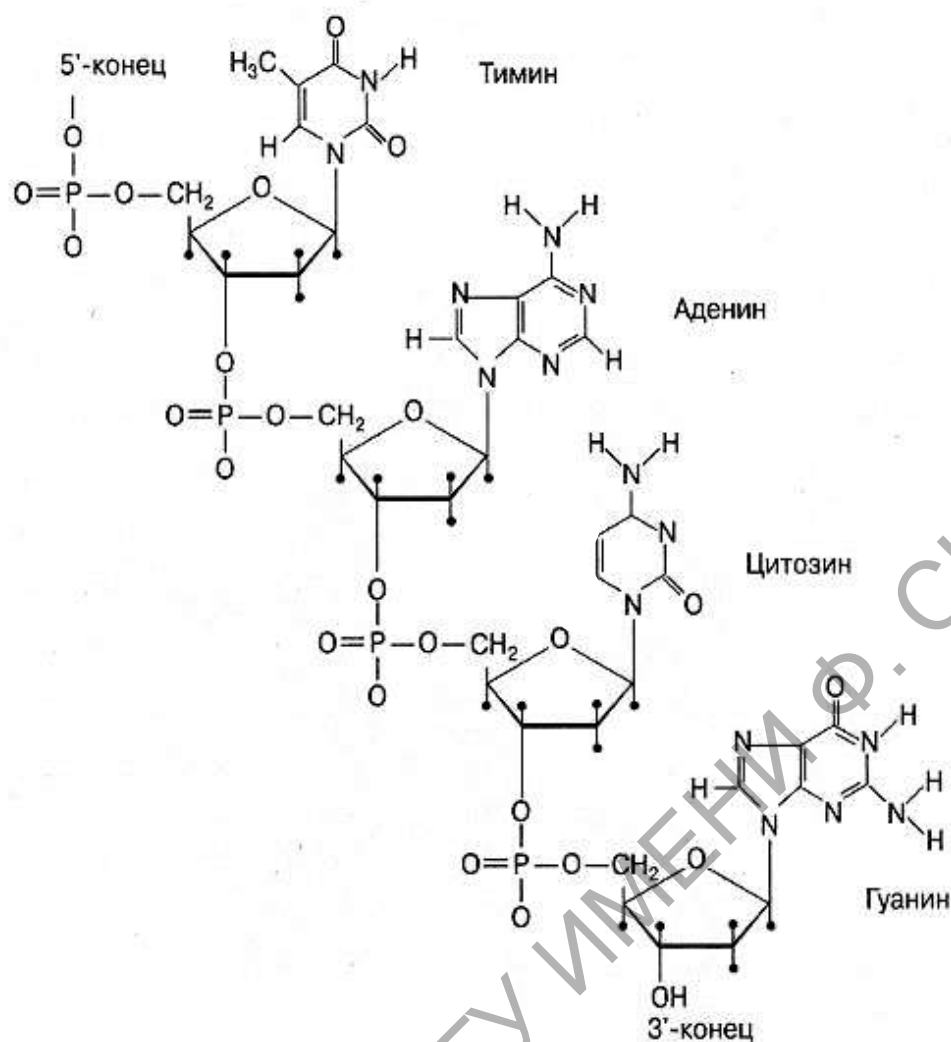


Рисунок 3. Первичная структура молекулы ДНК.

3. Открытие двойной спирали ДНК. Вторичная структура ДНК. В 1953 г. американский генетик Джеймс Уотсон и английский физик Френсис Крик предложили модель вторичной структуры ДНК. Согласно этой модели ДНК по своей пространственной организации представляет собой двойную спираль.

Свое открытие ученые сделали, основываясь на ранее полученных результатах других ученых. Так Эрвин Чаргафф и более поздние исследователи, изучая нуклеотидный состав ДНК различных видов организмов, сделали следующие выводы:

- а) нуклеотидный состав ДНК разных тканей одного и того же вида одинаков;
- б) нуклеотидный состав ДНК у разных видов различен;
- в) нуклеотидный состав не зависит от возраста и питания;
- г) в составе ДНК число остатков аденина всегда равно числу остатков тимина, а число остатков гуанина равно числу остатков цитозина.

Другие ученые Розалинд Франклин и Морис Уилкинс опубликовали рентгенограмму, полученную при рентгеноструктурном анализе ДНК. Рентгенограмма волокон ДНК указывала на то, что молекула обладает спиральной структурой и содержит более одной полинуклеотидной цепи.

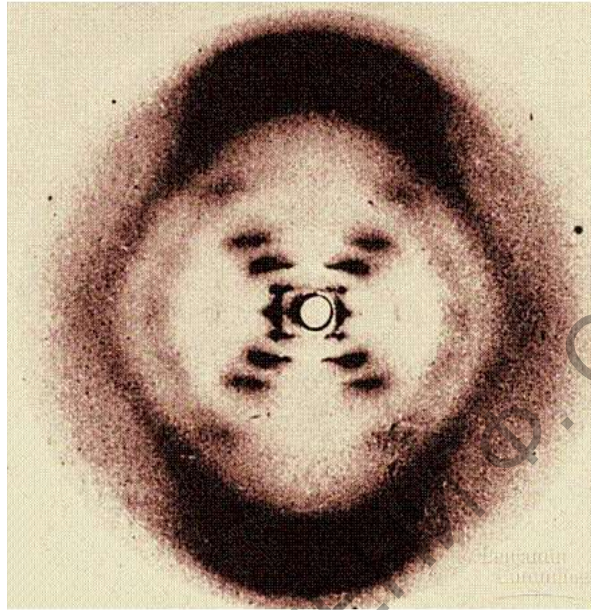


Рисунок 4. Рентгенограмма, полученная при рентгеноструктурном анализе ДНК.

За предложенную Уотсоном и Криком модель двойной спирали ДНК, совместно с Уилкинсом получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

Параметры двойной спирали ДНК, предложенной Уотсоном и Криком:

- 1) ДНК состоит из двух цепей, закрученных в правую двойную спираль;
- 2) цепи в молекуле ДНК расположены относительно друг друга антипараллельно (межнуклеотидная связь в одной цепи имеет направление 5'-3', а в другой 3'-5');
- 3) молекулы азотистых оснований ориентированы перпендикулярно оси двойной спирали;
- 4) на внешней стороне двойной спирали находятся остатки пентозы и фосфорной кислоты;
- 5) цепи ДНК при закручивании в двойную спираль образуют большую и малую борозды, ширина большой борозды – 2,2 нм, малой – 1,2 нм;
- 6) на один виток спирали приходится 10 нуклеотидных остатков;
- 7) полный виток спирали имеет длину 3,4 нм;
- 8) диаметр двойной спирали 1,7 нм;

9) цепи ДНК связаны друг с другом водородными связями, образованными между гуанином одной цепи и цитозином другой цепи, или между тиминном и аденином, расположенными в разных цепях;

10) между тиминном и аденином образуются две водородные связи, а между гуанином и цитозином – три водородные связи.

Способность гуанина взаимодействовать в молекуле ДНК только с цитозином, а аденина – только с тиминном называют *комплементарностью*, а основания гуанин и цитозин, аденин и тимин – *комплементарными*.

Согласно принципу комплементарности, последовательность одной цепи будет определять последовательность другой цепи. Всегда против аденина будет находиться тимин, а против гуанина – цитозин. Таким образом, цепи ДНК в двойной спирали будут комплементарны друг другу.

В стабилизации спиральной структуры молекулы ДНК участвуют ковалентные, гидрофобные и водородные связи. Двойная спираль стабилизируется также *стекинг* – взаимодействиями между основаниями. *Стекинг-взаимодействие оснований (base-stacking)* – межплоскостное нековалентное взаимодействие расположенных друг над другом оснований в нуклеиновых кислотах.

Параметры двойной спирали в зависимости от условий и состава ДНК могут несколько отличаться от той модели, которую предложили Уотсон и Крик. В настоящее время описаны и другие модели ДНК. Тем не менее, во всех предложенных моделях сохраняется принцип комплементарности, и цепи ДНК закручены в двойную спираль.

А-форма ДНК

А-форма ДНК образуется при относительно низкой влажности (75%) и в присутствии ионов Na^+ , K^+ или Cs^+ . Эта структура является правой спиралью. В этой форме ДНК на виток спирали приходится 11 пар оснований. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составляет 2,56 Å. Пары оснований наклонены на 20° (рис. 4).

Есть еще несколько форм правых спиралей и всего одна левая спираль (*Z-форма*).

Z-форма ДНК

Z-форма ДНК – левоспиральная. Число пар оснований на виток 12. Расстояние между соседними парами оснований 7,7 Å. Она была открыта в 1979 г при исследовании структуры гексануклеотида d(CG)₃. На виток Z-спирали приходится 12 пар оснований. Ни А-, ни Z- формы не могут существовать в водном растворе без дополнительных воздействий (белки или суперспирализация).

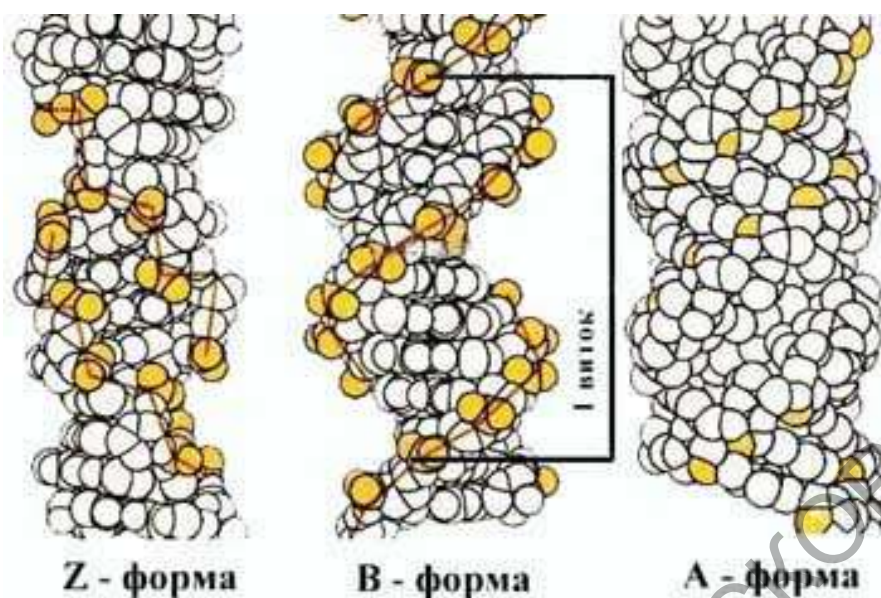


Рисунок 5. Формы двойной спирали ДНК

4. Физико-химические свойства ДНК

I. Денатурация. Денатурация ДНК осуществляется при действии химических факторов (мочевина, гуанидинхлорид, кислота, щелочь) и физических факторов (температура). В результате денатурации происходит разрушение вторичной структуры ДНК. При снятии воздействия денатурирующего фактора вторичная структура ДНК может быть восстановлена. Это процесс носит название – ренатурация.

При высоких температурах происходит денатурация, или плавление, ДНК. Этот процесс сопровождается увеличением оптической плотности растворов ДНК при длине волны 260 нм (гиперхромный эффект). Максимальное повышение оптической плотности раствора ДНК при полном распаде ее до моонуклеотидов при указанной длине волны приблизительно равно 80 %. Молекула ДНК, состоящая только из поли-д(АТ), плавится при более низких температурах, чем молекула ДНК, состоящая из поли-д(ГЦ). Это связано с тем, что между А и Т образуются две водородные связи, а между Г и Ц – три водородные связи.

II. Температура плавления. Важнейшей характеристикой ДНК является ее температура плавления, которая соответствует моменту 50%-ной денатурации молекулы (рис. 6). Температура плавления различается у разных ДНК. Так, температура плавления ДНК, состоящей из поли-д(АТ), равна 66⁰С, а ДНК, состоящей из поли-д(ГЦ), – 85⁰С. Природные ДНК имеют температуру плавления более 66⁰С, но менее 85⁰С, потому что в их состав входят все четыре азотистых основания, в различных пропорциях. ДНК человека характеризуется температурой плавления, равной 81 – 82⁰С, E.coli – 90,5⁰С.

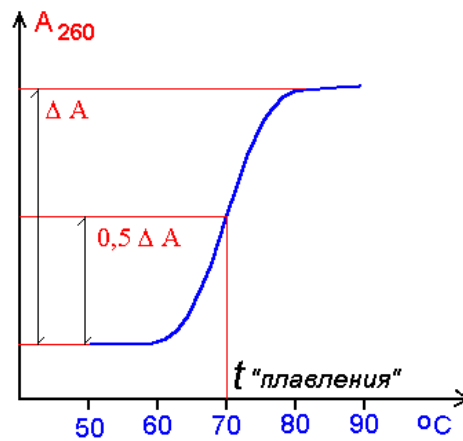


Рисунок 6. Температура плавления ДНК.

При охлаждении раствора ДНК (отжиге) может происходить восстановление исходной вторичной структуры ДНК в соответствии с принципом комплементарности.

III. Гибридизация ДНК. Если смесь различных молекул ДНК вначале расплавить, а затем провести их отжиг, то при наличии сходства в их первичных структурах между молекулами ДНК возможна гибридизация. Чем выше сходство между молекулами ДНК, тем выше степень гибридизации. На основании результатов гибридизации между ДНК различных видов живых организмов можно судить о их родстве. Чем выше степень гибридизации, тем ближе родство между анализируемыми видами (рис. 7).



Рисунок 7. Гибридизация молекул ДНК.

Гибридизация также возможна и между молекулами ДНК и РНК, при условии наличия гомологичных нуклеотидных последовательностей.

IV. Нуклеиновые кислоты сильно поглощают ультрафиолетовый свет, и это свойство лежит в основе определения их концентрации. С этим же свойством связан и мутагенный эффект ультрафиолетового света.

Уровни упаковки генетического материала

Длина молекулы ДНК эукариот многократно превышает размеры клетки. Для обеспечения протекания различных биологических процессов она должна быть упакована. Существуют несколько уровней ее компактизации.

1. *Голая ДНК* – представляет собой двойную спираль диаметром 1,7 нм. Такая ДНК обладает сверхчувствительностью к ДНКазам – ферментам, гидролизующим фосфодиэфирные связи.

2. *Нуклеосомный* («бусы на ниточке»). На этом уровне ДНК (около 160 п.н.) делает два витка вокруг нуклеосомы (кора) – октамера, содержащего по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4 (рис. 8). Размер ДНК между нуклеосомами (линкерная ДНК) составляет около 60 п.н.

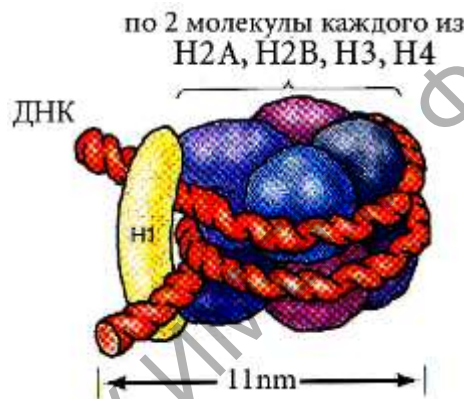


Рисунок 8. Нуклеосома.

Нуклеосомный уровень упаковки свойственен всей эукариотической ДНК, он дает укорочение в 7 раз. Диаметр увеличивается до 11 нм.

3. *Супернуклеосомный* (30 нм – хроматиновая фибрилла): такая структура формируется в результате взаимодействия гистона H1 с линкерной ДНК, ее диаметр равен 30 нм (рис. 9).

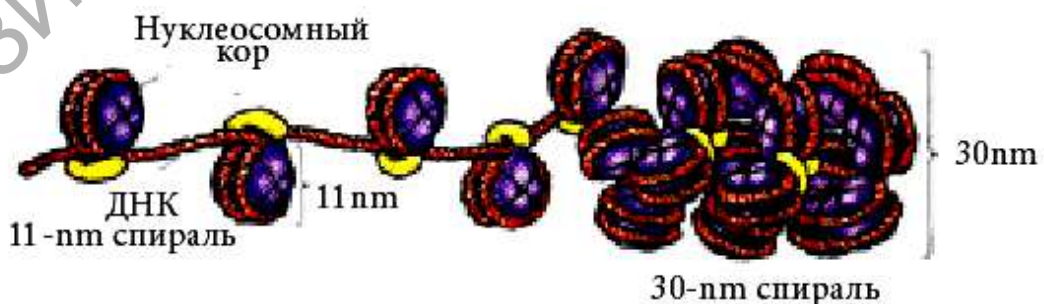


Рисунок 9. Супернуклеосомный уровень упаковки ДНК.

4. *Хроматидный* (серия петельных доменов). В формировании такой структуры принимают участие ДНК-связывающие белки, они

объединяют в петли 30-нм фибриллы, состоящие из 20000 – 100000 пар нуклеотидов (рис. 10).



Рисунок 10. Хроматидный уровень упаковки ДНК.

5. Метафазная хромосома:

Такая структура формируется во время митоза. Толщина хроматиды 700-900 нм. Укорочение еще в 20 раз (рис. 11).



Рисунок 11. Метозная хромосома

Функции ДНК

ДНК выполняет следующие функции:

1. Участвует в копировании генетического материала (репликации) и передаче его дочерним клеткам в ходе их деления.
2. Обеспечивает: экспрессию генов (на этапе транскрипции); регуляцию экспрессии генов (регуляцию транскрипции).
3. Осуществляет поддержание стабильности наследственной информации посредством репарации повреждений;
4. Накапливает мутации, обеспечивающие изменчивость наследственного материала;
5. Участвует в кроссинговере (рекомбинации), что также обеспечивает изменчивость наследственного материала;
6. На уровне ДНК осуществляются манипуляции с генами (генная инженерия);
7. На уровне ДНК осуществляются манипуляции с последовательностями нуклеотидов (геномика).

5. Строение и свойства РНК.

РНК отличается от ДНК тем, что у нее углеводом является рибоза вместо дезоксирибозы. Кроме того, вместо нуклеотида тимина у нее урацил. И наконец, в отличие от ДНК она имеет в основном одноцепочечное строение (табл. 1).

Таблица 1 – Отличия в строении ДНК и РНК.

Характеристика	ДНК	РНК
Сахар	Дезоксирибоза	Рибоза
Азотистые основания	А, Т, Г, Ц	А, У, Г, Ц
Количество цепей в молекуле	99.99% двойная спираль 0.01% одноцепочечная.	99.99% одноцепочечная 0.01% двухцепочечная
Форма молекулы	Все одноцепочечные-кольцевые. Большинство двухцепочечных - линейные, часть- кольцевые.	Линейные молекулы

Различают следующие виды РНК:

А) информационная (матричная) РНК состоит из 300-30 тыс. нуклеотидов и составляет примерно 5% от всей РНК, содержащейся в клетке. Представляет собой комплементарную копию определенного участка ДНК. Выполняет роль переносчика генетической информации от ДНК к месту синтеза белка (в рибосомы) и непосредственно участвуют в сборке его молекул.

Б) транспортная РНК состоит из 75-90 нуклеотидов и составляет до 10% от всей РНК клетки (насчитывается более 60-ти). Молекулы тРНК транспортируют аминокислоты из цитоплазмы в рибосомы, т.е. непосредственно участвуют в биосинтезе белков. Особенность строения тРНК – третичная структура в форме клеверного листа за счет неспаренных азотистых оснований.

Каждая аминокислота присоединяется к определенной тРНК. На одном конце тРНК находится **акцепторный триплет ЦЦА**, к аденину которого присоединяется специфическая аминокислота. На другом конце (в антикодонной петле) каждой тРНК находится **антикодон** – специфический триплет, с помощью которого **тРНК «узнает»** соответствующий **комплементарный кодон** в **иРНК**, и тем самым определяет место, куда должна быть поставлена данная аминокислота в синтезируемой молекуле белка. Боковые петли тРНК, по-видимому, используются для связывания с рибосомой и со специфической аминоацил-тРНК-синтетазой.

В) рибосомальная РНК состоит из 3-5 тыс. нуклеотидов (около 85% РНК). Вместе с белками образует структуру рибосом. Обеспечивает пространственное расположение иРНК и тРНК.

Большинство клеток содержат много малых цитоплазматических

РНК (мцРНК), а в клетках эукариот присутствуют малые ядерные РНК (мяРНК).

Малые ядерные РНК

Все эукариотические клетки содержат множество малых ядерных РНК (мяРНК) — коротких стабильных молекул РНК, большинство которых в составе нуклеопротеидных частиц присутствуют в ядре. Они обнаружены в составе сплайсингосом млекопитающих. Эти РНК называют U-РНК из-за необычайно большого содержания урацила и его модифицированных форм. Нуклеотидные последовательности всех U-РНК позвоночных совпадают на 95 %.

Малые цитоплазматические РНК

Функции малых цитоплазматических РНК (мцРНК), за исключением 7SL-РНК сигнал-распознающих частиц, не установлены. Известно, что большинство этих РНК ассоциированы с крупными семействами последовательностей, содержащими как гены, так и псевдогены.

Мультифункциональность РНК

(1) Кодировочная функция: программирование белкового синтеза линейными последовательностями полирибонуклеотидов.

(2) Репликативная функция: репликация генетического материала через комплементарные последовательности полинуклеотидов.

(3) Структурообразующая функция (формирование трехмерных структур): само-сворачивание линейных полирибонуклеотидов в уникальные компактные конформации.

(4) Функция специфического узнавания лигандов: специфические пространственные взаимодействия с другими макромолекулами и малыми лигандами.

(5) Каталитическая функция: специфический катализ химических реакций рибозимами.

ЛЕКЦИЯ 3. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК.

1. Матричные процессы синтеза биополимеров. Общая характеристика репликации.
2. Типы репликации.
3. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.
4. Инициация репликации.

1. Матричные процессы синтеза биополимеров. Общая характеристика репликации.

Одной из важнейших функций нуклеиновых кислот (НК) является передача генетической информации от родителей потомкам.

Этот процесс связан с удвоением, или репликацией, НК (ДНК или РНК), выполняющей функцию хранителя генетической информации, и последующей передачи ее потомкам. Например, в результате деления дочерние клетки получают от материнской идентичные молекулы ДНК, а, следовательно, и идентичную генетическую информацию. При размножении вирусы также передают дочерним вирусным частицам точные копии НК (ДНК или РНК). При половом размножении потомки получают генетическую информацию от обоих родителей. Вот почему дети наследуют признаки обоих родителей.

Прежде чем приступить к рассмотрению процесса репликации ДНК необходимо сформировать понятие репликона.

Независимо от того, содержит клетка одну хромосому (как у прокариот) или много (эукариоты) за период времени, соответствующий одному клеточному делению, весь геном может быть прореплицирован только один раз. Единица с помощью которой клетка контролирует отдельные акты репликации, получила название репликона. Каждый репликон в процессе клеточного деления активизируется один раз. Репликон должен обладать необходимыми для репликации контролирующими структурными элементами. Такими элементами являются:

а) точка начала репликации Ori (origin), в которой иницируется процесс удвоения ДНК;

б) точка окончания репликации (terminus), в которой процесс удвоения ДНК останавливается.

Т.о. репликон – участок молекулы ДНК от точки начала одной репликации до точки начала другой. В бактериальную хромосому входит один репликон. У эукариот их много.

В результате репликации НК образуются дочерние молекулы, нуклеотидные последовательности которых идентичны как между со-

бой, так и с материнской молекулой НК. Репликации может подвергаться как ДНК, так и РНК (у РНК-содержащих вирусов). В основе репликации лежит принцип комплементарности.

2. Типы репликации.

Различают три типа репликации: полуконсервативный, консервативный, дисперсионный (рис. 12).

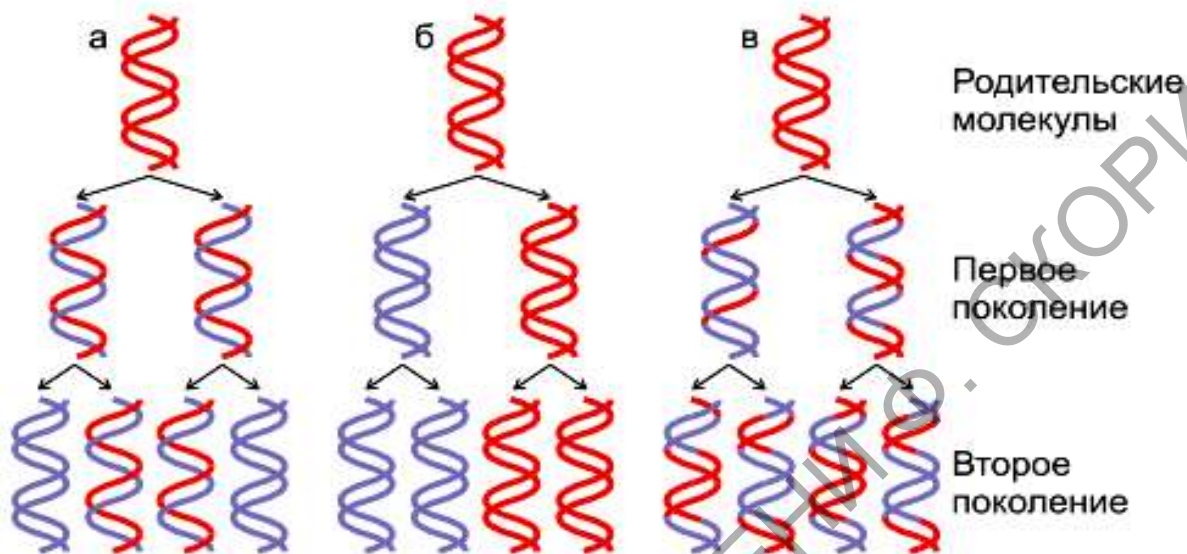


Рисунок 12. Модели репликации ДНК: а – полуконсервативная, б – консервативная, дисперсионная. Родительские цепи изображены в виде красных лент, вновь синтезированные показаны синим цветом.

В случае полуконсервативного типа репликации вновь синтезированная молекула нуклеиновой кислоты состоит из одной цепи исходной материнской и одной вновь синтезированной дочерней полинуклеотидных цепей.

В 1958 г Мэтью Мезелсон и Франклин Сталь в блестящем эксперименте убедительно доказали именно полуконсервативный характер репликации ДНК, предсказанный Уотсоном и Криком.

На первом этапе они выращивали клетки *E. coli* на питательной среде содержащей азот ^{15}N – «тяжелый» изотоп, который имеет на один нейтрон больше чем ^{14}N . После культивирования на такой среде во все азотосодержащие молекулы *E. coli*, в том числе и ДНК включается тяжелый ^{15}N . С помощью ультрацентрифугирования в пробирках можно разделить ДНК содержащую ^{15}N и ^{14}N . Тяжелые молекулы ^{15}N оседают ближе ко дну пробирки (рис. 13).

На втором этапе меченные тяжелым изотопом бактерии переносили на новую среду, содержащую обычный ^{14}N . Следовательно вся вновь синтезированная ДНК *E. coli* содержала легкий изотоп ^{14}N . Как видно из рис. 13, выделенная из *E. coli* после одного поколения культивирования ДНК в результате центрифугирования осаждалась в про-

бирке одной фракцией промежуточной плотности, так как одна цепь содержала «легкий» изотоп, а вторая – «тяжелый».

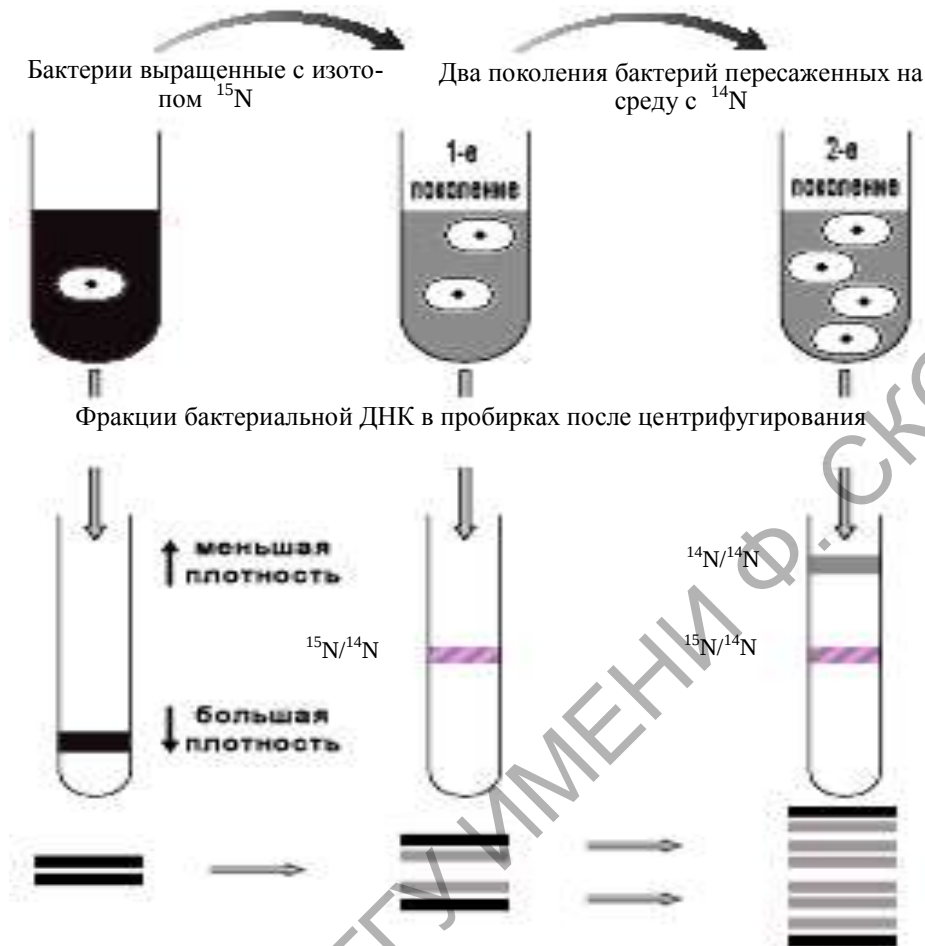


Рисунок 13. Схема опытов Мезельсона и Сталя, доказывающих полуконсервативную модель репликации ДНК.

После второго поколения культивирования плотность образца ДНК, взятой из *E. coli* разделилась на две фракции с промежуточной ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) и легкой ($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$) плотностями. Эти результаты в точности соответствуют полуконсервативному механизму репликации ДНК.

При *консервативной* репликации вновь синтезированная молекула НК состоит только из дочерних полинуклеотидных последовательностей.

При *дисперсной* репликации вновь синтезированная полинуклеотидная цепь НК состоит из фрагментов дочерних и материнских полинуклеотидных последовательностей.

Для прокариот и эукариот характерен полуконсервативный тип репликации. У вирусов встречаются все три типа репликации.

3. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.

В репликации ДНК принимают участие многочисленные белки и ферменты.

Топоизомеразы снимают напряжения, возникающее в результате расплетения двойной спирали в ДНК, за счет разрыва и последующего воссоединения цепи ДНК.

ДНК-хеликаза (геликаза) осуществляет расплетение двойной спирали ДНК путем разрыва водородных связей между основаниями за счет энергии гидролиза АТФ. В результате ее действия возникает «репликационная вилка» (Y), состоящая из двуцепочечного участка ДНК и двух одноцепочечных ветвей (рис. 14).

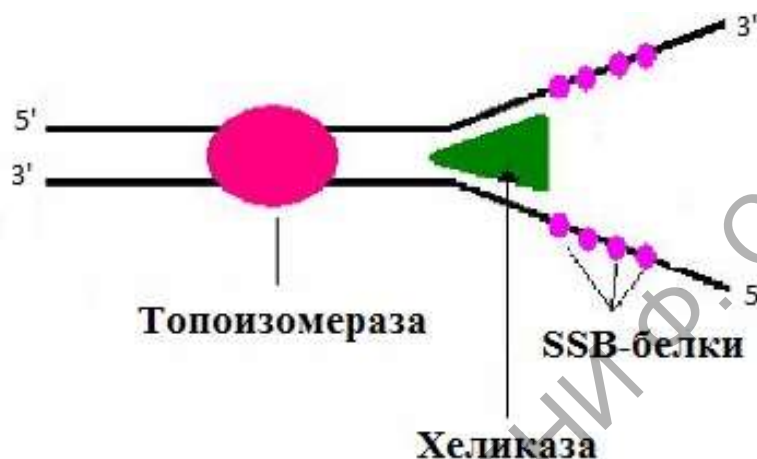


Рисунок 14. Действие фермента хеликазы и SSB-белков.

SSB-белки (single-strand DNA-binding proteins) - белки, которые связываются с одноцепочечными ДНК, стабилизируют их и препятствуют образованию двойной спирали. Более 200 молекул этого белка присутствуют в каждой репликативной вилке (рис. 14).

Праймаза

Праймаза катализирует матричный синтез короткой РНК-затравки (праймера) в направлении $5' \rightarrow 3'$. Свободный 3'-конец праймера используется ДНК-полимеразой для инициации синтеза ДНК (рис. 15).

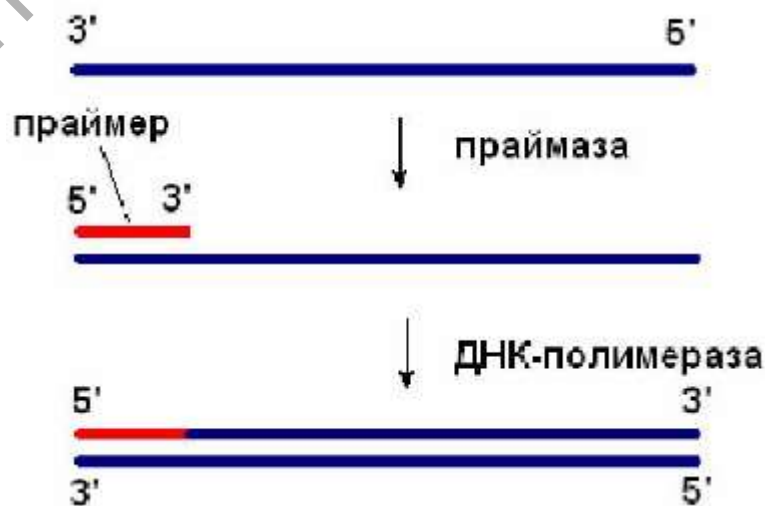


Рисунок 15. Работа фермента праймазы.

ДНК-полимераза III.

ДНК-полимеразы III осуществляют синтез ДНК. Субстратом для этих ферментов являются дезокси-нуклеозидтрифосфаты (дНТФ). Уравнение реакции, катализируемой ДНК-полимеразами, в общем виде выглядит так:



ДНК-полимераза способна присоединять нуклеотиды только к 3'-ОН группе предыдущего нуклеотида и для синтеза новой цепи ей требуется затравка (праймер) со свободным 3'-концом (синтез новой цепи происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу). Нуклеотиды присоединяются к затравке в соответствии с принципом комплементарности, напротив аденина матричной цепи всегда будет встраиваться тимин, а напротив гуанина – цитозин. ДНК-полимеразы способны копировать любую цепь ДНК, т.е. они не специфичны к последовательности нуклеотидов матрицы. Скорость ДНК-полимеразной реакции колеблется в пределах от 50 нуклеотидов в секунду у эукариот до 500 нуклеотидов в секунду у прокариот.

Главной задачей ДНК-полимераз является снятие точной копии с матрицы, в связи с этим они проверяют комплементарность каждого нуклеотида дважды: перед включением его в состав растущей цепи и перед тем как включить следующий нуклеотид. Очередная фосфодиэфирная связь образуется, если последний нуклеотид комплементарен матрице. Если включен некомплементарный нуклеотид, то он удаляется за счет 3' → 5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, и только после удаления некомплементарного нуклеотида ДНК-полимераза продолжит наращивать цепь ДНК. ДНК-полимераза удаляет некомплементарный нуклеотид и затем продолжает синтез ДНК.

ДНК-полимераза II. Основной функцией ДНК-полимеразы II является достраивание поврежденных участков в молекуле ДНК, т. е. репарация ДНК.

ДНК-полимераза I. Под действием этого фермента короткие РНК-затравки, замещаются участками ДНК.

ДНК-лигаза осуществляет «сшивание» соседних фрагментов ДНК, образуя межнуклеотидную (фосфодиэфирную связь). Реакция сопряжена с гидролизом молекулы АТФ.

4. Инициация репликации

Репликация ДНК начинается в определенном месте – в точке начала репликации. Репликация от точки начала репликации может происходить в одном (рис. 16А) или двух направлениях (рис. 16Б).

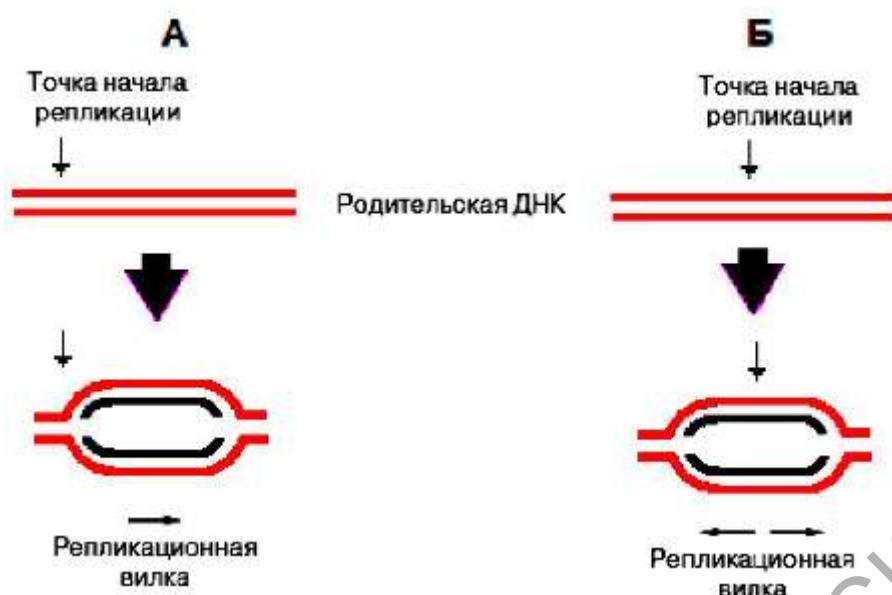


Рисунок 16. Точка начала репликации.

Бактериальная хромосома имеет одну точку начала репликации, т.е. представляет собой единицу репликации, получившее название репликон, иначе говоря, бактериальная хромосома представлена одним репликоном. ДНК эукариот имеет множество точек начала репликации, т.е. она имеет полирепликонную организацию. Репликация ДНК эукариот продолжается до тех пор, пока репликативные вилки двух соседних точек начала репликации не сольются. Размеры репликонов и скорость движения репликативной вилки у эукариот значительно меньше, чем у прокариот (табл. 2).

Таблица 2 - Размеры репликонов и скорость движения репликативной вилки у про- и эукариот.

Организм	Количество репликонов	Средний размер репликона, тыс. п.н.	Скорость движения репликативной вилки п.н./мин
<i>E.coli</i>	1	4200	50000
Дрожжи	500	40	3600
Дрозофила	3500	40	2600
Мышь	25000	150	2200

Репликация начинается с образования РНК-праймеров (затравок, состоящих из 10-200 пар нуклеотидов РНК), к которым присоединяется реписома (ферменты и белки, обеспечивающие процесс репликации). Топоизомеразы раскручивают двойную цепочку ДНК, а хеликазы ее окончательно деспирализуют и разрывают водородные связи между цепочками. Образовавшаяся структура, получившая название

репликационной вилки Корнберга, постепенно движется вдоль молекулы ДНК от ее стартовой точки до точки окончания (рис. 17).

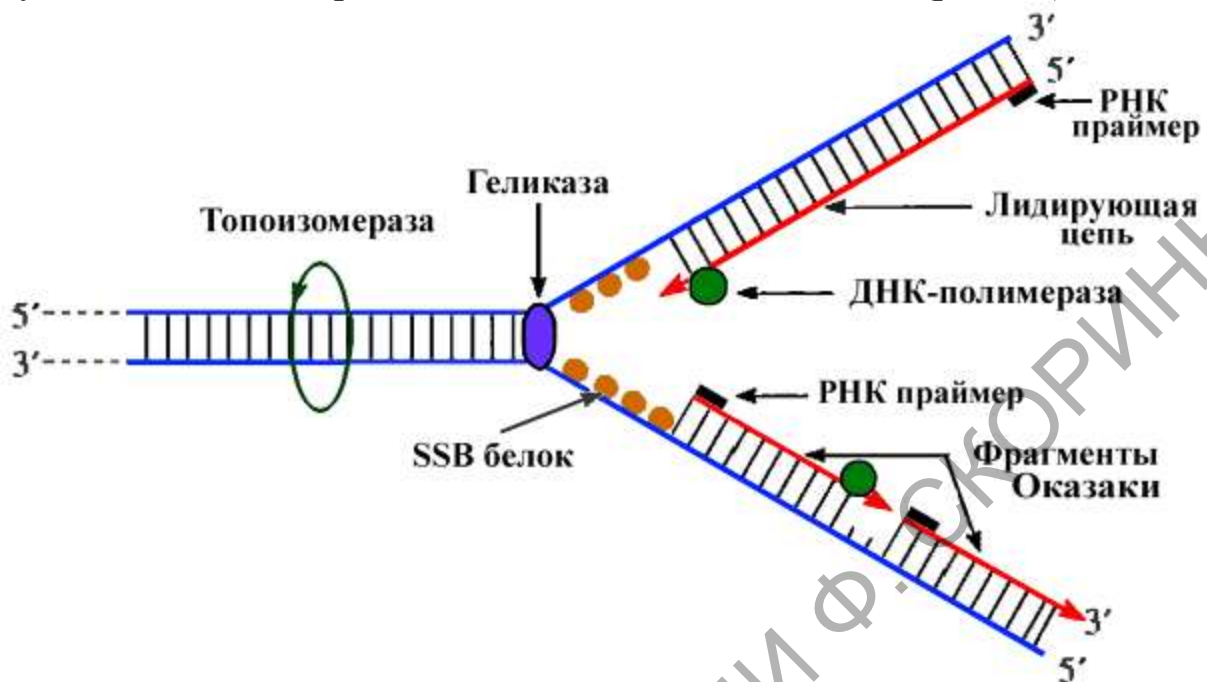


Рисунок 17. Репликационная вилка Корнберга с указанием лидирующей и запаздывающей цепей вновь синтезированной ДНК.

Движение ДНК-полимеразы связано с двумя процессами – считыванием информации и синтезом новой цепи, которые происходят в разных направлениях (считывание – в направлении $3' \rightarrow 5'$, а синтез новой цепи – в направлении $5' \rightarrow 3'$). Т.к. ДНК-полимераза может считывать информацию только в направлении $3' \rightarrow 5'$, то в каждой репликативной вилке она может постепенно и непрерывно строить лишь одну (*лидирующую*) новую цепь молекулы ДНК. Другая дочерняя цепь (*отстающая*) по мере расплетения материнской молекулы синтезируется отдельными короткими участками по 100-200 нуклеотидов (*фрагменты Оказаки*) под действием фермента ДНК-полимеразы, движущейся в противоположном направлении. Эти короткие участки вновь синтезируемой полинуклеотидной цепи одного репликона сшиваются ферментом лигазой. Такой принцип синтеза новых цепей ДНК называется прерывистым. Участки дочерних молекул ДНК, синтезированные в соседних репликонах, также сшиваются ферментом лигазой.

Модель работы димерной полимеразы («модель тромбона»).

Сейчас известно, что ключевые белки репликации тесно ассоциированы и формируют репликационную машину (реплисому) с определенным расположением цепей ДНК и ферментов. Отстающая цепь изгибается на 180° так, что ее ДНК-полимераза III комплексирует с ДНК-полимеразой III лидирующей цепи. Этот изгиб подводит 3'-конец каждого уже синтезированного фрагмента Оказаки к участку, в

котором начинается синтез нового фрагмента Оказаки. ДНК-полимераза III на отстающей цепи используется вновь и вновь, продвигаясь вместе с вилкой. Т.о, ДНК синтезируется одинаково эффективно на обеих матричных цепях (рис. 18).

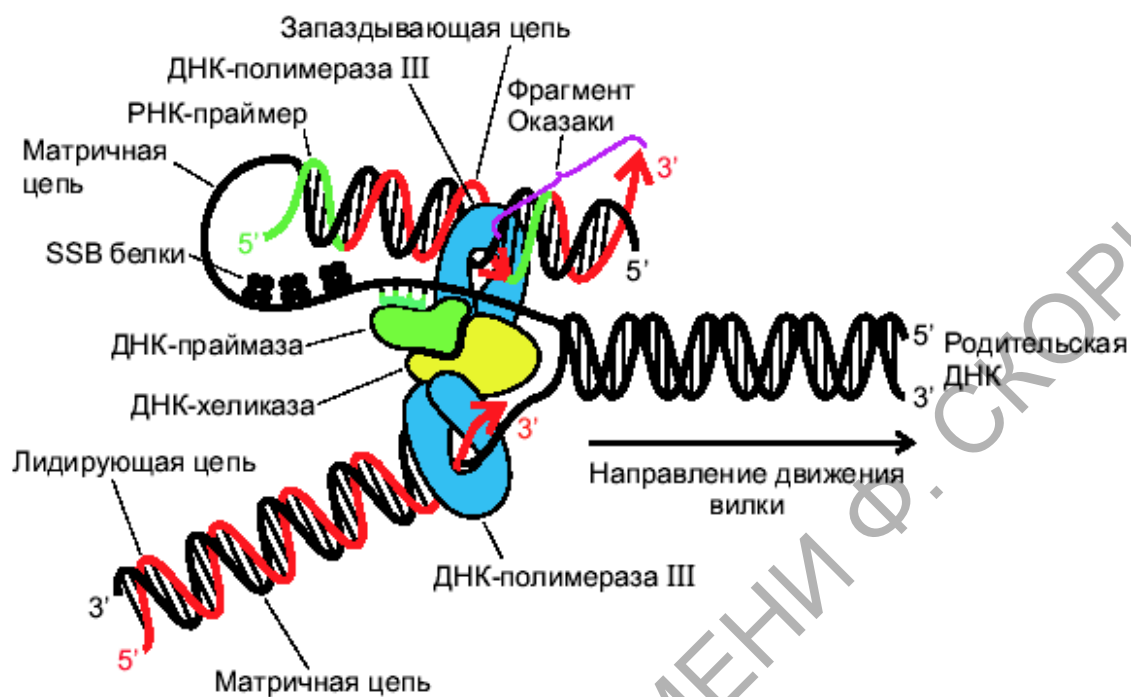


Рисунок 18. Модель работы димерной полимеразы.

ЛЕКЦИЯ 4. РЕПЛИКАЦИЯ ХРОМОСОМ У ПРО- И ЭУКАРИОТ. ТЕЛОМЕРАЗА И ЯВЛЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.

1. Репликация кольцевых молекул ДНК
2. Репликация хромосом у эукариот
3. Репликация теломерных концов ДНК
4. Явление обратной транскрипции
5. Репликативное метилирование ДНК

1. Репликация кольцевых молекул ДНК

Кольцевые молекулы прокариот могут реплицироваться двумя путями. Синтез дочерних цепей по первому пути осуществляется с помощью механизма репликации типа θ . Из точки *ori* направляются две репликационные вилки, что приводит к образованию структуры, похожей на греческую букву θ (тета) (рис.19).

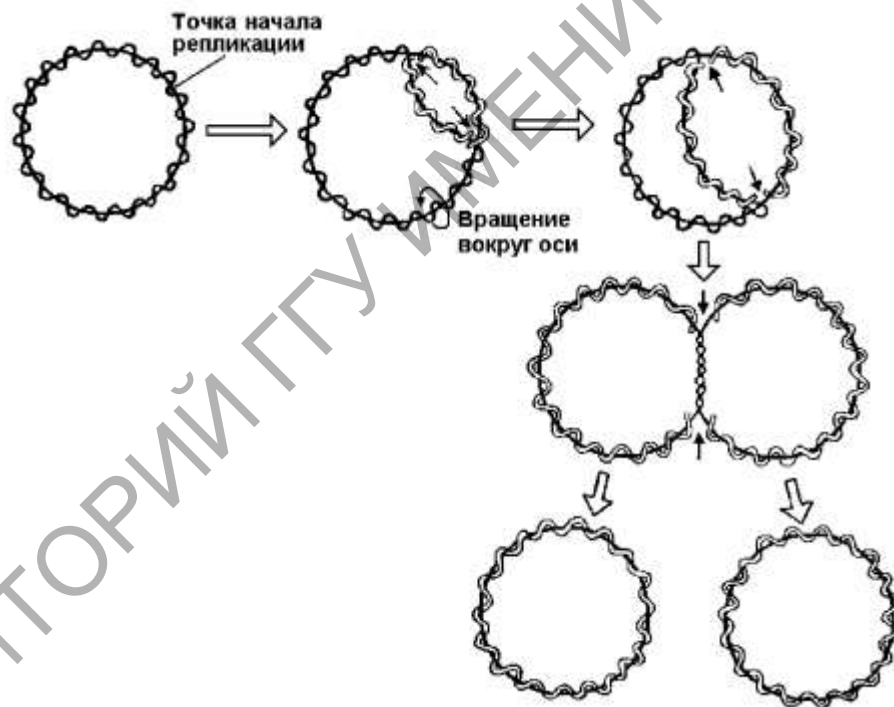


Рисунок 19. Репликация типа θ у прокариот.

Второй путь, по которому может осуществляться репликация кольцевых молекул ДНК, получил название «**катящегося кольца**» (репликация типа σ) (рис. 20). Так образуется много новых молекул вирусных ДНК. Нуклеаза разрывает одну цепь и образовавшийся при этом свободный 3'-ОН конец наращивается с помощью ДНК-полимераз. Точка роста "скользит" по кольцу матричной цепи. 5'-конец отдаляется от кольцевой молекулы и служит матрицей для синтеза второй цепи ДНК.

Синтез на кольцевой нити может идти на протяжении нескольких оборотов молекулы, в результате чего появляется линейная нить, содержащая несколько повторов одного и того же генома. Эта нить разрезается специфическими эндонуклеазами на равные длине генома куски, каждый из которых замыкается в кольцевую хромосому.

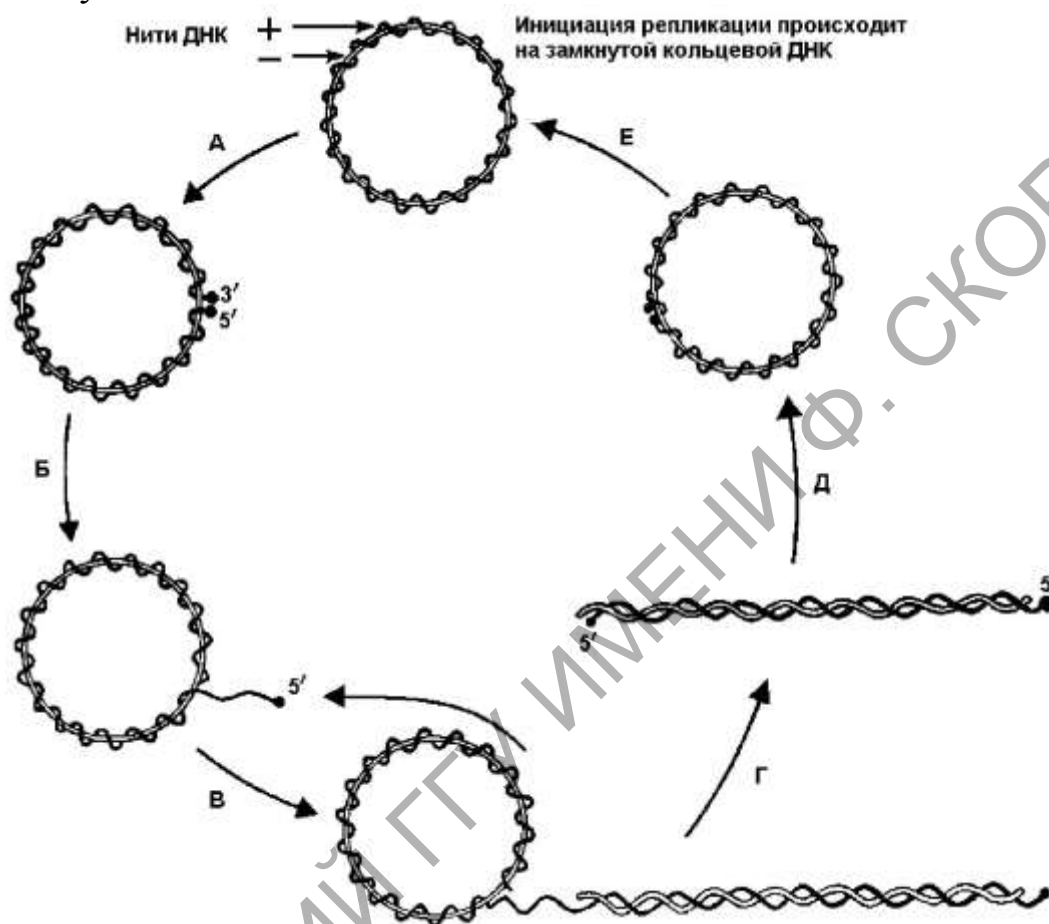


Рисунок 20. Репликация типа «катящегося кольца» у прокариот

2. Репликация хромосом у эукариот

У эукариот ДНК представлена длинными линейными молекулами с различным уровнем компактизации. Скорость репликации составляет несколько тысяч пар нуклеотидов в минуту. Чтобы обеспечить синтез целой молекулы, нужен определенный период времени (в клетках человека 7×10^9 п.н. реплицируются в течение 8-9 часов).

Репликация начинается одновременно во многих точках *ori* (46 хромосом соматической клетки человека содержат от 10^5 до 10^6 репликонов) (рис.21). Наличие многочисленных репликонов у эукариот связано с большими размерами ДНК и более низкой активностью ДНК-полимераз.

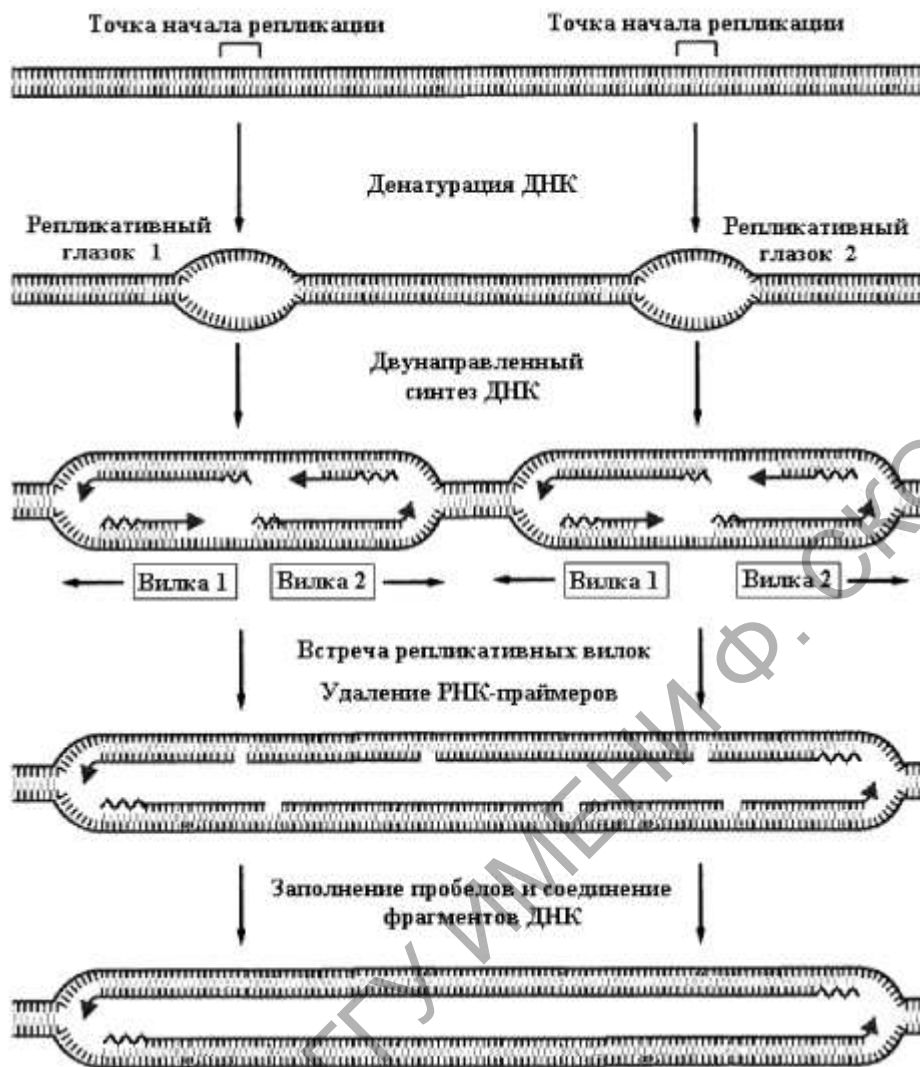


Рисунок 21. Механизм и этапы репликации у эукариот.

Продвижение репликативной вилки прекращается при столкновении с другой вилкой или при достижении конца хромосомы. Таким образом, в результате репликации образуются две дочерние молекулы ДНК, являющиеся точными копиями материнской. Причем каждая дочерняя молекула ДНК состоит из одной материнской и одной дочерней цепей ДНК. Образовавшиеся в результате митоза молекулы ДНК распределяются между дочерними клетками.

У эукариот репликация происходит только в периоде S клеточного цикла и носит асинхронный характер. Эухроматиновые участки реплицируются раньше – в начале S-периода, гетерохроматиновые участки – в конце S-периода.

3. Репликация теломерных концов ДНК

Соматические клетки могут делиться ограниченное число раз, например, эмбриональные клетки могут делиться до 80 раз, клетки

70-летнего человека – только 20 – 30 раз. Способность клеток делиться ограниченное число раз носит название лимита Хейфлика. В ряде случаев клетки способны преодолеть лимит Хейфлика и начать делиться неограниченно, это явление называется – иммортализация клеток.

За 50 делений масса потомков одной клетки может составить 20 000 000 т.

Ограничение числа делений клеток определяется наличием особых структур на концах хромосом – теломер. Теломеры состоят из повторяющихся коротких последовательностей ДНК. У многих видов они представлены высококонсервативными повторами ТТАГГГ. ДНК теломер не кодирует белки. У человека размер теломер может составлять от 2000 до 20 000 п.н. В процессе развития организма размер теломер уменьшается. Клетки, имеющие меньший размер теломер, имеют меньший потенциал делений. Уменьшение теломер в процессе деления клеток связано с недорепликацией концов хромосом. Недорепликация концов хромосом определяется тем, что в процессе репликации используется РНК-затравка и синтез ДНК протекает в направлении $5' \rightarrow 3'$ (рис. 21).

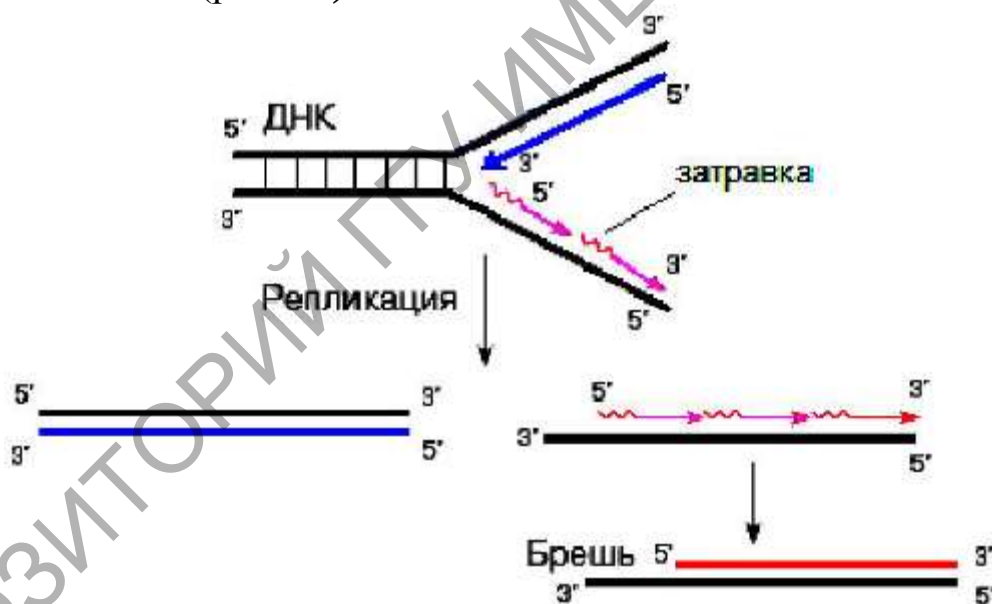


Рисунок 21. Недорепликация хромосом.

Теломераза является РНК-содержащим ферментом. В составе РНК-компонента теломеразы имеется тринуклеотид, комплементарный соответствующему участку повторяющейся последовательности теломеры (рис. 21).

В результате их комплементарного взаимодействия образуется матричная область, которую использует фермент для синтеза фрагмента теломеры. После завершения синтеза этого фрагмента проис-

ходит перемещение (транслокация РНК-компонента теломеразы в направлении 3'-конца, синтезируемой цепи. Теломераза вновь способна продолжить синтез ДНК. Этот циклический процесс повторяется многократно до тех пор, пока не завершится синтез соответствующей цепи ДНК (рис. 22).

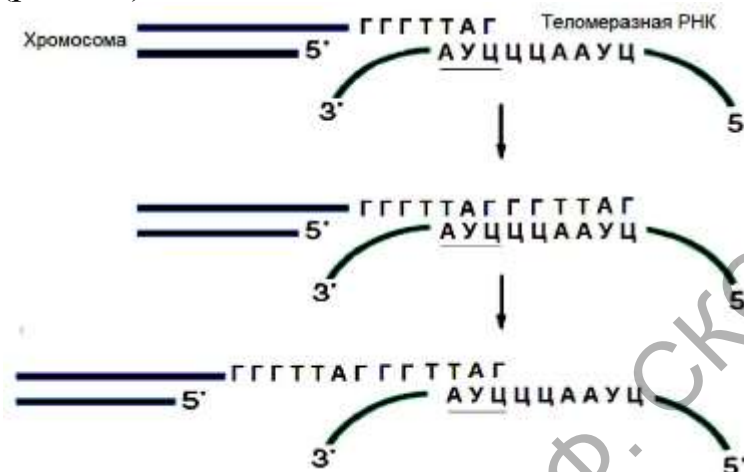


Рисунок 22. Механизм действия теломеразы

После того как теломераза завершит синтез цепи ДНК в направлении 3'-конца, при участии ДНК-полимеразы и других белков происходит синтез комплементарной ей цепи. Так происходит образование теломер.

Теломеразная РНК закодирована в генах, ее длина у различных организмов не одинакова: у простейших она составляет 150 – 200 нуклеотидов, у человека и мыши – 450 нуклеотидов, у дрожжей – 1300 нуклеотидов.

Матричная область РНК теломеразы находится на расстоянии 50 нуклеотидов от ее 5'-конца. У теломеразы мышей матричная область РНК составляет 8 нуклеотидов, у человека – 11. Тем не менее обе последовательности кодируют одну и ту же повторяющуюся единицу теломеры.

В зародышевых клетках ген теломеразы экспрессируется, и, следовательно, в них проявляется теломеразная активность, и происходит синтез теломер. В соматических же клетках ген теломеразы выключен, и теломеразная активность не определяется.

В раковых клетках происходит активация гена теломеразы, и поэтому в них уровень активности теломеразы достаточно высок и вследствие этого происходит синтез теломер. Они в раковых клетках хоть и короче, чем в эмбриональных, но стабильны.

Использование антисмысловых РНК к РНК-компоненту теломеразы вызывало гибель опухолевых клеток HeLa. Эти эксперименты говорят о важной роли теломеразы в перерождении нормальных клеток в раковые. В тоже время получены мыши, нокаутированные по

гену, кодирующему РНК-компонент теломеразы. У них отсутствовала активность теломеразы. Однако они были жизнеспособными в течение 6 поколений. Кроме того клеточные линии из этих мышей подвергались иммортализации, трансформировались вирусными онкогенами и становились онкогенными для бестимусных мышей.

Клетки мышей четвертого поколения не содержали теломерных повторов, характеризовались различными аномалиями. Эти данные подтверждают необходимость теломеразы для поддержания теломер, но отрицают ее роль в иммортализации клеток и их злокачественной трансформации.

Таким образом, воспроизведение генетической информации является сложнейшим биологическим процессом, в котором участвуют многочисленные факторы.

4. Явление обратной транскрипции

Долгое время считалось, что передача генетической информации в обратном направлении невозможна. В 1975 г. Дульбеко, Тимин и Балтимор описали явление обратной транскрипции, т.е. передачи генетической информации от и-РНК к ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы). Ревертаза была открыта у РНК-содержащих вирусов в 1970 г. Тиминим и Музатани. Наличие ревертазы в нормальных клетках свидетельствует о возможности передачи информации от РНК к ДНК. Было установлено, что на определенных стадиях эмбриогенеза в клетках амфибий резко возрастает число генов, кодирующих рРНК (амплификация генов). При этом происходит увеличение числа копий генов рРНК методов обратной транскрипции.

Обратная транскриптаза (ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза) — фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией.

Называется так потому, что большинство процессов транскрипции в живых организмах происходит в другом направлении, а именно, с молекулы ДНК синтезируется РНК-транскрипт.

Обратная транскрипция необходима, в частности, для осуществления жизненного цикла ретровирусов, например, вирусов иммунодефицита человека и Т-клеточной лимфомы человека типов 1 и 2. После попадания вирусной РНК в клетку обратная транскриптаза, содержащаяся в вирусных частицах, синтезирует комплементарную ей ДНК, а затем на этой цепи ДНК, как на матрице, достраивает вторую цепь.

Ретротранспозоны эукариот кодируют обратную транскриптазу, которая используется ими для встраивания в геном хозяина подобно

тому, как это происходит у вирусов. Обратной транскриптазой является также теломераза.

В генетической инженерии обратную транскриптазу используют для получения кДНК — копии эукариотического гена, не содержащей интронов. Для этого из организма выделяют зрелую мРНК, кодирующую соответствующий генный продукт (белок, РНК) и проводят с ней в качестве матрицы обратную транскрипцию. Полученную кДНК можно трансформировать в клетки бактерий для получения трансгенного продукта.

5. Репликативное метилирование ДНК

Метилирование ДНК осуществляется в результате обратимого метилирования цитозина, катализируемого ДНК-метилтрансферазой (рис. 23).

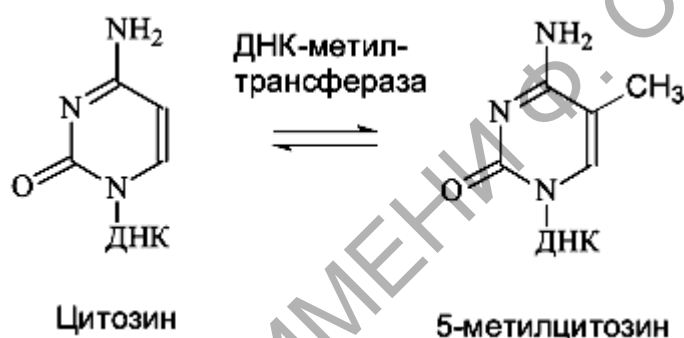


Рисунок 23. Схема метилирования цитозина.

После взаимодействия фермента происходит разрыв водородных связей между цитозином и комплементарным ему основанием гуанином. Затем метилтрансфераза присоединяет метильную группу к цитозину. И далее восстанавливаются водородные связи между метилцитозином и гуанином (рис. 24).



Рисунок 24. Механизм действия ДНК-метилтрансферазы.

Не все остатки цитозина в ДНК метилируются. Метилированию подвергаются только те остатки цитозина, которые находятся рядом с гуанинином – ЦГ.

Метилирование ДНК осуществляется после репликации, поэтому сразу же после удвоения молекула ДНК является полуметилированной – одна цепь метилирована, другая – неметилированная. Через определенное время ДНК-метил-трансфераза восстанавливает исходный рисунок метилирования

Метилирование необходимо для нормального развития организма. Если инактивировать ген метилтрансферазы у мышей, то развитие эмбриона приостановится на ранних стадиях развития. Тем не менее, наличие в составе ДНК метилцитозина опасно для организма, так как при его дезаминировании образуется тимин (рис. 25).

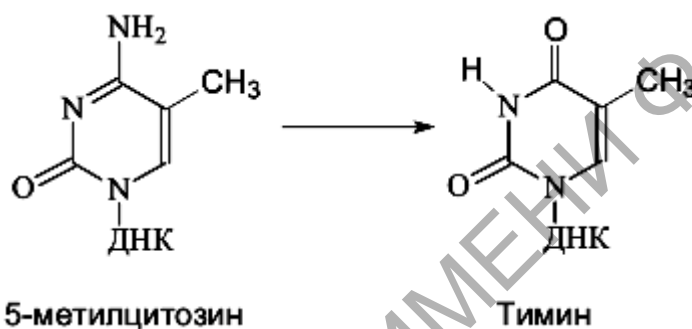


Рисунок 25. Образование тимина при дезаминировании метилцитозина.

Образовавшийся тимин не комплементарен азотистому основанию гуанину, расположенному на противоположной цепи ДНК. В результате в ДНК образуются неспаренные основания и при ее репликации в одной из двух дочерних молекул ДНК пара ЦГ заменится на ТА, т.е. произойдет мутация.

В геноме млекопитающих ЦГ-пары образуют островки, которые часто встречаются в районе промоторов. Метилирование промоторов препятствует образованию транскрипционного комплекса. При этом степень репрессии гена пропорциональна степени метилирования цитозинов. В некоторых случаях метилирование может препятствовать связыванию репрессорного белка с сайленсером. В результате произойдет усиление экспрессии гена.

ЛЕКЦИЯ 5. РЕПАРАЦИЯ ДНК.

- 1 Репарация повреждений ДНК.
2. Световая репарация
- 3 Темновая эксцизионная репарация.
- 4 Пострепликативная репарация.

1. Репарация повреждений ДНК.

Репарацией называется процесс устранения повреждений нуклеотидной последовательности ДНК (рис.26).



Рисунок 26. Стрелками показаны повреждённые хромосомы.

Восстановления структуры ДНК осуществляются особыми ферментативными системами клетки (ферменты репарации). В процессе репарации можно выделить следующие этапы:

- 1) ДНК-репарирующие нуклеазы распознают и удаляют поврежденный участок, в результате чего в цепи ДНК образуется брешь;
- 2) ДНК-полимераза заполняет эту брешь, копируя информацию со второй («хорошей») цепи;
- 3) ДНК-лигаза «сшивает» нуклеотиды, завершая репарацию.

Наиболее изучены три механизма репарации: 1) **фоторепарация** (световая), 2) **эксцизионная** (темновая), или **дорепликативная репарация**, 3) **пострепликативная репарация**.

Изменения структуры ДНК происходят в клетке постоянно под действием реакционно-способных метаболитов, ультрафиолетового излучения, тяжелых металлов и их солей и др.

Считается, что нарушение механизмов репарации ДНК в целом приводит к различным патологическим процессам, в число которых входят канцерогенез, дефекты развития и старение. На сегодняшний день известен ряд наследственных заболеваний, причиной которых служат нарушение репарации ДНК. Дефекты системы эксцизионной репарации нуклеотидов приводят к возникновению пигментной ксеродермы, прогерии, синдрома Кокейна, трихотриодистрофии и др.

Наследственный неполипозный рак толстой кишки может вызываться мутациями некоторых генов системы репарации гетеродуплексов. Многие синдромы предрасположенности к онкологическим заболеваниям – ретинобластома, семейный аденоматозный полипоз и т.п. – связаны с нарушениями систем ответа на повреждение ДНК. Вопрос о том, почему одни повреждения репарируются, а другие нет, остается открытым. Если репарация не наступает, то клетка либо гибнет, либо наступает мутация.

2. Световая репарация.

Начало изучению репарации было положено работами А. Келнера США, который в 1948 году обнаружил явление фотореактивации – уменьшение повреждения биологических объектов, вызываемого ультрафиолетовыми лучами, при последующем воздействии ярким видимым светом.

В 1958 году был выделен фермент – **фотолиаза**, осуществляющий фотореактивацию.

Первоначально способность к репарации была обнаружена у бактерий, подвергавшихся воздействию ультрафиолетового излучения. В результате облучения целостность молекул ДНК нарушалась, так как в ней возникали **димеры** (рис. 27), т. е. сцепленные между собой соединения в области оснований. Димеры образуются между:

- двумя тиминами;
- тиминном и цитозином;
- двумя цитозинами;
- тиминном и урацилом;
- двумя урацилами.

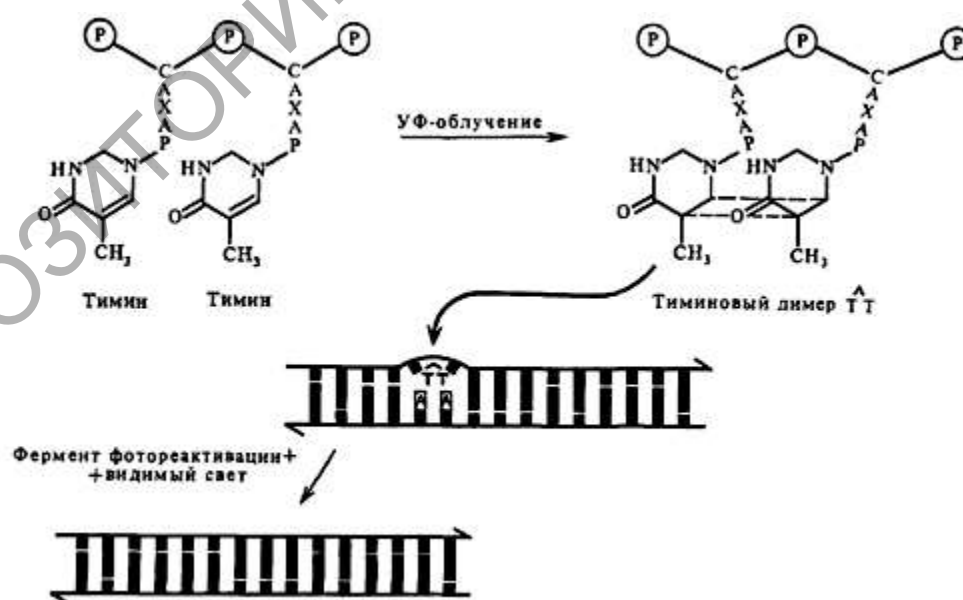


Рисунок 27. Образование димера и его устранение при световой репарации.

Облученные клетки на свету выживали гораздо лучше, чем в темноте. После тщательного анализа причин было установлено, что в облученных клетках на свету происходит репарация. Она осуществляется специальным ферментом, активирующимся квантами видимого света. Фермент соединяется с поврежденной ДНК, разъединяет возникшие в димерах связи и восстанавливает целостность нити ДНК.

Механизм (рис. 28): под влияние УФ-лучей образуются димеры пиримидиновых оснований. Фототиаза расщепляет вновь образующиеся связи между пиримидиновыми основаниями и восстанавливает структуру ДНК. Свет активирует фототиазу, которая узнает димеры облученной ДНК, присоединяется к ним и разрывает возникающие связи.



Рисунок 28. Схема фотореактивации.

Если первоначально способность к фотореактивации была обнаружена у микроорганизмов, то в дальнейшем фотореактивирующие ферменты были найдены в клетках некоторых рыб, птиц, амфибий, насекомых, высших растений и водорослей.

Длительное время этот вид репарации не удавалось обнаружить у млекопитающих и человека. Только в 1969 году было доказано, что способностью к фотореактивации обладают клетки сумчатых животных. Объясняли этот факт особенностями биологии этих древнейших обитателей Земли: полагали, что наличие фотореактивирующего фермента у сумчатых животных имеет исключительную важность, так как только у них (среди других млекопитающих) зародыш подвергается действию солнечного света (в том числе и ультрафиолето-

вого облучения) в процессе переноса его в сумке матери.

Исследования последних лет указывают на возможность наличия фотореактивирующего фермента в клетках кожи человека; может быть, поэтому массивное ультрафиолетовое облучение, например при загаре, не вызывает повреждений генетического аппарата человека.

3 Темновая эксцизионная репарация.

Позднее при изучении генетического контроля чувствительности бактерий к УФ-свету и ионизирующим излучениям была обнаружена темновая репарация – свойство клеток ликвидировать повреждения в ДНК без участия видимого света.

Механизм темновой репарации облученных УФ-светом бактериальных клеток был предсказан *А. П. Говард-Фландерсом* и экспериментально подтвержден в 1964 году *Ф. Ханавальтом* и *Д. Петиджсоном* (США). Было показано, что у бактерий после облучения происходит вырезание поврежденных участков ДНК с измененными нуклеотидами и ресинтез ДНК в образовавшихся пробелах. Специфические ферменты узнают поврежденный участок ДНК и вырезают его.

Механизмы темновой репарации принципиально отличны от механизма фотореактивации. Первое отличие заключается в том, что если во время реакции на свету фотореактивирующий фермент расщепляет сцепленные ультрафиолетовым облучением участки молекулы ДНК, то в ходе темновой репарации поврежденные участки удаляются из молекулы ДНК. Второе отличие связано с числом «вылечиваемых» повреждений. Фотореактивирующий фермент активен в отношении только одного типа повреждений ДНК – образования димеров тимина под действием ультрафиолетового облучения. Ферменты же, осуществляющие темновую репарацию, способны устранять различные структурные нарушения ДНК, появляющиеся вследствие всевозможных воздействий на клетки – и химических, и радиационных. В результате темновой репарации осуществляется своеобразное молекулярное «хирургическое» вмешательство: поврежденные участки «вырезаются», а образовавшиеся «бреши» заполняются путем локального (местного) синтеза или обмена участками между поврежденной и неповрежденной нитями ДНК, в результате чего и восстанавливается ее исходная нормальная структура.

Темновая эксцизионная репарация осуществляется в несколько этапов комплексом из пяти ферментов (рис. 29):

-  узнающего химические изменения на участке цепи ДНК;
-  осуществляющего врезку вблизи поврежденного участка ДНК;
-  удаляющего этот участок;

- ✚ синтезирующего новый участок по принципу комплементарности взамен удаленного фрагмента;
- ✚ соединяющего концы старой цепи и восстановленного участка.

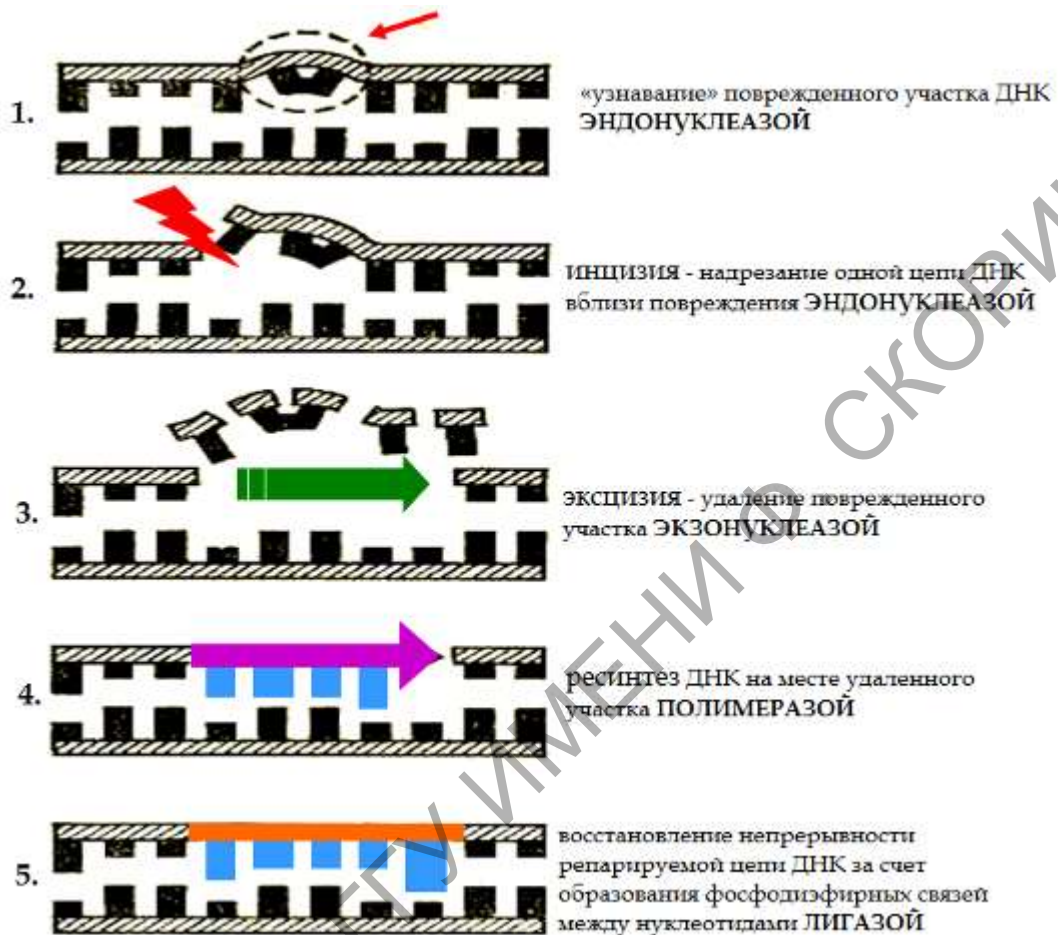


Рисунок 29. Схема темновой эксцизионной репарации.

Таким образом, при световой репарации исправляются повреждения, возникшие только под воздействием ультрафиолетовых лучей. Темновая репарация, в отличие от фотореактивации, универсальна. Она устраняет различные структурные повреждения ДНК, появляющиеся в результате разнообразных радиационных и химических воздействий. Способность к темновой репарации обнаружена у всех клеточных систем и организмов.

Детально изучены два типа темновой репарации – эксцизионная и пострепликативная. При эксцизионной репарации поврежденный участок ДНК вырезается и замещается до начала очередного цикла размножения клетки, точнее до начала удвоения (репликации) молекул ДНК. Биологический смысл этого процесса состоит в том, чтобы предупредить закрепление у потомства наследственных изменений (мутаций) и последующее размножение измененных форм.

Эксцизионная репарация – наиболее экономичная и эффективная

форма генетической репарации. Установлено, что при ее нормальном функционировании у микроорганизмов до начала репликации ДНК удаляется до 90% имеющихся генетических повреждений, из клеток высших организмов – до 70%.

4 Пострепликативная репарация.

Пострепликативная репарация или **SOS-репарация** была открыта в клетках *E.coli*, не способных выщеплять тиминовые димеры. Тип репарации, имеющей место в тех случаях, когда процесс эксцизионной репарации недостаточен для полного исправления повреждения: после репликации с образованием ДНК, содержащей поврежденные участки, образуются одноцепочечные бреши, заполняемые в процессе гомологичной рекомбинации при помощи белка RecA.

Это единственный тип репарации, не имеющий этапа узнавания повреждения. При ней индуцируется синтез белка, который присоединяется к ДНК-полимеразному комплексу и делает возможным строить дочернюю ДНК напротив дефектных звеньев матричной цепи. В результате ДНК удвоена, с ошибкой, но это дает провести клеточное деление.

Пострепликативная репарация – последняя возможность для клетки устранить имеющиеся генетические повреждения, защитить потомство от изменения наследственных признаков. Если в ДНК возникает так много повреждений, что в ходе эксцизионной репарации клетка не успевает их полностью устранить, или если повреждены гены, определяющие возможность эксцизионной репарации, то в процессе размножения (удвоения, репликации) ДНК в дочерних нитях на месте повреждений, имеющихся в материнской нити, образуются «бреши». Это происходит в силу того, что фермент, ведущий репликацию ДНК (синтез дочерней нити на материнской нити ДНК), не может «прочитать» искаженную информацию в поврежденной точке материнской нити. Поэтому, доходя до поврежденного места, оставшегося неисправленным во время эксцизионной репарации, этот фермент останавливается, затем медленно (со скоростью в сотни раз меньшей, чем обычно) проходит через зону повреждения и возобновляет нормальный синтез дочерней нити, отступая от этого места. Так происходит во всех точках, где материнская нить ДНК остается поврежденной к началу репликации.

Конечно, если число повреждений слишком велико, репликация останавливается полностью и клетка погибает. Но и существовать с молекулами ДНК, несущими бреши, клетка долго не может. Поэтому после репликации, но перед делением клетки начинается процесс пострепликативной репарации. Перед делением клетки в ней образу-

ются две двунитевые молекулы ДНК. Если одна из них несет в какой-либо точке повреждение в одной нити и брешь в противоположной нити, то в другой двунитевой молекуле ДНК обе нити в данной точке будут нормальными. В этом случае может произойти обмен участками ДНК – рекомбинация: неповрежденный участок будет вырезан из нормальной молекулы ДНК и вставлен на место поврежденного участка в другой молекуле, благодаря чему поврежденный генетический материал будет заменен нормальным. Вслед за этим специальные ферменты (ДНК-полимеразы) заделают «бреши» (теперь они смогут это сделать, т. к. в обеих молекулах в данном месте повреждения будут отсутствовать), вновь синтезированные и старые нити будут соединены друг с другом, и исходная структура ДНК будет в результате этого полностью восстановлена (рис. 30).

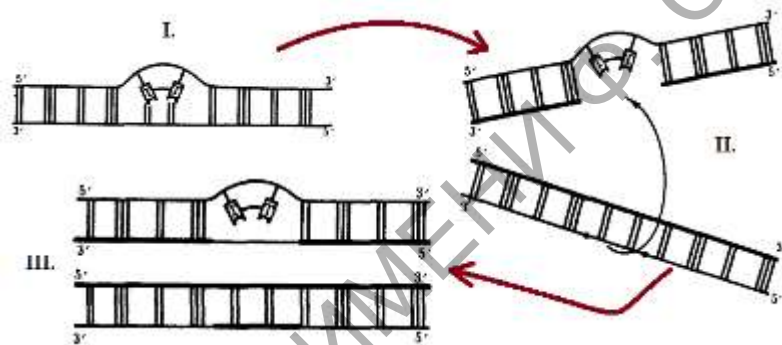


Рисунок 30. Схема пострепликативной репарации ДНК: I – возникновение тиминового димера в одной из цепей ДНК; II – образование «бреши» во вновь синтезируемой цепи против измененного участка материнской молекулы после репликации (стрелкой показано последующее заполнение «бреши» участком из соответствующей цепи второй дочерней молекулы ДНК); III – восстановление целостности дочерней цепи верхней молекулы за счет рекомбинации и в нижней молекуле за счет синтеза на комплементарной цепи.

В соответствии с природой процесса, связанного с осуществлением рекомбинации, этот тип пострепликативной репарации называют также рекомбинационным.

ЛЕКЦИЯ 6. РЕКОМБИНАЦИЯ И ТРАНСПОЗИЦИЯ ДНК

1. Понятие рекомбинации.
2. Общая, гомологичная, или законная рекомбинация.
3. Сайт-специфическая рекомбинация.
4. Случайная, негомологичная или незаконная рекомбинация.
5. Транспозиция

1. Понятие рекомбинации. *Генетическая рекомбинация* — это важный процесс реорганизации генетического материала, обусловленный обменом отдельными сегментами двойных спиралей ДНК, приводящий к возникновению новых комбинаций генов. Она получила развитие у всех живых организмов: у эукариот, у бактерий и даже у вирусов, в том числе таких, генетический материал которых представлен РНК.

Рекомбинация может происходить путем обмена клеточными ядрами, целыми молекулами ДНК или частями молекул. В то время как процессы репликации и репарации ДНК обеспечивают воспроизведение и сохранение генетического материала, рекомбинация приводит к генетической изменчивости.

Генетическая рекомбинация состоит в образовании ковалентных связей между нуклеотидными последовательностями из разных областей одной и той же или разных молекул ДНК. В процессе рекомбинации с помощью ферментов две спирали ДНК разрываются, обмениваются участками, после чего непрерывность спиралей восстанавливается.

Рекомбинация между близко расположенными гомологичными хромосомами приводит к интенсивной перестановке отцовских и материнских генов в ходе мейоза и тем самым создает предпосылки для эволюционной проверки новых сочетаний этих генов в потомстве. Как правило, рекомбинационные события, происходящие в соматических клетках либо во время репликации ДНК, либо после нее и проявляющиеся в виде обмена сестринских хроматид, не приводят к изменению генотипа или фенотипа клетки.

Существуют 3 типа рекомбинации:

- 1) общая, гомологичная, или законная
- 2) сайт-специфическая,
- 3) случайная, негомологичная или незаконная.

2. Общая, гомологичная, или законная рекомбинация

В основе молекулярного механизма законной генетической рекомбинации лежит принцип "разрыв-воссоединение" двух гомологичных молекул ДНК. Этот процесс называют кроссинговер, он включает несколько промежуточных этапов:

- 1) узнавание участков;
- 2) разрыв и **реципрокное** (крест-накрест) воссоединение молекул (рис. 31): замена одних цепей гомологичными;

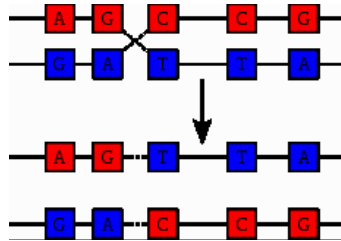


Рисунок 31. Разрыв и реципрокное (крест-накрест) воссоединение молекул

- 3) устранение ошибок, возникающих в результате неправильного спаривания участков.

Гомологичная рекомбинация начинается с возникновения в одном или обоих дуплексах участков из одиночных цепей ДНК, которые затем с помощью специальных белков находят комплементарные последовательности в гомологичном дуплексе и образуют с ними **гетеродуплекс** (рис. 32) — ключевой промежуточный продукт (интермедиат) рекомбинации.

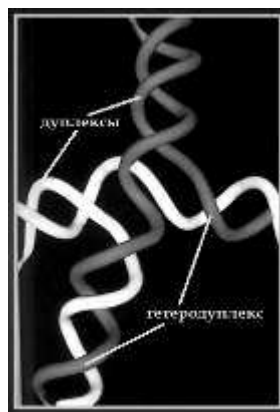


Рисунок 32. Схема спаривания двух гомологичных спиралей и образование гетеродуплекса.

Конечным результатом рекомбинации будет обмен равными частями гомологичных молекул.

Обычно общая рекомбинация происходит между гомологичными и аллельными участками разных молекул ДНК, но она может произойти и между гомологичными, но неаллельными областями реком-

бинирующих молекул. В этом случае один из продуктов рекомбинации утрачивает часть ДНК, а другой приобретает "лишний" сегмент. Такой процесс получил название **неравного кроссинговера**. Иногда рекомбинация происходит между неаллельными участками одной и той же хромосомы с соответствующей потерей области, лежащей между сайтами рекомбинации.

В отличие от уже рассмотренных случаев некоторые рекомбинационные события нересципрокны; как следствие, один из образовавшихся продуктов идентичен одной из исходных молекул, а другой отличается от обоих партнеров. Такой процесс часто называется **генной конверсией**.

Модель Холлидея

Рассмотрение гомологичной рекомбинации невозможно без общей модели кроссинговера, опубликованной в 1964 году американским генетиком Р. Холлидеем. Она разработана для мейотического кроссинговера.

Ядро мейотической клетки в профазе I содержит по четыре гомологичных хроматиды – **дуплексы**, но в каждом отдельном акте кроссинговера участвуют только две из них. В принципе для того, чтобы гомологичные молекулы ДНК поменялись своими частями, сначала должны произойти разрывы во всех цепях обоих дуплексов, а уже потом – обмен цепями и замыкание разрывов. У Холлидея разрывы происходят не одновременно, а в два этапа. Рекомбинация начинается с первичных одноцепочечных разрывов фосфодиэфирных связей ДНК (их вносит фермент эндонуклеаза). Разрывы происходят в двух цепях одинаковой полярности. Холлидей также постулировал, что первичные разрывы возникают не в случайных, а в определенных сайтах ДНК. Впоследствии эта идея получила экспериментальное подтверждение. Далее от точек первичных разрывов происходит обмен цепями между дуплексами, который приводит к образованию крестообразной структуры, получившей впоследствии название "полухиазма Холлидея" (рис. 33).



Рисунок 33. Разрывы в дуплексах (слева) и образование "полухиазмы Холлидея" (справа).

Такое название объясняется тем, что в полухиазме в обмен вовлечены только две цепи ДНК из четырех, что отличает ее от полной хиазмы – характерного продукта заверщенного мейотического кроссинговера.

Затем происходит очень важный процесс – перемещение точки перекреста цепей в полухиазме вдоль рекомбинирующих дуплексов. Такое явление описано под названием "миграция ветвления" (рис. 34).

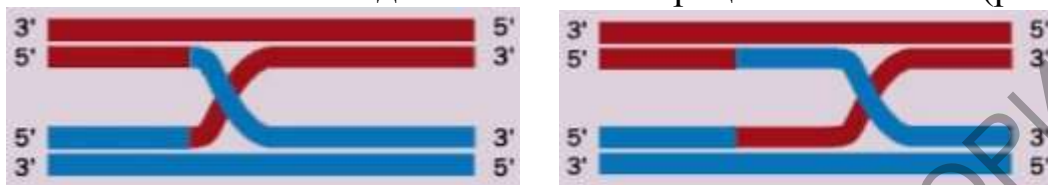


Рисунок 34. "Миграция ветвления".

Оно заключается в следующем: от точки перекреста цепей происходит расплетание исходных дуплексов и высвобождающиеся цепи тут же ренатурируют с комплементарными цепями из гомологичных дуплексов, что приводит к образованию и последующему удлинению гетеродуплекса (В / b). Именно в удлинении гетеродуплекса и заключается биологический смысл миграции ветвления. Ее осуществляют специальные ферменты. Размеры гетеродуплекса при мейотическом кроссинговере колеблются от нескольких сот до одной тысячи п.н., при рекомбинации в соматических клетках и клетках прокариот он еще протяженнее.

Гетеродуплекс сформирован. Образовавшаяся сложная разветвленная структура должна разделиться на гомологи. Это называется разрешением полухиазмы (рис. 35).

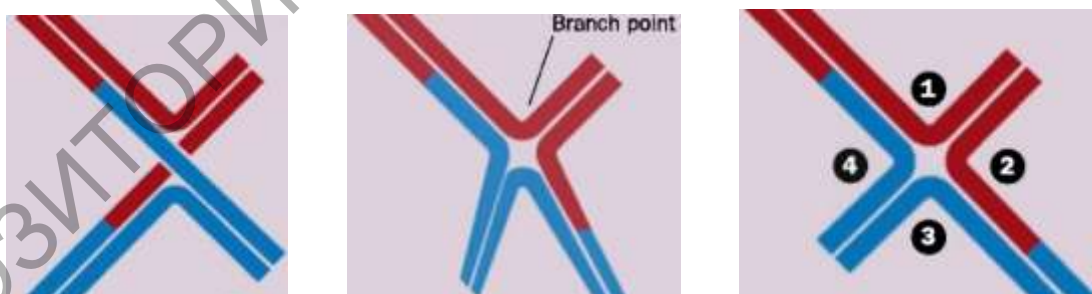


Рисунок 35. Разрешение полухиазмы.

Для разрешения необходимы еще два разрыва цепей: вторичные разрывы завершат обмен цепями. Но прежде чем это случится, полухиазма должна претерпеть еще одно превращение – изомеризацию. Структура с перекрещенными цепями может существовать в различных стереоизомерных формах, возникающих в результате вращения составляющих ее элементов относительно друг друга. **Изомеризация** заключается в изменении структуры полухиазмы, которое происходит

за счет обычного теплового движения молекул. Структуры в и в' идентичны. В структуре в' происходит один поворот на 180 любой пары дуплексных сегментов (плеч).

Изомеризация, которая как и другие стадии рекомбинации контролируется генетически, изменяет положение двух пар цепей: две ранее перекрещивавшиеся цепи становятся неперекрещивающимися и наоборот.

Для того чтобы вновь восстановились две отдельные спирали ДНК и тем самым прекратился процесс спаривания, в каждой из двух перекрещенных цепей должен произойти разрыв. Если он происходит до того, как прошла изомеризация, то две исходные спирали ДНК отделяются друг от друга так, что у каждой из них генетически перестроенной оказывается только одна цепь. Если же разрыв двух перекрещенных цепей происходит после изомеризации, то обе молекулы ДНК претерпевают полную реорганизацию: часть каждой исходной спирали оказывается присоединенной (ступенчатым соединением) к части другой спирали.

Образовавшаяся структура может разрешиться двумя парами вторичных разрывов. Парные разрывы цепей одинаковой полярности 1-1 или 2-2 приводят к двум типам рекомбинантных хроматид: хроматиды первого типа содержат внутренний гетеродуплекс В / b, а по конфигурации фланговых маркеров А и С не отличаются от исходных (некроссоверные хроматиды); рекомбинантные хроматиды второго типа кроссоверные, они также содержат гетеродуплекс, но обмениваются частями по обе стороны от него (рис. 36).

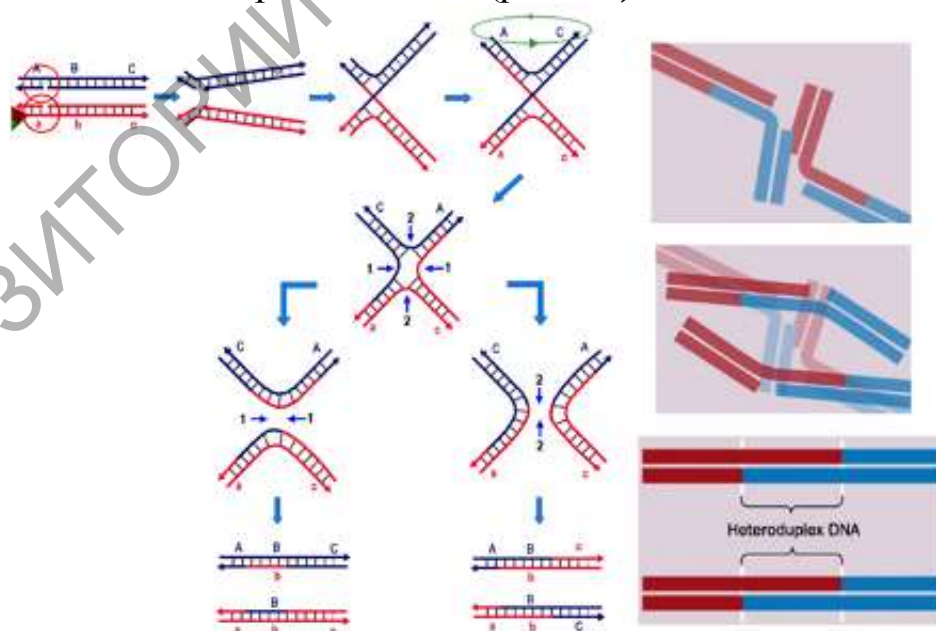


Рисунок 36. Изомеризация полухиазмы.

Оба типа продуктов рекомбинации равновероятны, что соответ-

ствуется генетическим данным, на которые опирался Холлидей при создании своей модели.

Законная генетическая рекомбинация приводит к возникновению новых комбинаций специфических аллелей, но не изменяет места расположения генов (локусов). От исходных молекул в рекомбинационный гетеродуплекс могут войти разные аллели, и тогда в нем возникнут неспаренные основания, которые локально нарушают структуру двойной спирали ДНК. Эти нарушения узнаются специальными ферментными системами, работающими по типу эксцизионной репарации. Они проводят коррекцию неспаренных оснований в гетеродуплексе: удаляют неспаренное основание в одной цепи ДНК и застраивают образующуюся брешь по матрице другого аллеля в комплементарной цепи, тем самым превращая (конвертируя) один аллель в другой. Это явление было давно известно под названием "**конверсия гена**", в её основе лежит коррекция гетеродуплекса.

Если гетерозиготная клетка A/a вступает в мейоз, то в норме среди продуктов мейоза оба аллеля гена A будут представлены в равном соотношении: $2A : 2a$. Однако если в районе хромосомы, где расположен ген A , произойдет кроссинговер, то сформируется гетеродуплекс A/a с локально неспаренными основаниями, что может привести к конверсии гена A : расщепление аллелей гена среди продуктов мейоза будет $3A : 1a$ или $1A : 3a$. Расщепление по генам, расположенным вне участка кроссинговера, сохранит нормальное соотношение аллелей $2 : 2$. При разборе модели Холлидея становится ясно, что содержащие гетеродуплекс продукты рекомбинации с кроссинговером и без кроссинговера по внешним генам равновероятны, иными словами, конверсия гена в мейозе может одинаково часто сопровождаться и не сопровождаться обменом по внешним генам.

Модель Холлидея симметрична: первичные разрывы возникают одновременно в обоих гомологах и обмен цепями происходит синхронно. Однако имеются генетические данные об асимметричных обменах, полученные, в частности, на дрожжах. В этих случаях первичный разрыв возникает только в одном дуплексе, затем от точки разрыва отделяется одна цепь ДНК, которая внедряется в гомологичный дуплекс и в ходе последующей миграции ветвления вытесняет из него цепь той же полярности. После этого обмен превращается в симметричный.

Модель Холлидея в ее современном виде общепризнанна и универсальна для про- и эукариот (и для половых, и для соматических клеток). Ее достоинством является тот факт, что она хорошо проверяется генетическими данными, и практически все ее этапы постепенно

нашли экспериментальное подтверждение. Полухиазмы Холлидея хорошо видны под электронным микроскопом. Обнаружены специальные эндонуклеазы (их называют резолвазами), которые осуществляют разрешение полухиазмы. К настоящему времени такие резолвазы обнаружены у бактериофагов Т4 и Т7, *E. coli*, дрожжей и человека. У *E. coli* выявлены также белки, осуществляющие миграцию ветвления полухиазмы.

3. Сайт-специфическая рекомбинация. Рекомбинация называется сайт-специфической, если сайты разрыва и воссоединения в двух рекомбинирующих молекулах или двух фрагментах одной и той же молекулы ДНК находятся в пределах довольно коротких специфических гомологичных нуклеотидных последовательностей (как правило, не более 25 нуклеотидов). Следовательно, сайт-специфическая рекомбинация происходит между специфическими сегментами дуплексов ДНК, не имеющими протяженных гомологичных участков. Такие короткие последовательности может иметь только один из партнеров или оба. В качестве примера первого варианта можно привести транспозиции некоторых мобильных элементов у про- и эукариот, а второго (рис. 37) – встраивание кольцевой ДНК фага λ в генофор *E. coli* и ее обратное выщепление.

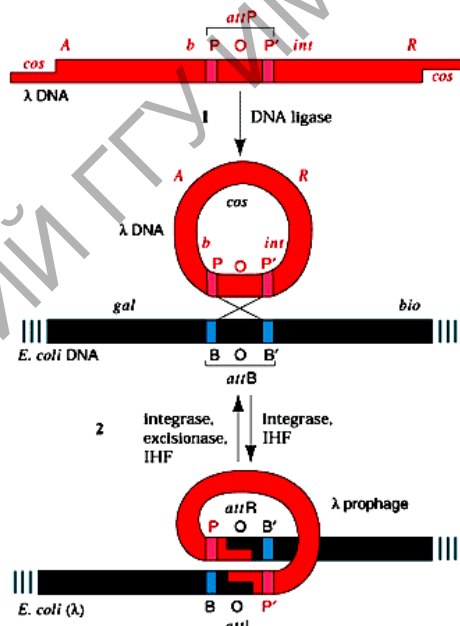


Рисунок 37. Механизм сайт-специфической рекомбинации.

Рекомбинация происходит в пределах специфической нуклеотидной последовательности ДНК фага λ (attP-сайт) и уникальной последовательности ДНК *E. coli* (attB-сайт). Нуклеотидные последовательности attP- и attB-сайтов совершенно различны, хотя имеют общее ядро (O) протяженностью в 15 нуклеотидных пар. AttP (P O P') простирается на 150 нуклеотидов влево (P) и на 75 нуклеотидов вправо (P')

от общего ядра, а attB (BOB') – это сегмент длиной всего около 25 нуклеотидов, включая и ядро.

Поскольку нуклеотидные последовательности, фланкирующие attP- и attB-сайты слева (attL) и справа (attR), для этих сайтов различаются, механизм рекомбинационного выщепления ДНК фага λ из ДНК *E. coli* должен отличаться от механизма их рекомбинационной интеграции. И действительно, для рекомбинации между attL и attR при исключении фаговой ДНК помимо белка Int необходимы фаговый белок χ is и клеточный белок HF. Процесс рекомбинационного выщепления, по-видимому, имеет некоторое сходство с процессом интеграции, но роль указанных трех белков, особенно белка χ is, все еще изучается.

С помощью сайт-специфической рекомбинации происходят запрограммированные перестройки хромосомной ДНК при смене типов спаривания у дрожжей; она ответственна также за разнообразие анти-тел.

4. Случайная, негомологичная или незаконная рекомбинация. Изначально, термин незаконная рекомбинация был определен Франклином как рекомбинация между последовательностями с небольшими участками гомологии или не имеющими гомологии.

В настоящее время имеет смысл принять более широкое определение, которое исключает рекомбинационные события, являющиеся результатом нормальной или законной транспозиционной деятельности или деятельности специализированных рекомбинационных систем (например, инсерция и высвобождение ДНК). Франклин рассматривал, что незаконная рекомбинация может быть следствием ошибок в белках, ответственных за разрезание и сшивание или репликацию ДНК.

Незаконная генетическая рекомбинация имеет выраженный локальный характер. В этом случае весь процесс с его начальным этапом узнавания, который сводит вместе две спирали ДНК, направляется особым рекомбинационным ферментом; спаривания оснований здесь не требуется (даже в тех случаях, когда это все-таки происходит, в процессе участвует не более несколько пар оснований). К негомологичной рекомбинации можно отнести интеграцию транспозонов, процесс случайного встраивания вирусной или плазмидной ДНК в ДНК клеток животных.

При незаконной генетической рекомбинации в обмен вступают короткие специфические нуклеотидные последовательности одной или обеих спиралей ДНК, участвующих в этом процессе. Таким образом, такая генетическая рекомбинация изменяет распределение нук-

леотидных последовательностей в геноме – соединяются участки ДНК, которые до этого не располагались в непрерывной последовательности рядом друг с другом. Подобный обмен гетерологическими участками ДНК приводит к возникновению вставок, делеций, дупликаций и транслокаций генетического материала.

У эукариот перемещения разных генетических элементов, сопряженные с незаконной генетической рекомбинацией, осуществляются преимущественно не в мейозе, когда контактируют парные хромосомы, а во время обычных клеточных циклов (митозе). Незаконная генетическая рекомбинация играет важную роль в эволюционной изменчивости, так как благодаря ей осуществляются самые разнообразные, нередко кардинальные, перестройки генома и, следовательно, создаются предпосылки для качественных изменений в эволюции данного организма.

4. Транспозиция. В результате транспозиции (особых рекомбинационных процессов) происходит перемещение мобильных генетических элементов из одного участка молекулы ДНК в другой участок или другую молекулу ДНК. Мобильные элементы характерны как для прокариот, так и для эукариот. Они, как правило, построены из центральной части, на флангах которой расположены обращенные или прямые концевые повторы (рис. 38).



Рисунок 38. Схематическое изображение организации мобильных элементов

В центральной области обычно присутствует ген(ы), ответственный(ые) за транспозицию. Встраивание мобильных элементов в результате транспозиции чаще всего не является специфичным и происходит в случайные участки ДНК. Большинство мобильных элементов с обеих сторон ограничены короткими прямыми повторами ДНК-мишени (обычно 5 или 9 п.н.), возникшими в результате дупликации ДНК-мишени при транспозиции элемента.

Различают следующие основные механизмы транспозиции: репликативная транспозиция, нерепликативная транспозиция и ретро-

транспозиция (перемещение ретротранспозонов – мобильных элементов эукариот, ограниченных длинными концевыми прямыми повторами). При репликативной транспозиции происходит удвоение (репликация) мобильного элемента. Одна из его копий остается в исходном месте, другая перемещается в другую молекулу ДНК (рис. 39 А). В этом случае вместе с перемещением мобильного элемента происходит и увеличение число его копий. В процессе нереплекативной транспозиции происходит вырезание элемента и встраивание его в новый участок ДНК (рис. 39 Б).

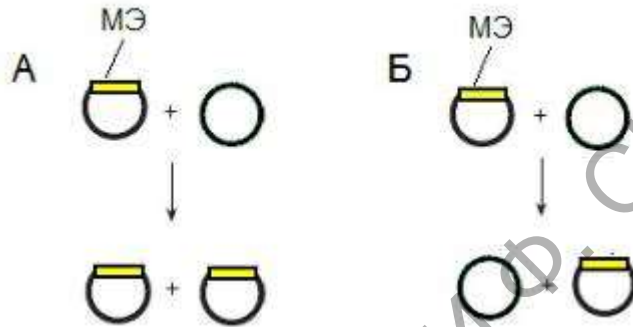


Рисунок 39. Репликативная (А) и нерепликативная транспозиции, МЭ – мобильный элемент

Такая транспозиция не связана с увеличением числа копий мобильного элемента. В ретротранспозиции принимают участие белки, закодированные в мобильном элементе, – интегразы и обратная транскриптаза (ревертаза). Они закодированы в одном гене и синтезируются в составе единого предшественника, который затем разрезается на индивидуальные белки с помощью специфической протеазы. Механизм ретротранспозиции представлен на рис. 40.



Рисунок 40. Ретротранспозиция

В начале в результате транскрипции ретротранспозона образуется его РНК-копия. Затем последняя транспортируется из ядра в цитоплазму, где при участии обратной транскриптазы используется в качестве матрицы для синтеза ДНК-копии мобильного элемента, которая далее переносится в ядро клетки и с помощью интегразы встраивается в новый участок ДНК. Таким образом, посредством ретро-транспозиции данные мобильные элементы распространяются по геному.

Транспозиции от гомологичной рекомбинации отличаются отсутствием гомологий между мобильным элементом и его участком встраивания, а от сайт-специфической рекомбинации – тем, что встраивание мобильного элемента происходит в случайные участки ДНК.

ЛЕКЦИЯ 7. ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК У ПРОКАРИОТ

1. Характеристика процесса транскрипции. Стадии транскрипции.
2. Строение РНК-полимеразы прокариот. Организация промотора.
3. Позитивная и негативная регуляция транскрипции у прокариот.

1. Характеристика процесса транскрипции.

Открытие процесса транскрипции. Э. Волкин и Л. Астрахан в 1956 г. обнаружили, что при заражении бактериальных клеток бактериофагом Т2, последние начинают синтезировать новые типы РНК, сходные по нуклеотидному составу с ДНК бактериофага.

С. Бреннер, Ф. Жакоб и М. Мезельсон в 1961 г. поставили эксперимент, показывающий, что после инфицирования бактерий *E. coli* бактериофагом Т2 происходит синтез большого количества нового типа РНК, которая была названа матричной или информационной.

РНК-полимераза у бактерий была открыта независимо Сэмом Вайссом и Джерардом Хурвицем в 1960 г.

Транскрипция – синтез РНК на матрице ДНК, протекающий в соответствии с принципом комплементарности. В результате транскрипции образуется РНК, комплементарная одной из цепей (матричной) ДНК (рис. 41).



Рисунок 41. Схема транскрипции.

Катализирует матричный синтез РНК фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза, осуществляя копирование не всей, а только части матричной цепи ДНК. Транскрибируемый фрагмент ДНК ограничен со стороны 3'-конца промотором – участком, с которым связывается РНК-полимераза и затем начинает синтез, а со стороны 5'-конца – терминатором – участком, в котором заканчивается синтез РНК. Последовательность ДНК, ограниченная промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции – транскриптон.

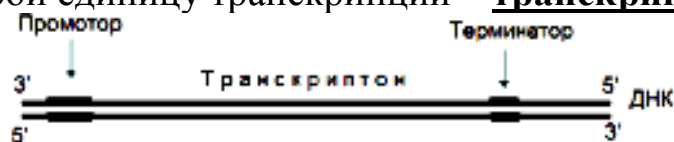


Рисунок 42. Структура транскриптона.

Транскриптом прокариот называют также опероном. Транскриптом эукариот, как правило, содержит только один ген, в то время как в составе оперона прокариот присутствуют обычно несколько генов.

В процессе транскрипции выделяют три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию (рис. 43).

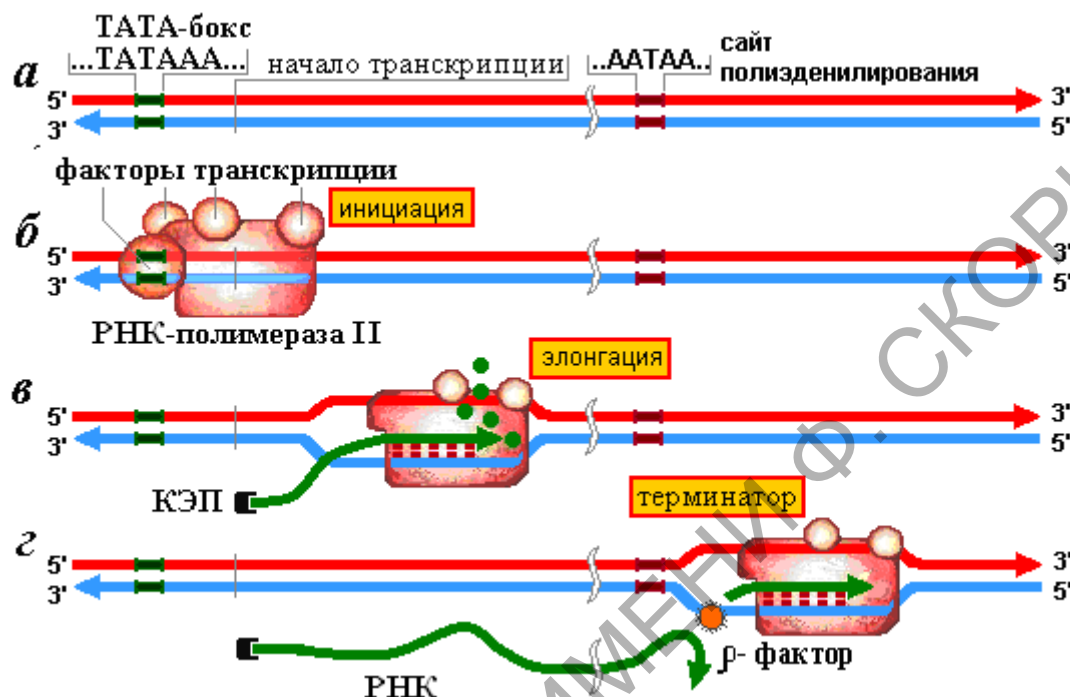


Рисунок 43. Схематическое изображение этапов транскрипции.

На стадии инициации РНК-полимераза взаимодействует с промотором. В этом участке происходит раскручивание и плавление ДНК и РНК-полимераза начинает синтез молекулы РНК. После образования первых фосфодиэфирных мостиков между рибонуклеотидами стадия инициации заканчивается.

В процессе следующей стадии – элонгации – происходит удлинение цепи РНК. При этом новосинтезированная цепь РНК образует короткие отрезки гибридной двойной спирали ДНК-РНК, которые необходимы для правильного копирования матричной цепи ДНК.

Как только РНК-полимераза приблизится к терминатору, начинается последняя стадия – терминация, в результате которой завершается транскрипция и освобождается вновь синтезированная молекула РНК – транскрипта.

2. Строение РНК-полимеразы прокариот. Организация промотора. Прокариоты содержат одну РНК-полимеразу, состоящую из нескольких субъединиц, обозначаемых буквами греческого алфавита α , β , β' и β (рис. 44). РНК-полимераза может существовать в двух формах – в форме холофермента, его субъединичный состав выражается формулой $\alpha_2\beta\beta'\beta$, и кор-фермента – $\alpha_2\beta\beta'$.

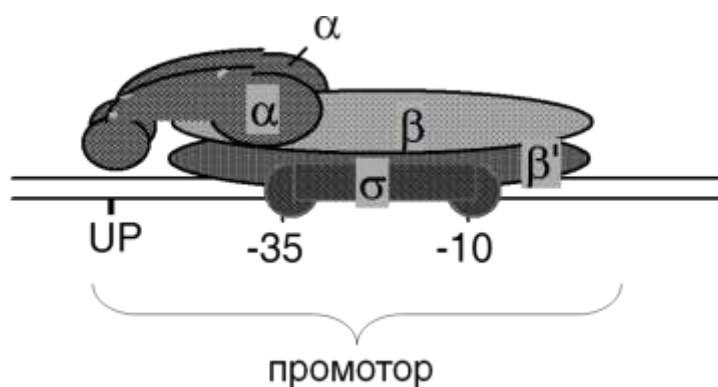


Рисунок 44. РНК-полимераза прокариот.

Только холофермент может инициировать синтез РНК. После инициации транскрипции б-субъединица отделяется и элонгацию осуществляет корфермент. Таким образом, б-субъединица, или ее еще называют б-фактор, необходима для узнавания промотора. β-субъединица участвует в связывании НТФ, β'-субъединица взаимодействует с ДНК, комплекс α2β' специфически связывается с промоторными нуклеотидными последовательностями. При взаимодействии с ДНК РНК-полимераза «закрывает» участок размером 60 п.н.

В клетке *E. coli* присутствуют несколько б-факторов, они ответственны за узнавание РНК-полимеразой различных промоторов. Как правило б-факторы узнают блоки, отстоящие от точки начала транскрипции приблизительно на 10 и 35 нуклеотидов. Эти блоки имеют консервативные (общие для всех в пределах одной группы промоторов) нуклеотидные последовательности (рис. 45).



Рисунок 45. Организация промотора.

Номером +1 обозначается нуклеотид матричной цепи, с которого начинается транскрипция. Нуклеотиды, стоящие перед ним, имеют отрицательные номера, после него – положительные. Последовательность ТАТААТ называется ТАТА-блоком или Прибнов-блоком. Последовательность ТТГАЦА называется блоком -35. Различные б-факторы отвечают за узнавание различных групп промоторов и обеспечивают транскрипцию определенных генов (табл. 3).

σ-факторы <i>E. coli</i>	Последовательность -35	Последовательность -10
σ70	TTGACA	TATAAT
σ32	TCTC-CCCTTGAA	CCCCAT-TA
σ54	(-24) CTGG-A	(-12) TTGCA

Таблица 3. Последовательности, узнаваемые сигма-факторами.

Инициация транскрипции включает образование комплекса РНК-полимераза (холофермент)-ДНК, после чего происходит синтез коротких олигорибонуклеотидов (рис. 46).

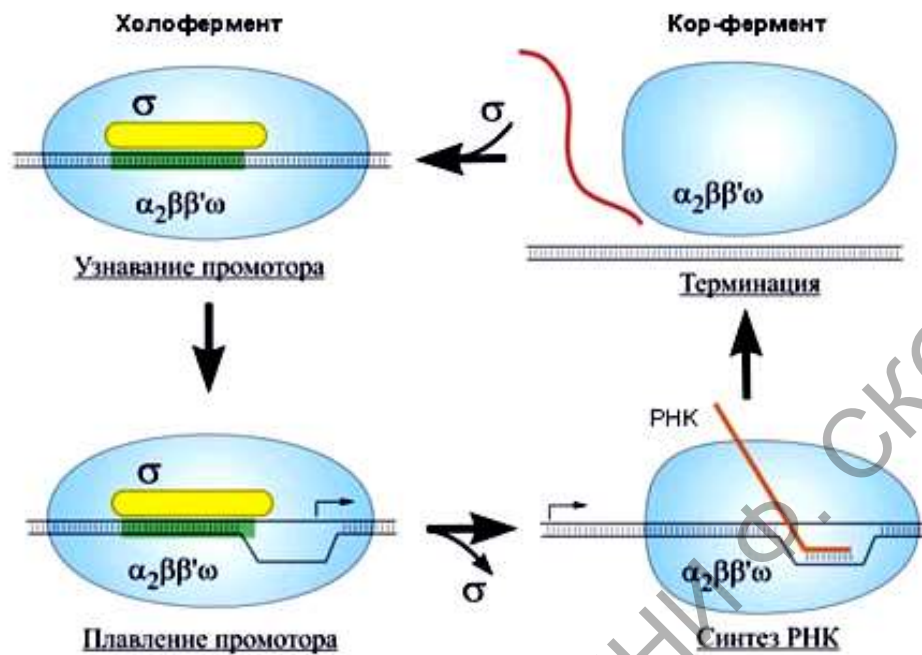


Рисунок 46. Схема транскрипционного цикла прокариот.

После того, как синтезируется фрагмент РНК более 9 нуклеотидов, σ -фактор холофермента необратимо диссоциирует и транскрипция вступает в стадию элонгации. Элонгацию осуществляет кор-фермент – $\alpha_2\beta\beta'$.

В процессе элонгации транскрипции образуется дуплекс РНК-ДНК, размер которого составляет около 12 пар нуклеотидов.

Кор-фермент способен синтезировать РНК со скоростью около 40 нуклеотидов в секунду.

При достижении терминатора кор-фермент завершает синтез РНК. У прокариот существует два типа терминаторов: ро-зависимые и ро-независимые. На ро-зависимых терминаторах терминация осуществляется в присутствии белкового ро-фактора.

Такая терминация носит название ро-зависимой терминации. Терминация транскрипции на независимых от ро-фактора терминаторах называется ро-независимой терминацией.

Ро-независимая терминация обеспечивается образованием шпильки на РНК в процессе транскрипции и следующей за ней олигоуридиловой последовательностью (рис. 47). Шпилька приводит к паузе в транскрипции, а олигоуридил-олигоадениловый дуплекс, как наименее стабильный, диссоциирует во время паузы.

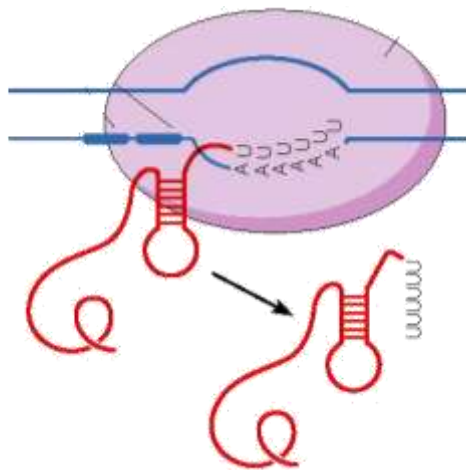


Рисунок 47. Ро-независимая терминация транскрипции.

В случае ро-зависимой терминации на синтезируемой РНК находится участок, с которым взаимодействует ро-фактор (рис. 48).

Ро-фактор является НТФазой и способен использовать энергию гидролиза НТФ для движения по молекуле РНК от места посадки, расположенного в области 5'-конца РНК, в сторону ее 3'-конца. Как только ро-фактор «догонит» работающую РНК-полимеразу, происходит терминация транскрипции.

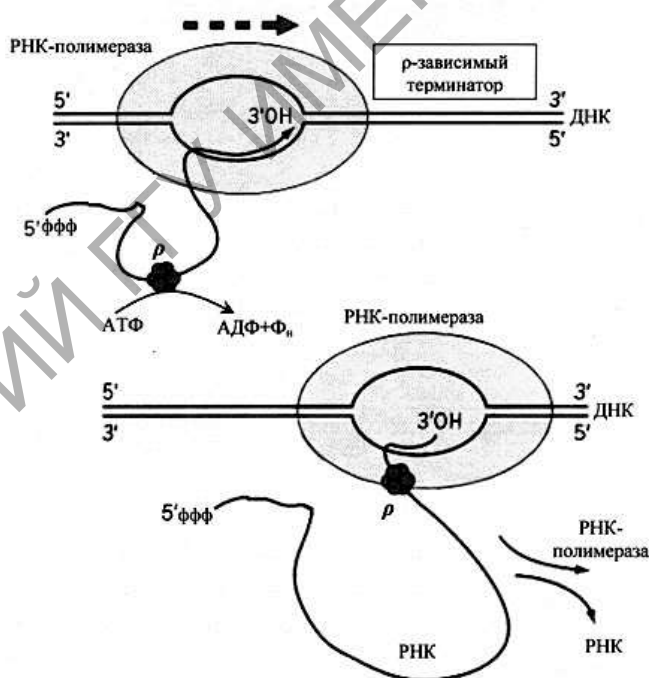


Рисунок 48. Ро-зависимая терминация транскрипции.

3. Позитивная и негативная регуляция транскрипции у прокариот.

Среди нескольких уровней регуляции экспрессии генов наиболее существенной и часто используемой является регуляция синтеза ферментов, которая осуществляется на уровне транскрипции. Суть такого типа регуляции сводится к ускорению или замедлению процессов

транскрипции определенных генов, что в конечном итоге отражается на скорости синтеза их продуктов. Различают позитивную и негативную регуляцию транскрипции.

Негативная регуляция предусматривает торможение инициации транскрипции за счет связывания с операторной областью белков-репрессоров; позитивная регуляция — наоборот, охватывает события «включения» транскрипции, которые также обуславливаются присоединением к **оператору** специфических белков (в данном случае их называют **активаторами**).

Схема негативной регуляции транскрипции у прокариот на примере лактозного оперона.

Лактозный оперон *E.coli* содержит регуляторную область (промотор и оператор) и три структурных гена: *lacZ* (кодирует структуру β -галактозидазы), *lacY* (определяет структуру β -галактозидпермеазы) и *lacA* (структура β -галактозидтрансацилазы) (рис. 49). Названные ферменты обуславливают перенос в клетку дисахарида лактозы и расщепление ее на глюкозу и галактозу. Транскрипция структурных генов лактозного оперона осуществляется согласованно: гены *lacZ*, *lacY* и *lacA* транскрибируются в одну полицистронную мРНК, которая транслируется с образованием почти одинаковых количеств каждого из ферментных белков. Недалеко от лактозного оперона на хромосоме *E. coli* располагается ген *I*, кодирующий структуру **белка-репрессора**. Этот белок в свободном состоянии имеет сродство к операторной области *lac*-оперона.

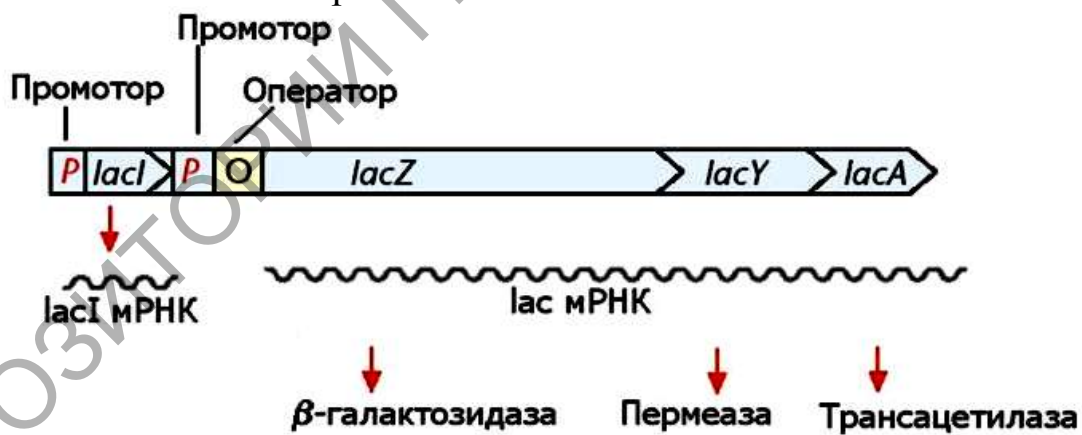


Рисунок 49. Лактозный оперон *E. coli* (*lac*) и тесно сцепленный с ним ген *lac*-репрессора (*lac I*): P — промотор, O — оператор.

Когда клетки кишечной палочки выращиваются на среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода, они содержат очень мало белков — продуктов структурных генов лактозного оперона: примерно по 10 молекул на клетку. В присутствии лактозы и других β -галактозидов концентрация этих белков возрастает до 10 000 и более молекул на клетку. В этом случае лактоза (β -галактозиды)

служит **индуктором** синтеза названных ферментов, и это означает, что соответствующий оперон регулируется по типу индукции, т. е. кодируемые им ферменты синтезируются только в присутствии индуктора.

Ген-регулятор, находящийся обычно на некотором расстоянии от оперона, постоянно активен, и на основе его информации синтезируется особый белок-репрессор. Последний способен блокировать ген-оператор, вступая с ним в химическое взаимодействие, и тогда считывание информации со структурных генов не происходит, т.е. оперон «не работает».

Если в клетку поступает индуктор (вещество, которое расщепляется под действием ферментов, закодированных в данном опероне), то он связывает белок-репрессор, освобождая ген-оператор.

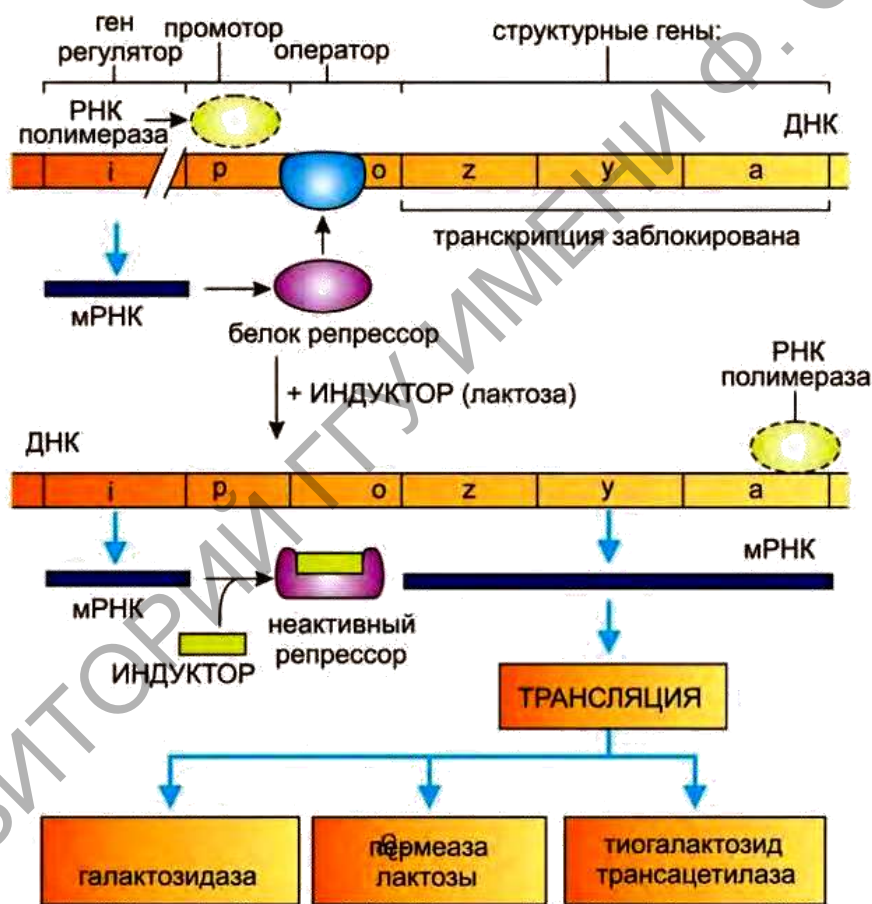


Рисунок 50. Схема негативной регуляции транскрипции на примере лактозного оперона.

РНК-полимераза разрывает связи между двумя цепочками ДНК, начиная с промотора, и по принципу комплементарности генетическая информация (порядок нуклеотидов) с кодирующей цепочки структурных генов переписывается на и-РНК – происходит транскрипция.

Затем иРНК, поступает в рибосомы, где синтезируются ферменты, разлагающие индуктор. Когда последние молекулы индуктора будут разрушены, освобождается белок-репрессор, который снова блокирует ген-оператор. Работа оперона прекращается, а при поступлении нового индуктора возобновляется.

Для каждого оперона имеется свой специфический индуктор (корепрессор). Например, для лактозного оперона индуктором является лактоза.

В случае *репрессии* белок, кодируемый геном-регулятором приобретает способность блокировать ген-оператор только в соединении с корепрессором (оперон перестает «работать»). В опероне синтеза триптофана у *E. coli*. имеется 5 цистронов, которые кодируют ферменты последовательной цепи реакций синтеза триптофана. В норме оперон включен. Белок - репрессор неактивен (в форме апо-репрессора), он не способен садиться на оператор. Клетке нужно N молекул триптофана. $N+1$ -ая молекула взаимодействует с апо-репрессором. Он меняет конформацию, садится на оператор и синтез РНК прекращается.

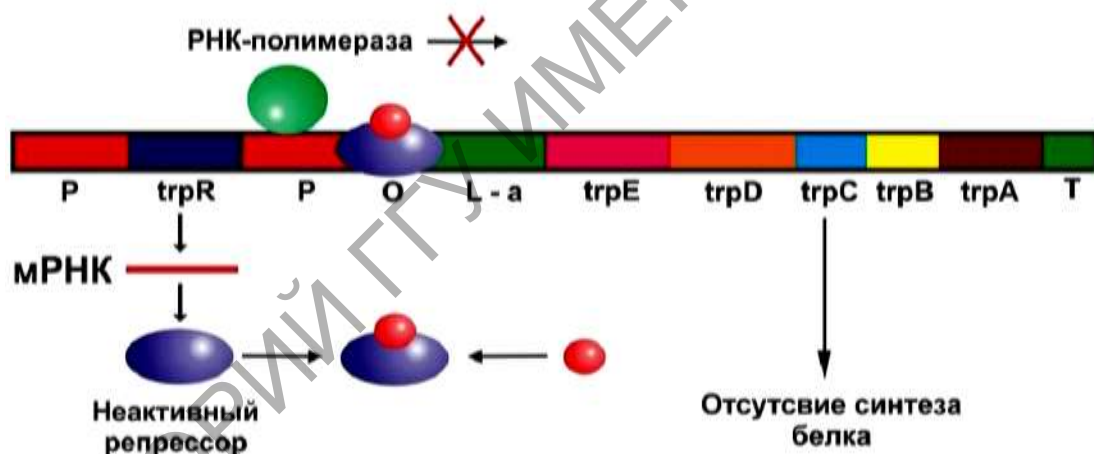


Рисунок 51. Схема негативной репрессии на примере триптофанового оперона.

ЛЕКЦИЯ 8. ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК У ЭУКАРИОТ

1. Типы РНК-полимераз у эукариот.
2. Регуляция транскрипции у эукариот. Сайленсеры и энхансеры.
3. Нематричный синтез РНК

1. Типы РНК-полимераз у эукариот.

В клетках эукариот синтез РНК осуществляют три ядерных РНК-полимеразы:

- а) РНК-полимераза I транскрибирует гены рРНК – 18S, 28S и 5,8S;
- б) РНК-полимераза II транскрибирует гены иРНК; 56
- с) РНК-полимераза III транскрибирует гены тРНК, 5S рРНК и мяРНК.

РНК-полимеразы эукариот в отличие от РНК-полимераз прокариот не способны самостоятельно инициировать синтез РНК. Только при наличии особых белков – факторов транскрипции – они приобретают способность осуществлять данный процесс.

Кроме ядерных РНК-полимераз у эукариот в митохондриях и хлоропластах присутствуют другие РНК-полимеразы.

РНК-полимераза I

РНК-полимераза I эукариот является большим ферментом, состоящим не менее чем, из 11 субъединиц, и транскрибирующим гены рРНК. Гены рРНК представлены в геноме клетки большим числом копий и кодируют три наиболее крупных рРНК – 18S, 5,8 S и 28S.

Гены рРНК расположены в виде серии тандемных повторов, отделенных друг от друга спейсером (рис. 52).

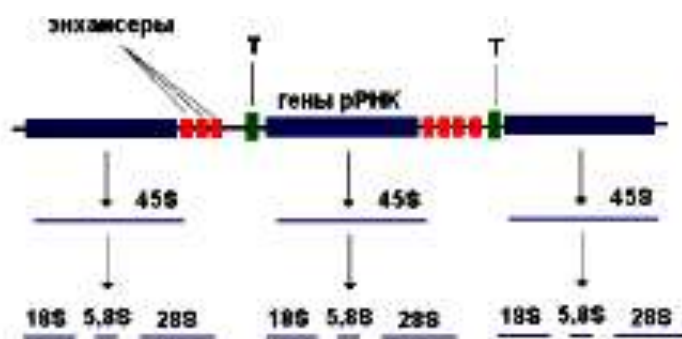


Рисунок 52. Строение гена рРНК.

В конце спейсера находится сайт терминации (Т), он же отвечает и за реинициацию синтеза нового транскрипта. После освобождения транскрипта в сайте терминации РНК-полимераза I остается связан-

ной с ДНК, и затем при участии белкового фактора начинает синтез нового транскрипта.

В спейсере имеются энхансеры (40 – 60 п.н.), активирующие транскрипцию в десятки раз. Степень активации пропорциональна числу энхансеров.

Рибосомные гены транскрибируются в ядрышках в виде единого 45S-РНК транскрипта (13000 нуклеотидов). После синтеза 45S-РНК расщепляется с образованием 28S-РНК (около 5000 нуклеотидов), 18S-РНК (около 2000 нуклеотидов) и 5,8S-РНК (около 160 нуклеотидов).

Транскрипция генов рРНК соответствует 50 – 70 % от общего объема клеточной транскрипции.

У человека гаплоидные клетки содержат около 200 генов рРНК, которые распределены в виде небольших кластеров по пяти хромосомам. 5S рРНК кодируется другими генами и транскрибируется РНК-полимеразой III.

РНК-полимераза II

РНК-полимераза II ответственна за синтез иРНК и состоит из более, чем 10 субъединиц. Тем не менее, она не в состоянии самостоятельно осуществлять транскрипцию. Для ее работы требуется дополнительно десятки белковых молекул, так называемых факторов транскрипции.

В узнаваемом РНК-полимеразой II промоторе в пределах 100-200 п.н. перед стартом транскрипции обнаружены канонические нуклеотидные последовательности: ТАТА, СААТ, GC -блоки и др. В различных промоторах могут присутствовать разные блоки, расположенные в различном порядке относительно друг друга и на разных расстояниях от точки начала транскрипции. Неодинаковая структура промоторов обуславливает различия в экспрессии генов (рис. 53).



Рисунок 53. Условная схема расположения нуклеотидных последовательностей в промоторах для РНК-полимеразы II

РНК-полимераза III

РНК-полимераза III транскрибирует гены 5S рРНК, тРНК и нескольких мяРНК. Эти три класса генов используют свои собственные классы промоторов. Промоторы, узнаваемые РНК-полимеразой III, находятся внутри генов тРНК и 5S рРНК. В случае генов тРНК промоторы состоят из двух блоков: 1-й блок начинается через 8 – 30 п.н. после точки начала транскрипции и представлен в усредненном виде

последовательностью TGGCNNAGTGG, 2-й блок находится на расстоянии +51...+72 и его усредненная последовательность – GGTTCGANNCC (N – любой нуклеотид).

Что касается генов, кодирующих мРНК, то их промоторы расположены перед точкой начала транскрипции. У большинства генов этого класса промоторы состоят из ТАТА-блока с центром в положении -30 и из второго блока с центром в положении -60.

2. Регуляция транскрипции у эукариот. Сайленсеры и энхансеры.

Особую роль в регуляции скорости транскрипции играют полинуклеотидные последовательности – энхансеры и сайленсеры. С энхансерами взаимодействуют белки-активаторы, которые, контактируя с РНК-полимеразой, активируют ее, в результате транскрипция генов усиливается. С сайленсерами же взаимодействуют белки-ингибиторы, оказывающие тормозящее действие на активность РНК-полимеразы и снижающие скорость транскрипции (рис 54.).

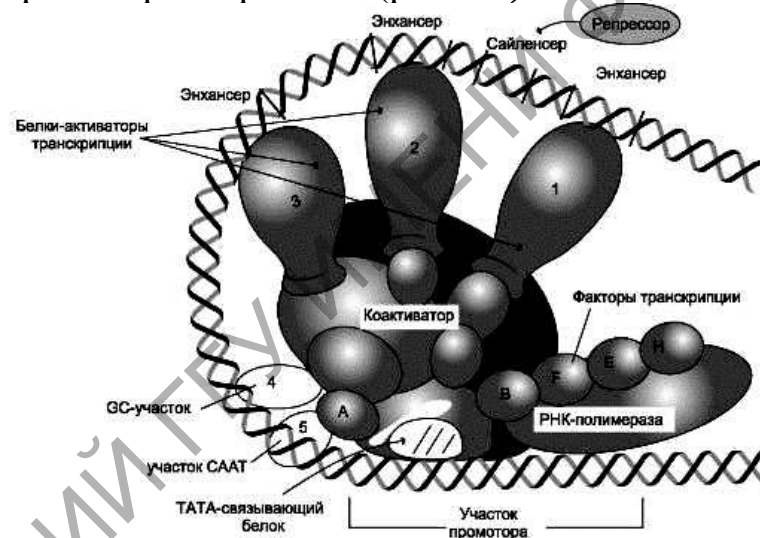


Рисунок 54. Регуляция транскрипции у эукариот.

Энхансеры могут занимать различное положение относительно гена. Чаще они располагаются перед геном за несколько сот и даже за несколько тысяч п.н. В то же время энхансеры обнаружены в интронах. Иногда они находятся за геном. Свойствами энхансера могут обладать и кодирующие последовательности. В некоторых случаях интенсивность транскрипции гена может контролироваться несколькими энхансерами. Граница энхансера бывает размыта – удаление нуклеотидных последовательностей постепенно снижает его активность. Однако энхансеры могут содержать блоки, мутации в которых резко снижают их активность. Энхансеры можно переносить от одного гена к другому. Энхансеры в зависимости от регуляторного фактора могут вести себя как сайленсеры.

Организация сайленсеров имеют много общего с организацией энхансеров.

3. Нематричный синтез РНК.

Существуют ферменты способные синтезировать РНК в отсутствие матрицы. К ним относится полинуклеотидполимераза и полиаденилатполимераза.

Полинуклеотидполимераза – встречается у бактерий и использует в качестве субстратов рибонуклеозид-5'-дифосфаты (НДФ) – АДФ, ЦДФ, ГДФ и УДФ. Этот фермент катализирует реакцию, которую в общем виде можно представить так:



Реакция обратима. Фермент катализирует образование 3'-5'-фосфодиэфирных связей.

НТФ и дезоксинуклеотидтрифосфаты полинуклеотидполимераза в качестве субстратов для синтеза РНК использовать не может.

Полиаденилатполимераза обеспечивает синтез полиА-последовательности на 3'-конце иРНК. В качестве субстрата использует АТФ и РНК.

Фермент катализирует образование 3'-5'-фосфодиэфирных связей.

Транскрипция является одним из сложнейших биологических процессов, играющих центральную роль в реализации генетической информации. В его осуществлении принимают участие многочисленные белковые молекулы. Для транскрипции нужны:

- 1) матрица - ДНК
- 2) фермент – РНК-полимераза
- 3) мономеры- активированные нуклеотиды

ЛЕКЦИЯ 9. ПРОЦЕССИНГ РНК

1. Сплайсинг молекул РНК
2. Процессинг иРНК
3. Процессинг тРНК
4. Процессинг рРНК

Процессингу подвергаются различные виды РНК: иРНК, рРНК, тРНК и др. Наиболее ярко посттранскрипционные модификации РНК выражены у эукариот. У прокариот процессинг РНК необходим при образовании зрелых молекул рРНК и тРНК.

1. Сплайсинг молекул РНК. Многие гены эукариот состоят из экзонов (кодирующих последовательностей) и интронов (некодирующих) последовательностей. При транскрипции таких генов РНК, содержащая в своем составе как экзоны, так и интроны. Образовавшийся первичный транскрипт подвергается процессу, в результате которого интроны вырезаются, а экзоны, сшиваясь, образуя зрелую РНК. Данный процесс получил название сплайсинг (рис. 55).



Рисунок 55. Сплайсинг молекул РНК.

Сплайсингу подвергаются предшественники различных эукариотических РНК: иРНК, тРНК, рРНК. У эукариот в предшественниках иРНК (пре-РНК) интроны вырезаются в сплайсосомах – комплексах, состоящих из мяРНК и белков. Интроны на границах с экзонами имеют канонические последовательности на 5'-конце – ГУ, на 3'-конце – АГ. Они также содержат последовательности, необходимые для удаления: акцепторный сайт, донорный сайт и бранч-сайт. мяРНК в соответствии с правилом комплементарности и белки, взаимодействуя с этими сайтами, обеспечивают удаление интронов (рис. 56).

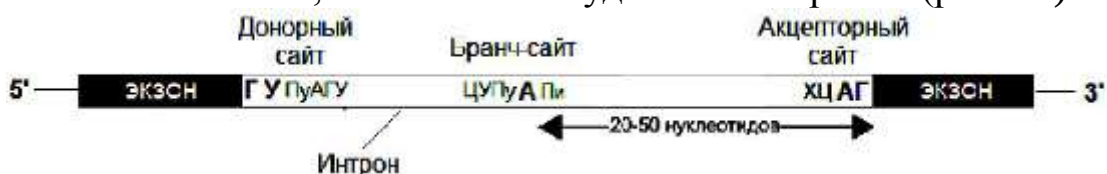


Рисунок 56. Строение интрона.

Процесс удаления интронов включает:

- а) разрыв молекулы РНК на границе интрон-экзон со стороны 5'-конца интрона;
- б) образование сложноэфирных связей между фосфатной группой первого нуклеотида интрона (Г) и гидроксильной группой рибозы (у 2' атома углерода) аденозина, входящего в состав бранч-сайта. Сформировавшаяся структура напоминает лассо;
- в) удаление и последующее разрушение интрона;
- г) воссоединение экзонов посредством образования фосфоэфирных связей (рис. 57).

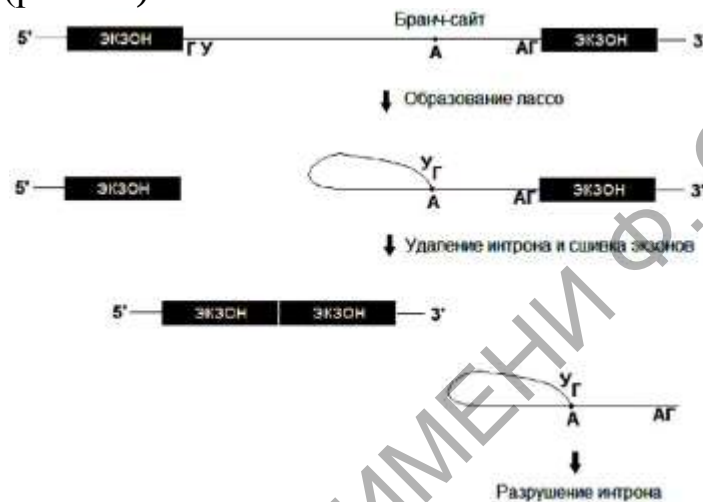


Рисунок 57. Удаление интронов из мРНК.

Следует также отметить, что у первичных транскриптов в митохондриях и хлоропластах, а также у предшественников дрожжевых тРНК канонические последовательности ГУ– АГ на границе интрон-экзон отсутствуют.

Альтернативный сплайсинг

Определенные полинуклеотидные последовательности РНК в одних случаях могут выступать в качестве интрона, в других – в качестве экзона. В связи с этим сплайсинг РНК может осуществляться альтернативными путями. Образовавшиеся в результате альтернативного сплайсинга зрелые РНК будут отличаться друг от друга первичной структурой (рис. 58).



Рисунок 58. Альтернативный сплайсинг.

Такие РНК будут иметь, как идентичные, так и свои собственные фрагменты полинуклеотидных последовательностей.

Альтернативный сплайсинг обеспечивает образования разнообразных белков с одного и того же первичного транскрипта. Например, в клетках щитовидной железы в результате транскрипции определенного гена и последующего сплайсинга образуется иРНК, служащая матрицей для синтеза гормона кальцитонина, ответственного за регуляцию обмена кальция. В мозге же из первичного транскрипта, считанного с этого же гена, вследствие альтернативного варианта сплайсинга образуется иРНК, кодирующая белок, отвечающий за восприятие вкуса.

В случае альтернативного сплайсинга экзоны обычно выстраиваются в той же ориентации, в какой они располагались в гене.

Транс-сплайсинг – форма сплайсинга, при которой соединяются экзоны разных РНК (рис. 59).

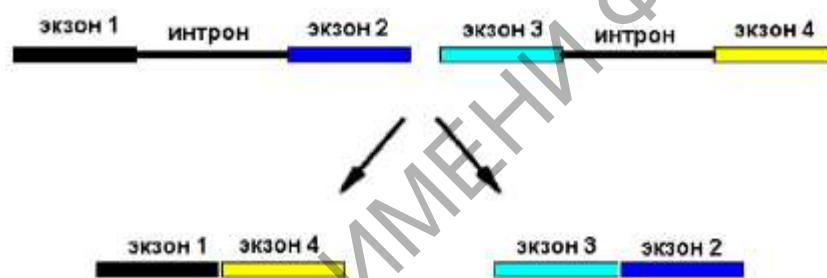


Рисунок 59. Транс-сплайсинг.

Аутосплайсинг (самосплайсинг) – сплайсинг первичного транскрипта РНК, происходящий без участия каких-либо ферментов, т.е. РНК сама является катализатором этого процесса. Так у инфузории *Tetrachylena thermophyla* образуется 35S предшественник рРНК (пре-рРНК) длиной 6400 нуклеотидов. Без участия белков из этой пре-рРНК вырезается интрон длиной 414 нуклеотидов. При этом два экзона сшиваются с образованием 26S рРНК (рис. 60).

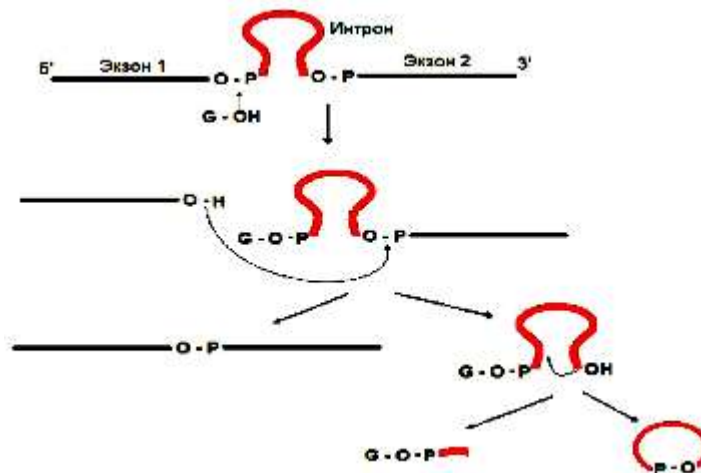


Рисунок 60. Аутосплайсинг рРНК у *Tetrachylena thermophyla*

Для протекания сплайсинга необходимо присутствие нуклеотида содержащего гуанин (ГТФ, или ГДФ, или ГМФ, или гуанозин). На 3'-гидроксильную группу этого гуанинового нуклеотида переносится фосфатная группа 5'-конца интрона. Затем образовавшаяся на конце первого экзона 3'-гидроксильная группа используется для присоединения к 5'-концу второго экзона посредством фосфодиэфирной связи. Вырезание интрона сопровождается его циклизацией и удалением из его состава небольшого фрагмента, содержащего тот гуаниновый нуклеотид, который использовался для инициации сплайсинга

Интроны, аналогичные интронам *Tetrachymena thermophyla*, встречаются в пре-рРНК митохондрий, хлоропластов, грибов.

2. Процессинг иРНК.

Процессинг РНК – это комплекс последовательных процессов образования зрелых, функционально активных молекул РНК в клетке.

Прокариотическая иРНК, как правило, процессингу не подвергается, потому что процессы транскрипции и трансляции у них сопряжены. Еще до завершения транскрипции с иРНК, синтезируемой РНК-полимеразой, взаимодействуют рибосомы, которые и начинают синтез полипептидных цепей – таким образом транскрипция и трансляция в прокариотах могут происходить одновременно.

В эукариотических клетках эти процессы пространственно разделены (транскрипция в ядре, а трансляция в цитоплазме клетки), а первичный транскрипт (про-иРНК) для получения функционально зрелой иРНК должен быть подвергнут процессингу. Только после этого иРНК транспортируется в цитоплазму из ядра.

Процессинг иРНК включает в себя несколько операций. Помимо сплайсинга, которому подвергается 95% иРНК, обязательными являются кэпирование иРНК (100%) и полиаденилирование (95%) иРНК.

Процессинг 5'-конца – кэпирование – заключается в том, что как только 5'-конец растущей РНК выходит из РНК-полимеразы, он немедленно кэпируется особыми ферментами.

Кэп (от англ. cap, "шапочка") образуются в результате присоединения метилированного гуанозинтрифосфата (ГТФ) (7-метилгуанилат) в необычной 5'–5' позиции к 5'-концу иРНК.

Функции кэпа:

- 1) защищает иРНК в цитоплазме от действия экзонуклеаз;
- 2) помогает связыванию молекулы иРНК с малой субъединицей рибосомы в процессе трансляции.

Процессинг 3'-конца про-иРНК – полиаденилирование – заключается в разрезании её специфической эндонуклеазой вблизи поли(А)-точки – **ААУАА-последовательности** и присоединении к освободившемуся 3'-ОН концу поли(А)-цепочки из 100–250 адениннуклео-

тидов с помощью фермента *поли(А)-полимеразы*. Время жизни иРНК коррелирует с длиной поли(А)-хвоста. По мере участия иРНК в процессах трансляции, длина полиА фрагмента уменьшается. Критическим для стабильности считается 30 адениловых нуклеотидов.

Финальный этап процессинга про-иРНК – это сплайсинг.

Зрелая иРНК транспортируется из ядра в цитоплазму клетки, где она служит матрицей для синтеза белка (рис. 61).

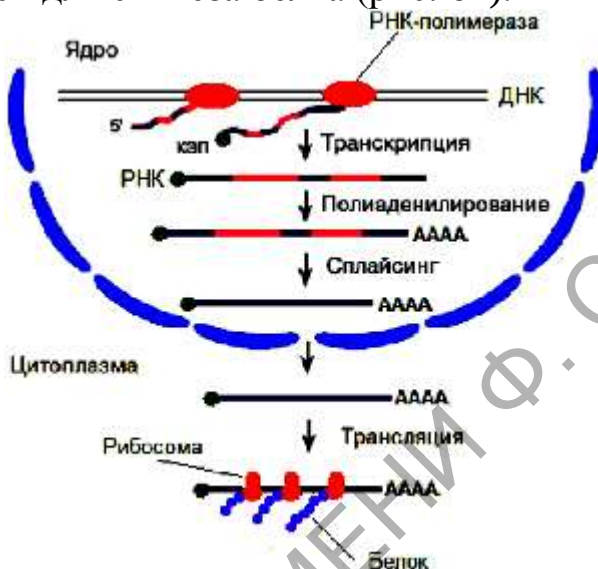


Рисунок 61. Процессинг иРНК прокариот.

3. Процессинг тРНК. Почти все тРНК синтезируются в виде предшественников – более длинных молекул (пре-тРНК). В результате процессинга происходит удаление нуклеотидных последовательностей с флангов пре-тРНК (рис. 62). С 5'-конца фрагмент нуклеотидной цепи отщепляет фермент, называемой РНКазой Р. РНКазой Р является рибонуклеопротеином, каталитическую функцию в котором осуществляет РНК-компонент, белок же выполняет структурную роль.

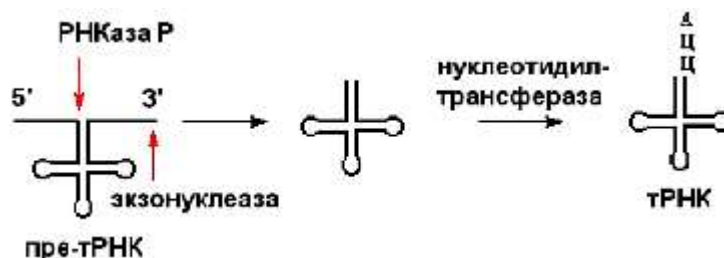


Рисунок 62. Общая схема процессинга тРНК.

В бактериальной РНКазе Р есть участок, комплементарный ЦЦА участку тРНК. Эукариотическая РНКазы Р узнает другие элементы предшественника тРНК. С 3'-конца пре-тРНК действует экзонуклеаза, укорачивающая РНК постепенно, удаляя по одному нуклеотиду. На заключительных стадиях созревания тРНК к 3'-концу полинуклеоти-

дилтрансфераза присоединяет последовательность ЦЦА.

У эукариот ЦЦА-последовательность не кодируется в генах тРНК, она добавляется посттранскрипционно.

4. Процессинг рРНК. Поцессинг необходим для созревания как прокариотических рРНК, так и эукариотических.

Прокариоты

Образование рРНК у прокариот происходит в результате процес-синга первичного транскрипта (30 S), содержащего в своем составе нуклеотидные последовательности всех трех 16S, 23S и 5S рРНК, а также тРНК. При созревании из первичного транскрипта происходит вычленение индивидуальных рРНК и тРНК (рис. 63).

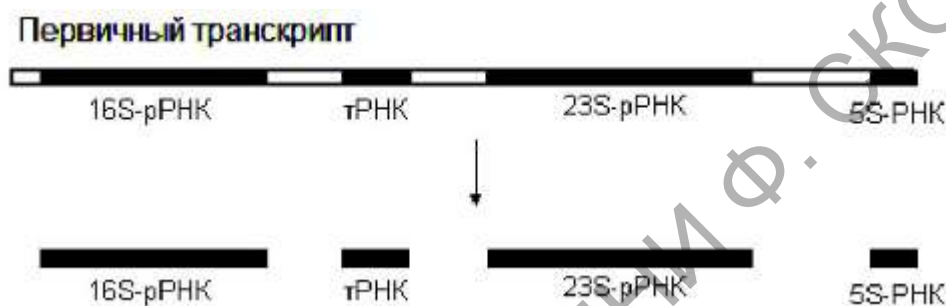


Рисунок 63. Процессинг рРНК прокариот

Эукариоты

Большие рРНК млекопитающих 18S, 5,8S и 28S синтезируются в составе единого первичного транскрипта, обозначаемого 45S-РНК. 45S-РНК во время транскрипции метилируется. Метилированию подвергаются главным образом остатки рибозы. Из 45S-РНК вырезаются индивидуальные рРНК, которые затем при участии 5S рРНК формируют рибосомы (рис. 64).

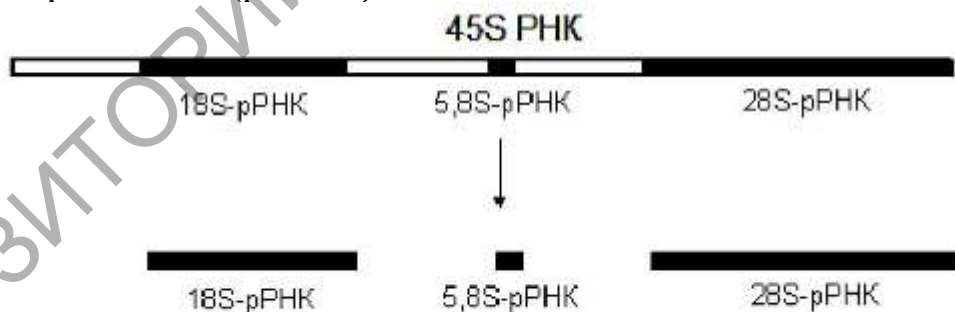


Рисунок 64. Процессинг рРНК млекопитающих.

У некоторых примитивных эукариот в составе первичного транскрипта нуклеотидные последовательности, соответствующие 26S РНК, содержат интрон. В результате процессинга из первичный транскрипта не только вырезаются индивидуальные рРНК, но и удаляется интрон посредством аутосплайсинга (рис. 65).

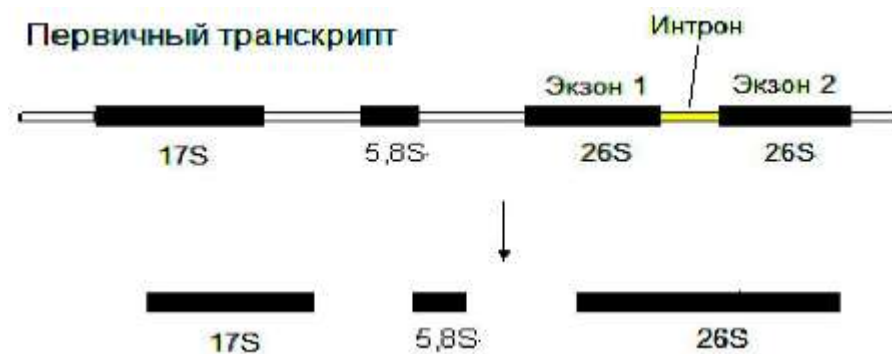


Рисунок 65 . Процессинг рРНК *Tetrachylena thermophyla*.

Таким образом, существование различных видов РНК в клетках живых существ обуславливает протекание важнейших биологических процессов, связанных, прежде всего, с реализацией генетической информации закодированной в ДНК. Для приобретения функциональной активности РНК в большинстве случаев должна подвергнуться сложнейшим посттранскрипционным модификациям. Только иРНК прокариот для проявления своих биологических свойств, как правило, не нуждается в процессинге.

ЛЕКЦИЯ 10. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

1 Этапы расшифровки генетического кода

2 Основные свойства генетического кода и кодового словаря

1 Этапы расшифровки генетического кода. Многообразие жизни обусловлено разнообразием белковых молекул, выполняющих различные биологические функции. Структура белков определяется набором и порядком расположения аминокислот в пептидных цепях. Набор и порядок аминокислот в пептидных цепях зашифрованы в молекуле ДНК с помощью генетического кода. Генетический код – это единая система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в ДНК или мРНК, которая определяет последовательность аминокислот в белке.

Идея о том, что гены контролируют структуру белков, впервые была высказана в 1902 г. Арчибальдом Гэрродом, изучавшим алкаптонурию – врожденное наследственное заболевание, при котором организм не расщепляет гомогентизиновую кислоту, что приводит к серьезным нарушениям метаболизма (рис. 66).

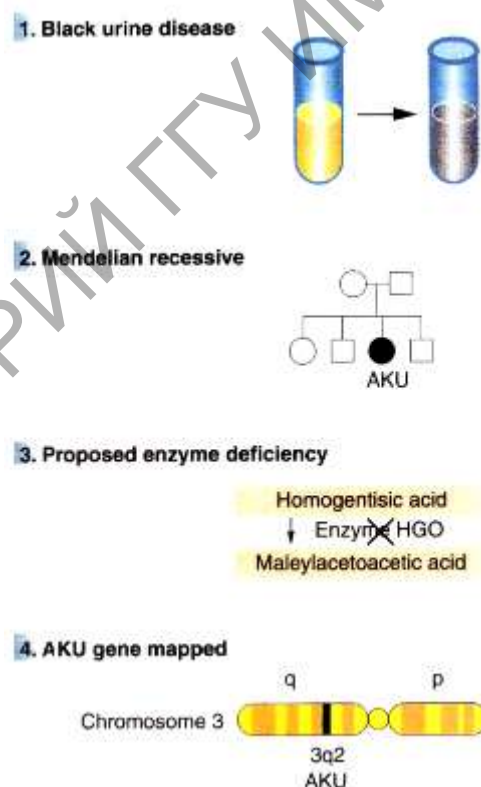


Рисунок 66. Эксперименты Гэррода.

А. Гэррод показал, что причиной алкаптонурии (одной из форм артрита) является нарушение метаболизма ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина. Больные выделяют с мочой гомогенти-

зиновую кислоту (алкаптон), которая вызывает почернение мочи под действием воздуха. При повышении содержания фенилаланина и тирозина в пище количество гомогентизиновой кислоты в моче увеличивается.

В 1941 г. Г. Бидл и Э. Татум на основе генетических экспериментов на грибке *Neurospora crassa* показали, что одна мутация приводит к потере метаболической активности только одного фермента (белка) и установили закономерность: один ген – один белок.

После открытия Уотсона и Крика необходимо было понять, как последовательность из 4-х азотистых оснований в ДНК, из которых состоит ген определяет (кодирует) последовательность из 20 аминокислот в белке. Можно было предположить, что генетический код не может состоять из одного или двух нуклеотидов, так как их только четыре и сочетаний из двух нуклеотидов (4²) может быть только 16, а аминокислот 20.

Мысль о том, что генетический код должен быть триплетным впервые в 1954 г высказал физик-теоретик Гамов Георгий Антонович. В этом случае получается 64 триплетных сочетания, и их вполне достаточно для кодирования всех аминокислот.

Триплет – три рядом стоящих нуклеотида, кодирующих одну аминокислоту получил название кодона.

Начало экспериментальному анализу по расшифровке генетического кода положили в 1961 г. Маршалл. Ниренберг и Дж. Генрих Матей. Они создали простейшую искусственную иРНК, содержащую только урацил. Затем вводили полиУ РНК в бесклеточную среду из кишечной палочки *E. coli*. В результате был получен полипептид, состоящий только из фенилаланина. Таким образом, кодон для фенилаланина был расшифрован как УУУ.

Затем в течение нескольких лет в лабораториях М. Ниренберга и Северо Очоа был определен состав большинства кодонов. Однако требовалось установить последовательность нуклеотидов в кодонах.

Г. Корана с сотрудниками разработал метод химического синтеза фрагментов ДНК с заданной последовательностью нуклеотидов, что позволяло получить иРНК также с известной последовательностью и использовать ее в бесклеточной системе белкового синтеза.

Второй метод предложили М. Ниренберг и П. Ледер. Так как одного триплета иРНК достаточно для связывания с рибосомой и тРНК, ученые использовали триплеты с известной последовательностью нуклеотидов для того, чтобы определить, какую аминокислоту доставит тРНК.

Уже к 1966 г. на основе методов, разработанных Кораной, Ниренбергом и Ледером, были определены все триплеты, кодирующие ту или иную аминокислоту и следовательно генетический код был полностью расшифрован (таблица 4).

Таблица 4 - Структура генетического кода по иРНК.

Основания кодонов					
первое	второе	Третье			
		У	Ц	А	Г
У	У	Фен	Фен	Лей	Лей
	Ц	Сер	Сер	Сер	Сер
	А	Тир	Тир	–	–
	Г	Цис	Цис	–	Три
Ц	У	Лей	Лей	Лей	Лей
	Ц	Про	Про	Про	Про
	А	Гис	Гис	Гли	Гли
	Г	Арг	Арг	Арг	Арг
А	У	Иле	Иле	Иле	Мет
	Ц	Тре	Тре	Тре	Тре
	А	Асп	Асп	Лиз	Лиз
	Г	Сер	Сер	Арг	Арг
Г	У	Вал	Вал	Вал	Вал
	Ц	Ала	Ала	Ала	Ала
	А	Асп	Асп	Глу	Глу
	Г	Гли	Гли	Гли	Гли

Оказалось, что 61 триплет кодирует аминокислоты, а 3 триплета УАА, УГА и УАГ являются «стоп кодонами» и соответственно останавливают процесс трансляции.

2. Свойства генетического кода

1. Триплетность

Каждая аминокислота кодируется последовательностью из 3-х нуклеотидов.

Триплет или кодон - последовательность из трех нуклеотидов, кодирующая одну аминокислоту.

Код не может быть моноплетным, поскольку 4 (число разных нуклеотидов в ДНК) меньше 20. Код не может быть дуплетным, т.к. 16 (число сочетаний и перестановок из 4-х нуклеотидов по 2) меньше 20. Код может быть триплетным, т.к. 64 (число сочетаний и перестановок из 4-х по 3) больше 20.

2. Вырожденность.

Все аминокислоты, за исключением метионина и триптофана, кодируются более чем одним триплетом:

2 АК по 1 триплету = 2

9 АК по 2 триплета = 18

1 АК 3 триплета = 3

5 АК по 4 триплета = 20

3 АК по 6 триплетов = 18

Всего 61 триплет кодирует 20 аминокислот.

3. Наличие межгенных знаков препинания.

Ген - это участок ДНК, кодирующий одну полипептидную цепь или одну молекулу тРНК, рРНК или сРНК.

Гены тРНК, рРНК, сРНК белки не кодируют.

В конце каждого гена, кодирующего полипептид, находится, по меньшей мере, один из 3-х терминирующих кодонов, или стоп-сигналов: UAA, UAG, UGA. Они терминируют трансляцию.

Условно к знакам препинания относится и кодон AUG - первый после лидерной последовательности. Он выполняет функцию заглавной буквы. В этой позиции он кодирует формилметионин (у прокариот).

4. Однозначность.

Каждый триплет кодирует лишь одну аминокислоту или является терминатором трансляции. Исключение составляет кодон AUG. У прокариот в первой позиции (заглавная буква) он кодирует формилметионин, а в любой другой - метионин.

5. Компактность, или отсутствие внутригенных знаков препинания.

Внутри гена каждый нуклеотид входит в состав значащего кодона.

В 1961 г. Сеймур Бензер и Френсис Крик экспериментально доказали триплетность кода и его компактность.

GCU GCU GCU GCU GCU GCU GCU	Дикий тип
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala	
GCU GCU ⁺ AGC UGC UGC UGC UGC	Вставка (+1)
Ala Ala Ser Cys Cys Cys Cys	
GCU GCU GCU GCU ⁻ G CUG CUG CUG	Делеция (-1)
Ala Ala Ala Ala Leu Leu Leu	
GCU GCU ⁺ AGC UGC ⁻ G CUG CUG CUG	Двойной мутант (+1, -1)
Ala Ala Ser Cys Ser Ala Ala	
GCU ⁺ GAC UGC ⁺ AUG CUG ⁺ CAU GCU	Тройной мутант (3 по +1)
Ala Asp Cys Met Leu His Ala	
⁻ G ⁻ G ⁻ G CUG CUG CUG UGC UGC UGC GCU GCU	Тройной мутант (3 по -1)
Ala Leu Leu Cys Ser Ala Ala	

Рисунок 67. Результаты экспериментов Сеймура Бензера и Френсиса Крика, доказывающие триплетность кода и его компактность.

Суть эксперимента: "+" мутация - вставка одного нуклеотида. "-" мутация - выпадение одного нуклеотида. Одиночная "+" или "-" мутация в начале гена портит весь ген. Двойная "+" или "-" мутация тоже портит весь ген. Тройная "+" или "-" мутация в начале гена портит лишь его часть. Четверная "+" или "-" мутация опять портит весь ген.

Эксперимент доказывает, что код триплетен и внутри гена нет знаков препинания. Эксперимент был проведен на двух рядом расположенных фаговых генах и показал, кроме того, наличие знаков препинания между генами.

6. Универсальность.

Генетический код един для всех живущих на Земле существ.

Это является сильнейшим свидетельством в пользу единства происхождения и эволюции.

В 1979г. Беррел открыл идеальный код митохондрий человека.

Идеальным называется генетический код, в котором выполняется правило вырожденности квазидублетного кода: если в двух триплетах совпадают первые два нуклеотида, а третьи нуклеотиды относятся к одному классу (оба - пурины или оба - пиримидины), то эти триплеты кодируют одну и ту же аминокислоту.

Из этого правила в универсальном коде есть два исключения. Оба отклонения от идеального кода в универсальном касаются принципиальных моментов: начала и конца синтеза белка (табл. 5):

Таблица 5. отклонения универсального кода от идеального.

Кодон	Универсальный код	Митохондриальные коды			
		Позвоночные	Беспозвоночные	Дрожжи	Растения
UGA	STOP	Trp	Trp	Trp	STOP
AUA	Ile	Met	Met	Met	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu
AGA	Arg	STOP	Ser	Arg	Arg
AGG	Arg	STOP	Ser	Arg	Arg

7. Неперекрываемость – каждый нуклеотид входит в состав лишь одного кодона.

В 1956г. Георгий Гамов предложил вариант перекрываемого кода. Согласно Гамовскому коду, каждый нуклеотид, начиная с третьего в гене, входит в состав 3-х кодонов (рис. 68).

ATGGTAATTCCG

кодон 1 кодон 4 кодон 7 кодон 10
кодон 2 кодон 5 кодон 8 кодон
кодон 3 кодон 6 кодон 9 ко..

Рисунок 68. Перекрываемый генетический код по Гамову.

Когда генетический код был расшифрован, оказалось, что он неперекрываем, т.е. каждый нуклеотид входит в состав лишь одного кодона.

Достоинства перекрываемого генетического кода: компактность, меньшая зависимость структуры белка от вставки или делеции нуклеотида. Недостаток: большая зависимость структуры белка от замены нуклеотида и ограничение на соседей.

В 1976 г. была секвенирована ДНК фага фХ174 (рис. 69). Было известно, что одноцепочечная кольцевая ДНК фага, состоящая из 5375 нуклеотидов, кодирует 9 белков. Для 6 из них были определены гены, располагающиеся друг за другом.



Рисунок 69. Секвенированная ДНК фага фХ174.

В результате проведенных исследований выяснилось, что в ДНК фага есть перекрывание. Ген Е полностью находится внутри гена D. Его иницирующий кодон появляется в результате сдвига считывания на один нуклеотид. Ген J начинается там, где кончается ген D. Иницирующий кодон гена J перекрывается с терминирующим кодоном гена D в результате сдвига на два нуклеотида. Конструкция называется "сдвиг рамки считывания" на число нуклеотидов, не кратное трем. На сегодняшний день перекрывание показано только для нескольких фагов.

ЛЕКЦИЯ 11. ТРАНСЛЯЦИЯ - МАТРИЧНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКА В КЛЕТКЕ. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП. СТРУКТУРА РИБОСОМ.

1. Строение транспортной РНК
2. Аминоацилирование тРНК
3. Структура рибосом

1. Строение транспортной РНК. Синтез белка в клетке состоит из двух этапов: рекогниции и собственно синтеза полипептида на рибосоме. Ключевым субстратом рекогниции является транспортная РНК.

Транспортные РНК, которых насчитывается более 60-ти, состоят из 75-90 нуклеотидов и имеют структуру в виде клеверного листа (рис. 70). Каждая аминокислота присоединяется к определенной тРНК. На одном конце тРНК находится акцепторный триплет ЦЦА, к аденину которого присоединяется специфическая аминокислота. На другом конце каждой тРНК находится антикодон – специфический триплет, с помощью которого тРНК «узнает» соответствующий комплементарный кодон в иРНК, и тем самым определяет место, куда должна быть поставлена данная аминокислота в синтезируемой молекуле белка. Боковые петли тРНК, по-видимому, используются для связывания с рибосомой и со специфической аминоксил-тРНК-синтетазой.

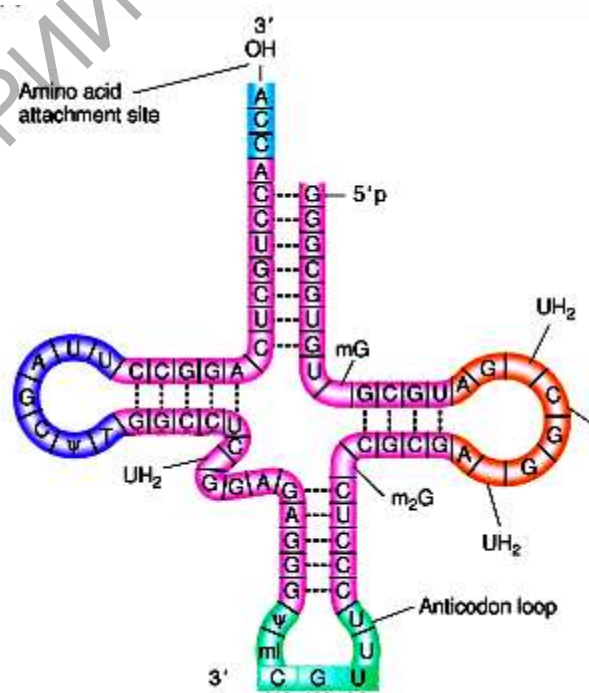


Рисунок 70. Вторичная структура тРНК.

Третичная структура в проекции на плоскость имеет форму бу- меранга (рис. 71). Третичных структур насчитывается 20 (по количе- ству аминокислот).



Рисунок 71. Третичная структура транспортной РНК.

2. Аминоацилирование тРНК.

Аминоацилирование – это подготовительный этап трансляции, на котором образуется ковалентная связь между тРНК и соответствующей аминокислотой.

Состоит из двух стадий:

1. Активирование аминокислоты.
2. Присоединение аминокислоты к тРНК.

Обе стадии рекогниции осуществляются ферментом аминоацил-тРНК-синтетазой (АРС-азой, кодазой) (рис. 72).

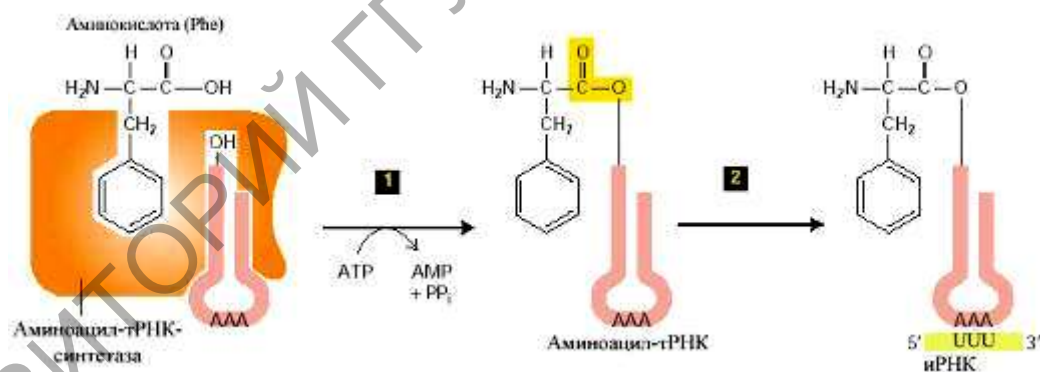


Рисунок 72. Присоединение аминокислоты фенилаланина к терминальному аденозину соответствующей тРНК с помощью фермента аминоацил-тРНК-синтетазы (1 этап) и соединение антикодона AAA аминоксил-тРНК^{Phe} с соответствующим кодоном УУУ мРНК (этап 2).

Существует 20 вариантов аминоацил-тРНК-синтетаз (по числу аминокислот). У каждой аминоацил-тРНК-синтетазы 3 центра связывания: для аминокислоты, тРНК и АТФ. Сначала осуществляется связь аминоацилтРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем активированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК.

Каждая АРС-аза узнает третичную структуру тРНК. тРНК, имеющие разную первичную, но одинаковую третичную структуру, акцептируют одну и ту же аминокислоту и называются изоакцепторными тРНК.

Следующий этап трансляции - собственно синтез полипептидов, происходит на рибосомах.

3. Структура рибосом.

Рибосомы - немембранные самые мелкие клеточные органеллы, при этом они едва ли не самые сложные. В клетке *E. coli* присутствует около 10^3 - 5×10^3 рибосом. Линейные размеры прокариотической рибосомы 210 x 290 Å. У эукариот - 220 x 320 Å.

Выделяют четыре класса рибосом:

1. Прокариотические 70S.
2. Эукариотические 80S.
3. Рибосомы митохондрий (55S - у животных, 75S - у грибов).
4. Рибосомы хлоропластов (70S у высших растений).

S - коэффициент седиментации или константа Сведберга. Отражает скорость осаждения молекул или их компонентов при центрифугировании, зависящую от конформации и молекулярного веса.

Рибосома состоит из трёх (в бактериях) или четырёх (в эукариотах) различных молекул рРНК и нескольких десятков (до 83-х) белков, которые организованы в две субъединицы – большую и малую (табл. 6).

Таблица 6. Структура про- и эукариотических рибосом.

<i>Прокариотическая рибосома</i>		<i>Эукариотическая рибосома</i>	
70S		80S	
50S	30S	60S	40S
5S рРНК 23SrРНК	16S рРНК	5S рРНК 5.8S рРНК 28S рРНК	18S рРНК
34 молекулы белков, из них 31 разные	21 белок	не менее 50 разных белков	не менее 33 разных белков

Малая субъединица рибосомы содержит одну молекулу рРНК, которую называют малой рРНК. Большая субъединица включает молекулу большой рРНК и молекулу 5S-рРНК, а у позвоночных ещё одну молекулу 5,8S-рРНК дополнительно. Длина молекул рРНК, количество белков в каждой субъединице и, следовательно, размер субъединиц различен в бактериальных и эукариотических

клетках. Собранная рибосома представляет собой 70S в бактериях и 80S у позвоночных.

Характеристика рРНК:

1. рРНК выполняют не только функцию каркасов субъединиц рибосом, но и принимают непосредственное участие в синтезе полипептидов.

2. 23S рРНК входит в каталитический пептидилтрансферазный центр, 16SpРНК необходима для установки на 30S субъединице иницирующего кодона мРНК, 5SpРНК - для правильной ориентации аминоксил-тРНК на рибосоме.

3. Все рРНК обладают развитой вторичной структурой: около 70% нуклеотидов собрано в шпильки.

4. рРНК в значительной степени метилированы (CH_3 -группа во втором положении рибозы, а также в азотистых основаниях).

Порядок сборки субъединиц из рРНК и белков строго определен. Субъединицы, не соединенные друг с другом, представляют собой диссоциированные рибосомы. Соединенные субъединицы – это ассоциированные рибосомы. Для ассоциации нужны не только конформационные изменения, но и ионы магния Mg^{2+} (до 2×10^3 ионов на рибосому). Магний нужен для компенсации отрицательного заряда рРНК. Все реакции матричного синтеза (репликация, транскрипция и трансляция) связаны с ионами магния Mg^{2+} (в меньшей степени - марганца Mn^{2+}).

ЛЕКЦИЯ 12. ЭТАПЫ ТРАНСЛЯЦИИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ.

1. Этапы трансляции. Инициация.
2. Стадия элонгации.
3. Терминация трансляции.
4. Посттрансляционная модификация полипептидных цепей.

1. Этапы трансляции. Инициация. Процесс синтеза белка на рибосомах подразделяется на три стадии: инициация, элонгация и терминация (рис. 73).

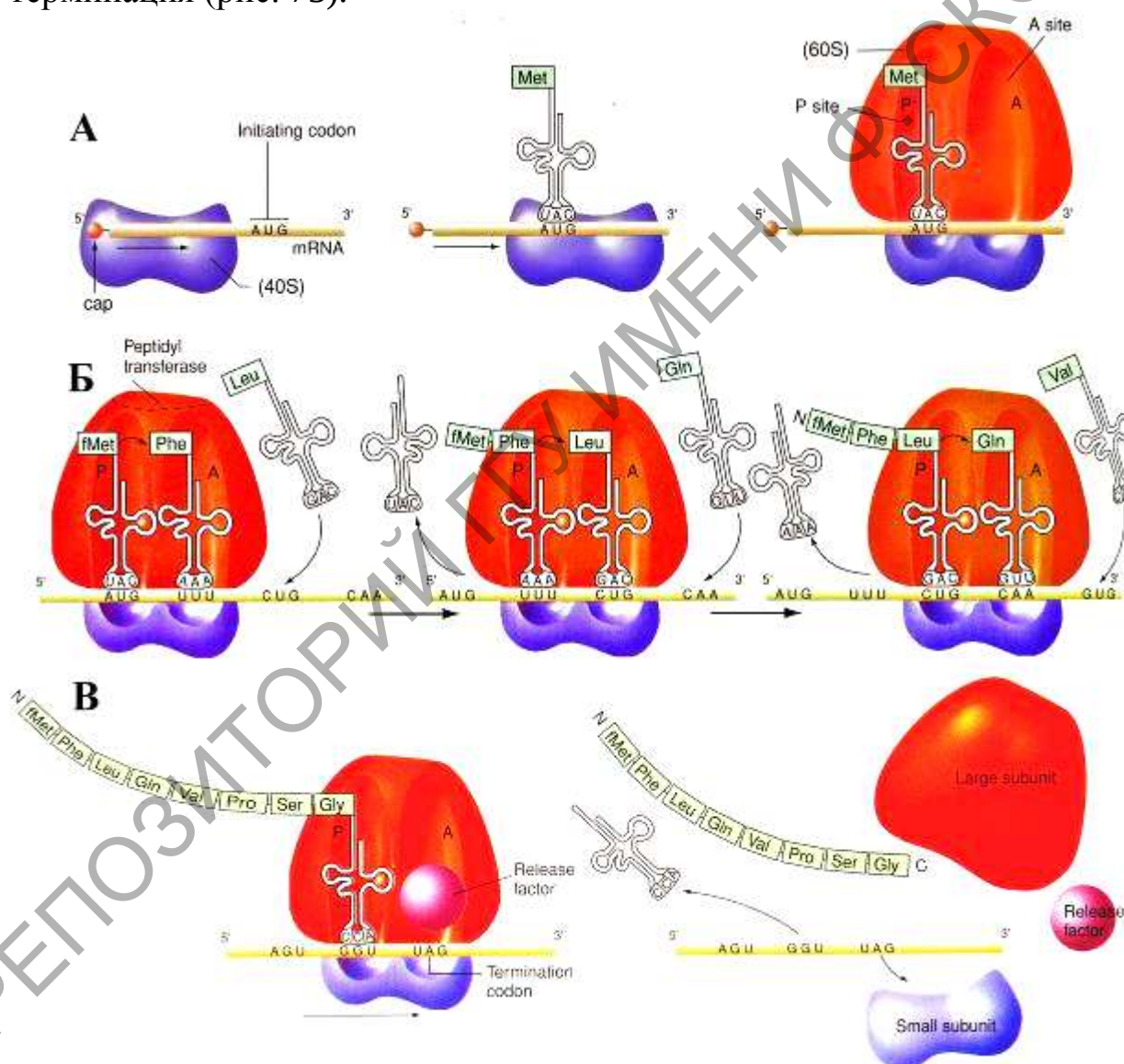


Рисунок 73. Схематическое изображение основных этапов трансляции на рибосомах (А - инициация, Б - элонгация, В - терминация).

Инициация у прокариот. У прокариот для начала трансляции необходим иницирующий кодон мРНК, соответствующая ему иници-

аторная аминоксил-тРНК и белковые факторы инициации (IF – Initiation Factors). Один из таких факторов (IF-2) обладает ГТФазной активностью и участвует в присоединении инициаторной аминоксил-тРНК. Стартовым кодоном как правило является AUG (формилметионин (fmet)), но в некоторых случаях он может быть заменен на GUG (валин).

В связывании мРНК главную роль играет взаимодействие определенного участка, богатого пуриновыми основаниями (последовательность Шайна-Дальгарно). Эта последовательность комплементарна 3'-концевому участку 16S рРНК. Данная последовательность представляет собой сайт связывания рибосом, она находится на расстоянии 3-10 нуклеотидов от иницирующего кодона. Таким образом, в первую очередь присоединяется малая субъединица рибосомы (рис. 74).

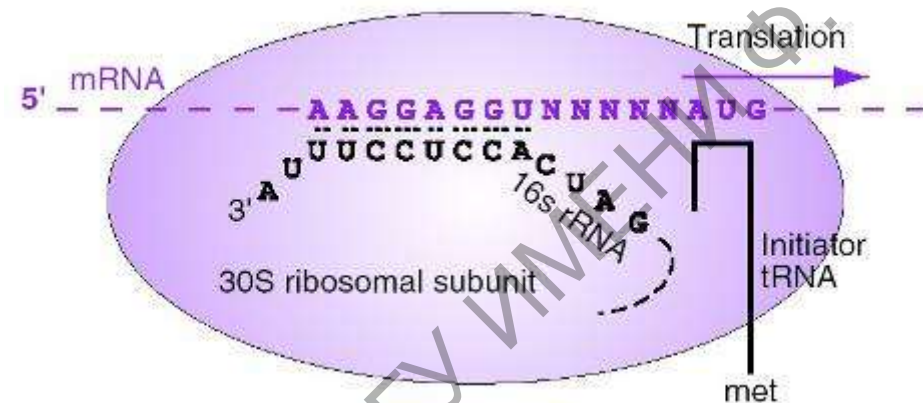


Рисунок 74. Инициация трансляции у прокариот.

На рисунке 63 видно, что взаимодействуют три типа РНК (мРНК, 16S рРНК, тРНК^{fMet}). Это позволяет установить рамку считывания в нужное место, предопределить аминокислотную последовательность синтезируемого белка.

После этого происходит присоединение большой субъединицы и образуются два каталитических центра: А- и Р-центр. Первый центр участвует в присоединении следующей молекулы аминоксил-тРНК. В Р-центре происходит стабилизация тРНК^{fMet} с затратой молекулы ГТФ. На этом стадия инициации заканчивается.

Инициация у эукариот. Вместо комплементарного РНК-РНК узнавания, в которое вовлечена прединицирующая последовательность Шайна-Дальгарно прокариотических мРНК, эукариотические мРНК узнаются эукариотическими рибосомами по кэпированному 5'-концу с обязательным участием белка, например, eIF-4F инициаторного фактора. Предполагается, что этот белок участвует в расплавлении вторичных структур 5'-областей мРНК, облегчая их связывание с малыми субчастицами рибосом. В отличие от прокариот, эукариоти-

ческая мРНК образует комплексы с белками (мРНКП, или мессенджер-рибонуклеопротеиды, или информосомы), что обуславливает ее метаболическую стабильность. Вследствие этого у эукариот отсутствует постоянная интенсивная деградация и интенсивный ресинтез мРНК, которые, как правило, моноцистронны и имеют специфически модифицированный (кэпированный) 5'-конец. Все это обуславливает целый ряд особенностей инициации трансляции и ее регуляции у эукариотических организмов.

2. Элонгация. У прокариот и эукариот нет существенных отличий в протекании стадии элонгации. В свободный *аминоацильный центр* рибосомы со второй аминокислотой поступает следующая аа-тРНК, которая своим антикодоном соединяется со строго с комплементарным кодоном иРНК (рис. 75). В этот момент при помощи фермента **пептидилтрансферазы** предшествующая аминокислота (метионин) своей карбоксильной группой (COOH) соединяется с аминогруппой (NH₂) вновь пришедшей аминокислоты. Между ними образуется пептидная связь (–CO–NH–). В результате тРНК, принеся метионин, освобождается, а в аминоацильном центре к тРНК присоединен уже дипептид.

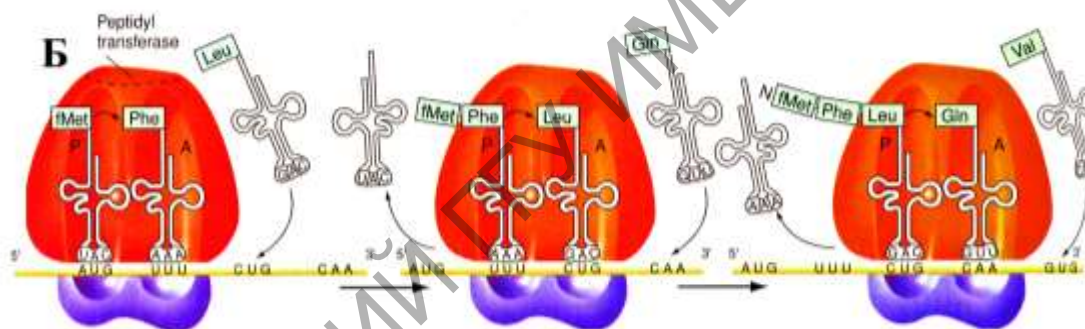


Рисунок 75. Стадия элонгации.

Дипептидил-тРНК благодаря перемещению рибосомы на один кодон при участии фермента **транслоказы** и белкового **фактора элонгации** продвигается из аминоацильного центра в пептидильный. Освободившаяся тРНК и связанный с ней кодон иРНК АУГ выходят из рибосомы (рис. 73, Б). Следующая аа-тРНК приносит новую аминокислоту в освободившийся аминоацильный центр в соответствии с поступившим туда кодоном. Эта аминокислота при помощи пептидной связи соединяется с предыдущей. При этом рибосома снова продвигается еще на один кодон, и процесс повторяется (рис. 73, Б).

На одной молекуле иРНК работает не одна рибосома, а многие (до 100). На каждой из рибосом строится полипептидная цепь. У бактерий транскрипция и трансляция связаны между собой и трансляция начинается до завершения синтеза иРНК на ДНК. Образующиеся при синтезе полипептидные цепи претерпевают ряд посттрансляционных

преобразований и только после этого начинают выполнять в организме свои специфические функции.

3. Терминация трансляции.

Финальная стадия трансляции требует специфических молекулярных сигналов, которые превращают стоп-сигнал стоп-кодона в диссоциацию комплекса мРНК–рибосома–тРНК–полипептид.

Были обнаружены два особых белковых фактора терминации, которые называются факторами высвобождения (или отделения) полипептидной цепи от рибосомы (release factors, RF). Эукариотический eRF1, чья форма подобна форме тРНК, действует, по-видимому, просто связываясь с А-центром и непосредственно распознавая стоп-кодон. Подобно некоторым из факторов инициации и элонгации, фактор высвобождения eRF3 связан с GTP. Связывание комплекса (eRF3–GTP) с eRF1 и гидролиз АТФ обеспечивают отделение полипептида от тРНК и завершение синтеза белка (рис. 76).

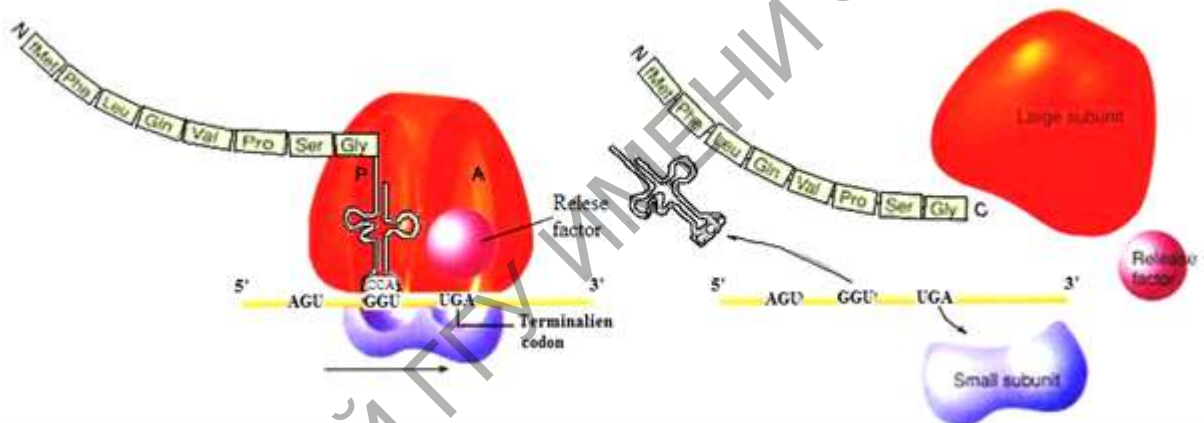


Рисунок 76. Терминация трансляции у эукариот.

Бактерии, в отличие от эукариот, имеют два фактора высвобождения RF1 и RF2 (которые функционально аналогичны эукариотическому фактору eRF1) и GTP-связанный фактор RF3, аналогичный eRF3.

После высвобождения из рибосомы вновь синтезированный белок с помощью специальных белков шаперонов сворачивается в свою нативную трёхмерную конформацию.

Белковые факторы терминации eRF3 обеспечивают

- 1) диссоциацию рибосомы,
- 2) разъединение субъединиц, мРНК и последней тРНК, которые теперь вновь готовы участвовать в новом цикле синтеза нового белка.

4. Посттрансляционная модификация полипептидной цепи

После трансляции белки претерпевают изменения, которые могут состоять в:

- 1) модификации N- и C-концов полипептидов, что состоит в от-

щеплении N-концевых формилметионина (у прокариот) и метионина (у эукариот); ацетилировании N- и C-концов;

2) модификации гидроксильных, аминных и карбоксильных групп в боковых радикалах пептидов путем их фосфорилирования, карбоксилирования, метилирования, ацетилирования;

3) присоединении к пептидам простетических групп – гема, углеводов, коферментов;

4) химической модификации ковалентной основы аминокислотных остатков, примером могут служить превращение в составе фактора инициации эукариот eRF2 остатка гистидина в остаток нетипичной аминокислоты дифталамида;

5) частичном гидролизе полипептида;

6) приобретение вторичной, третичной и четвертичной структуры.

ЛЕКЦИЯ 13. СТРУКТУРА, ФОЛДИНГ, ТРАНСПОРТ И ДЕГРАДАЦИЯ БЕЛКОВ.

1. Белки, их строение и функции.
2. Фолдинг. Белки шапероны.
3. Секреция белков у прокариот: Сес-аппарат и сигнальный пептид.
4. Распределение белков по компартментам клетки эукариот.
5. Деградация белков. Убиквитины.

1. Белки, их строение и функции.

Белки – это конечные продукты экспрессии генов. Основным класс белков – это **ферменты** (энзимы), которые служат биологическими катализаторами, обеспечивающими высокую скорость и точность всех биохимических реакций в организме. Ферменты осуществляют как *синтез (анаболизм)*, так и *расщепление (катаболизм)* всех органических молекул в клетке, включая углеводы, липиды, белки и нуклеиновые кислоты.

Белки выполняют также огромное количество других функций. Так *структурные функции* осуществляют – **коллаген** (хрящи, сухожилия), **кератин** (перья, волосы, когти, рога); *транспортные* – **гемоглобин** (перенос O_2 и CO_2), **альбумин** (жирные кислоты), **глобулины** (гормоны металлы); *сократительные* – **актин**, **миозин** (работа мышц), **тубулин** (веретено деления, реснички); *гормональные* – **инсулин** (регулирует содержание глюкозы).

Белки – это полимеры мономерами, которых являются аминокислоты. В состав природных белков входит только 20 аминокислот (табл. 7). *Аминогруппа* одной аминокислоты способна взаимодействовать с *карбоксильной* группой другой аминокислоты с образованием пептидной связи ($-CO-NH-$) и выделением молекулы воды. При этом образуется дипептид (рис. 77):

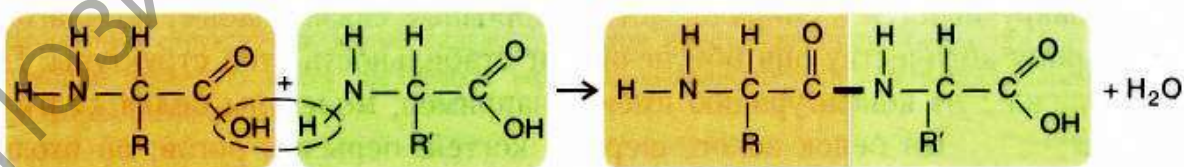


Рисунок 77. Образование дипептида.

Если таким образом соединяется несколько аминокислот (более 10), то образуется – **полипептид**. Полипептиды в молекулы, которых входит более 50 аминокислотных остатков называются **белками**.

Таблица 7. Аминокислоты, входящие в состав

А				
Gly (G)	Ala (A)	Val (V)	Leu (L)	Ile (I)
Pro (P)	Phe (F)	Trp (W)	Cys (C)	Met (M)
Б				
Ser (S)	Thr (T)	Tyr (Y)	Asn (N)	Gln (Q)
В				
1. Basic (positively charged)			2. Acid (negatively charged)	
Arg (R)	Lys (K)	His (H)	Asp (D)	Glu (E)

Примечание: А – нейтральные аминокислоты; Б - полярные аминокислоты; В – положительно- и отрицательнозаряженные аминокислоты.

Белковые молекулы имеют четыре уровня (структуры) пространственной организации. **Первичная структура** молекулы белка представляет собой цепочку из аминокислот соединенных пептидными связями (рис. 78, а). Это наиболее важная структура, поскольку она определяет форму и свойства белка. *Каждый белок организма имеет уникальную первичную структуру.* **Вторичная структура** белковой молекулы возникает в результате образования водородных связей между атомом водорода NH-группы и СО-группы разных аминокислотных остатков полипептидной цепи (рис. 78, б). Полипептид при этом закручивается в спираль. Такая структура характерна для кератина, коллагена, инсулина, миозина, фибриногена и др. **Третичная структура** создается S–S связями (дисульфидными мостиками), а также гидрофобно-гидрофильными взаимодействиями разных частей молекулы полипептида (рис. 78, в).

$$\begin{array}{cccccccccccccccccccc} & \text{H} & & \text{O} & & \text{R}_2 & & \text{H} & & \text{O} & & \text{R}_4 & & \text{H} & & \text{O} & & \text{R}_6 \\ & | & & || & & | & & | & & || & & | & & | & & || & & | \\ \text{H} & -\text{N}^+ & -\text{C} & -\text{C} & -\text{N} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{N} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{N} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{N} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{N} & -\text{C} & -\text{O}^- \\ & | & & & & | & & | & & & & | & & | & & & & | & & || \\ & \text{H} & & & & \text{H} & & \text{H} & & & & \text{H} & & \text{H} & & & & \text{H} & & \text{O} \end{array}$$

Третичной структурой определяется специфичность белковых молекул, их биологическая активность. Некоторые белки имеют **четвертичную структуру**. В этом случае несколько полипептидных цепей с третичной структурой за счет межмолекулярных взаимодействий объединяются в единый комплекс. Ярким примером белка с четвертичной структурой является **гемоглобин**, состоящий из четырех полипептидных субъединиц и небелковой части – гемма (рис. 78, г).

Кроме последовательности аминокислот полипептида (первичной структуры), крайне важна трёхмерная структура белка, которая формируется в процессе фолдинга (от англ. folding - «сворачивание»).

Универсальным механизмом, обеспечивающим быстрый и безошибочный фолдинг, является участие в сворачивании белковых цепей **шаперонов** – специализированных белков, обнаруженных во всех органеллах всех организмов от бактерий до приматов (рис. 79). Шапероны бывают двух типов.

1. **Молекулярные шапероны**, которые связываются с белковой нитью, предотвращая её агрегацию или деградацию.

2. Шаперонины, которые обеспечивают фолдинг белков.

Молекулярные шапероны состоят из белков **Hsp70** и их гомологов:

- **Hsp70** в цитозоле и матриксе митохондрий,
- **BiP** в эндоплазматическом ретикулуме,
- **DnaK** в бактериях.

Белки Hsp70 называют белками теплового шока (heat shock proteins), поскольку они активно синтезируются клеткой при нагревании. Связанный с АТФ Hsp70 (Hsc70 это постоянно синтезируемый гомолог Hsp70) присоединяется к гидрофильному участку белковой цепи. За счет энергии молекулы АТФ происходит фолдинг белковой цепи, при этом замена АТФ на АДФ приводит к диссоциации Hsp70 со свернутой белковой цепи (рис. 79 вверху).

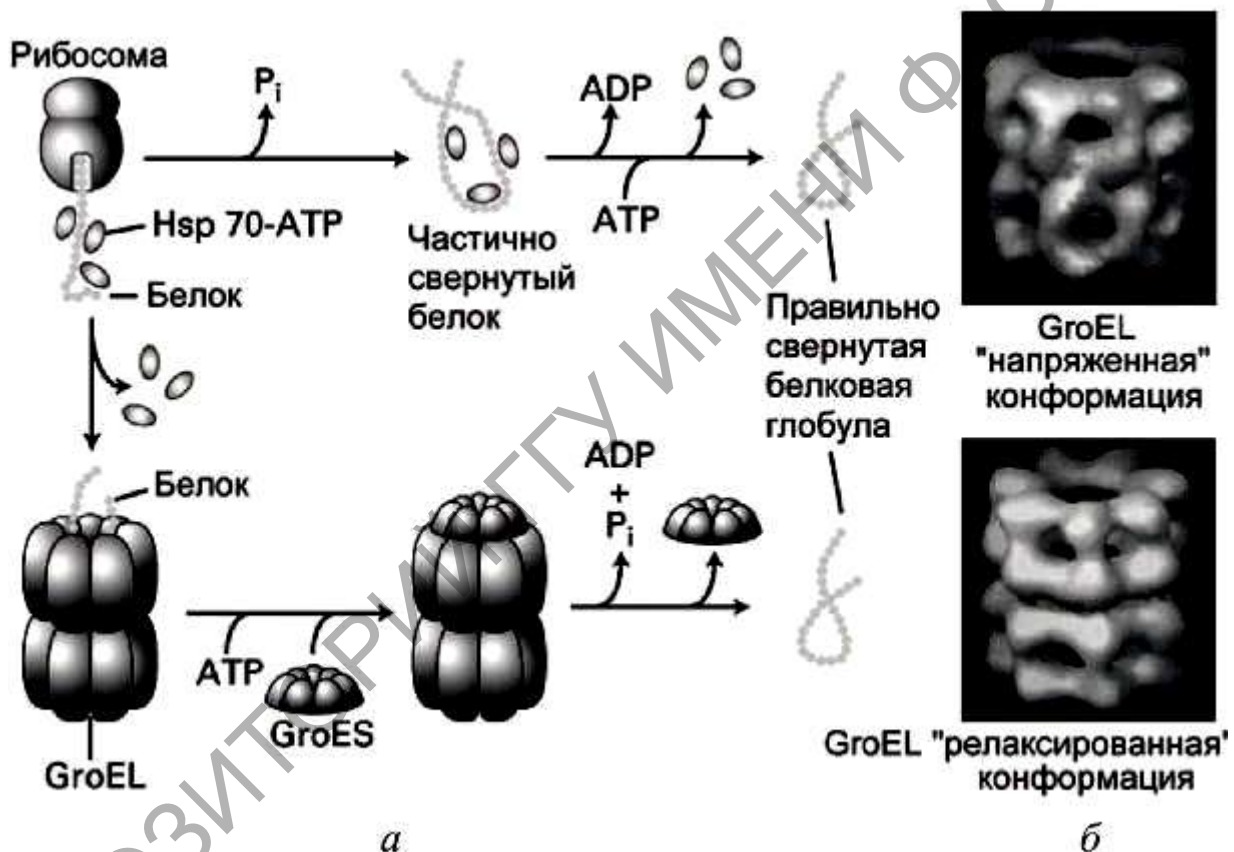


Рисунок 79. Фолдинг белков с участием шаперонов и шаперонинов: а – схема фолдинга; б – конформации шаперонина.

Шаперонины – большие цилиндрические макромолекулярные комплексы, состоящие из двух олигомерных колец (по восемь мономеров в шаперонине эукариот TriC и по семь мономеров в шаперонинах бактерий, митохондрий и хлоропластов GroEL) – обеспечивают изоляцию белковой нити на время фолдинга (рис. 79 внизу). Связывание GroEL с АТФ высвобождает свернутый белок. Функционирова-

ние GroEL осуществляется с участием ко-шаперонина GroES, который закрывает (эпирует) полость шаперона на время фолдинга.

После правильного сворачивания, крышка открывается и готовая функциональная молекула белка покидает шаперонин.

Шапероны и шаперонины могут исправлять поврежденную структуру белка. Если исправить не удастся, белок должен быть разрушен в протеасоме – это тоже сложный белок, образующий полость.

Результатом нарушения фолдинга белков являются конформационные болезни. К ним относятся:

- Прионовые заболевания;
- Болезнь Альцгеймера;
- Синдром Марфана;
- Куриная слепота;
- Злокачественные опухоли (нарушение фолдинга p53).

Прионы – это инфекционные белки. Вызывают тяжёлые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда высших животных («медленные инфекции»):

- ✓ у людей – куру («смеющаяся смерть»), болезнь Крюцельда-Якоба, семейная фатальная бессонница;
- ✓ у коров, норок, оленей, козы – бешенство (губчатая энцефалопатия);
- ✓ у овец – почесуха (scrappy).

3. Секреция белков у прокариот: Сес-аппарат и сигнальный пептид.

Большинство бактерий способны секретировать синтезируемые белки в окружающую среду. Для этого бактериальные клетки используют различные системы секреции в зависимости от строения и конечной локализации белка. Все эти системы должны специфически распознавать свои субстраты и облегчать секрецию без нарушения целостности клеточной оболочки. Однако для достижения такой цели эти системы используют существенно разные механизмы и отличаются друг от друга по своей сложности.

Грамотрицательные бактерии имеют две мембраны – цитоплазматическую мембрану (IM) и внешнюю мембрану (OM), разделённые периплазматическим пространством. Такая организация клеточной стенки делает процесс секреции топологически сложным. В грамотрицательных бактериях биологические молекулы, выделяемые во внешнюю среду, должны пересечь два гидрофобных барьера. Для обеспечения транспорта через клеточную стенку в указанных микроорганизмах функционируют как минимум шесть специализированных систем секреции (т.н. системы секреции типов 1-6).

Системы секреции можно классифицировать по тому, за один или два этапа происходит транспортировка белковой молекулы. Один класс систем секреции, включающий типы 1, 3 и 4, обеспечивает одноэтапную секрецию из цитоплазмы сразу во внеклеточную среду. Второй класс систем секреции (типов 2, 5 и 6) предполагает экспорт в два этапа (из цитоплазмы в периплазматическое пространство, и из периплазмы в среду), причём в последовательных этапах транслокации работают разные молекулярные механизмы. Первый этап – транспорт в периплазму – происходит при участии одного из трёх разных путей: Sec, Tat или SRP. Основные особенности этих путей – Sec (SecB-зависимый путь), Tat (твин-аргинин зависимый путь, twin-arginine translocation) и SRP (signal recognition particle) – схематически показаны на рисунке 80.

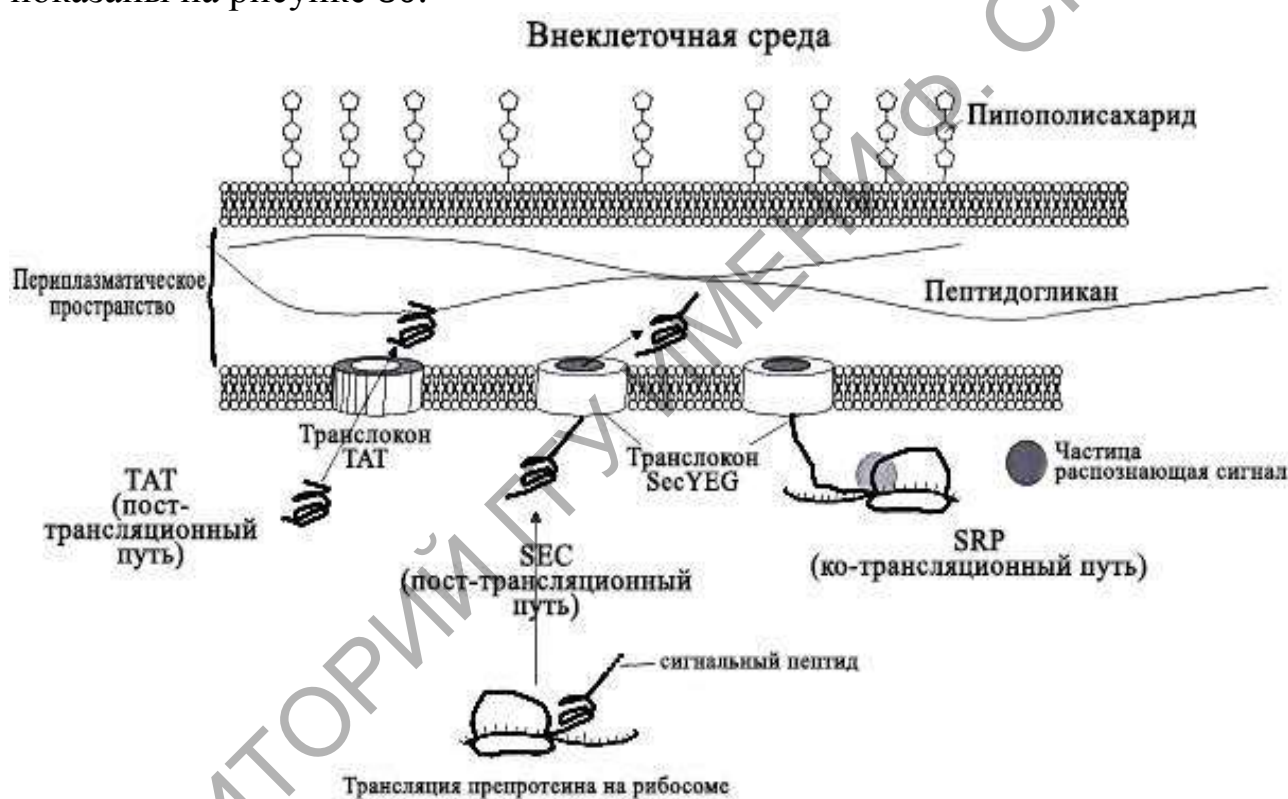


Рисунок 80. Пути транслокации через плазматическую мембрану

Все три перечисленных пути используют разные механизмы и приспособлены для транслокации разных белков-мишеней. Транслокация по пути Sec или Tat является пост-трансляционным процессом, в то время как путь SRP является ко-трансляционным, т.е. осуществляет экспорт полипептидной цепи, которая продолжает синтезироваться на рибосоме. Белки-мишени пути Sec для транслокации должны быть развёрнуты полностью до состояния вытянутой полипептидной цепи (т.е. теряют третичную структуру в ходе транслокации), эти белки подвергаются рефолдингу в периплазме. Белки-мишени пути

Tat транслируются в свёрнутом состоянии, не теряя третичной структуры, которую они приобретают в цитоплазме. С использованием пути Tat возможно экспортировать функционально активные белки, имеющие сложную третичную структуру.

Sec-аппарат. Наибольшая доля секретируемых и мембранных белков у прокариот используется для транслокации через путь Sec, в связи с чем исторически путь Sec получил название основного секреторного пути (general secretory pathway, GSP). Природные белки-мишени пути Sec, как правило, локализуются в периплазматическом пространстве или интегрируются во внешней мембране. Секреторный **аппарат Sec** гомологичен транслокону в эндоплазматическом ретикулеуме высших эукариот и транслокону Sec 61 у дрожжей. Центральную роль в транслоконе Sec играет комплекс из трёх белков SecYEG, который образует канал в цитоплазматической мембране. В состав транслоказного комплекса также входят другие белки: мембранная АТРаза SecA, цитоплазматический шаперон SecB и акцессорные белки SecD и SecF, YidC и YajC. Белки-мишени пути Sec синтезируются в цитоплазме в виде предшественников, содержащих на N-конце короткий (15-30 аминокислотных остатков) пептид, называемый **сигнальным пептидом**. SecA распознаёт сигнальный пептид и в кооперации с шапероном SecB, транспортирует препроtein к транслокону SecYEG (рис. 81).

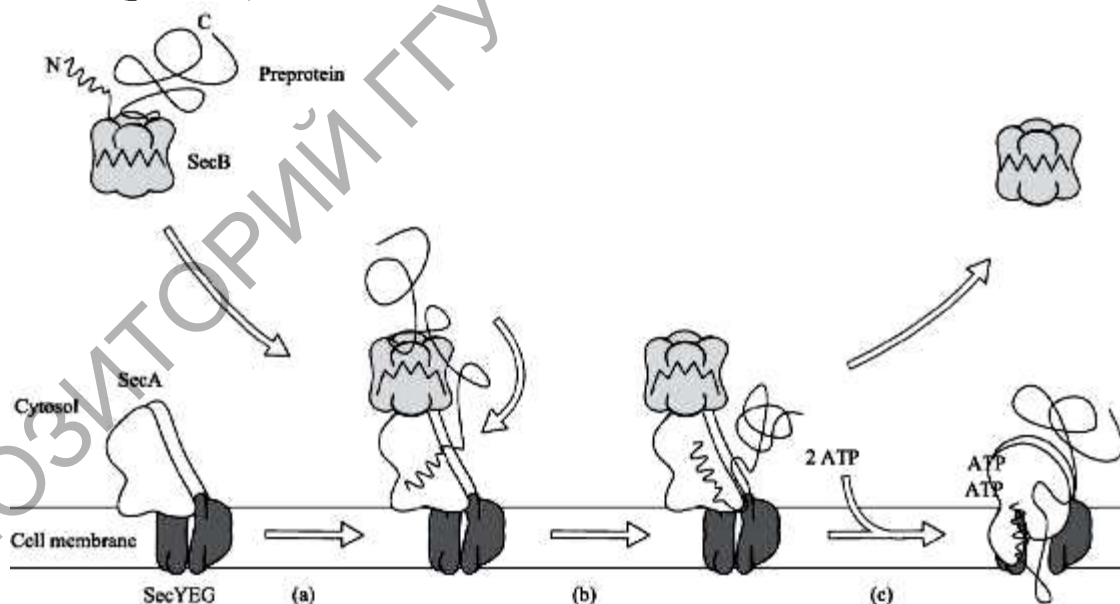


Рисунок 81. Сек-аппарат.

В ходе транслокации белка-мишени, как только С-конец сигнального пептида достигает поверхности цитоплазматической мембраны, сигнальный пептид отщепляется при участии сигнальных пептидаз (пептидазы I (LepB) или пептидазы II (LSPA)).

Сигнальные пептиды имеют сильно различающиеся аминокислотные последовательности, но демонстрируют и общие структурные характеристики. Типичный сигнальный пептид имеет на N-конце короткий участок, т.н. N-домен, длиной от 2 до 10 а.о., богатый положительно заряженными аминокислотами; в центре сигнального пептида находится участок (длиной 10-20 а.о.), богатый аминокислотными остатками с гидрофобными боковыми цепями (H-домен); на C-конце сигнального пептида находится C-домен, менее гидрофобный, чем H-домен, и содержащий сайт узнавания сигнальной пептидазы. Во время транспорта белков из цитоплазмы сигнальный пептид отщепляется сигнальной пептидазой с высвобождением зрелого белка.

Вторичная структура экспортируемого белка играет важную роль в том, насколько эффективно будет отщепляться сигнальный пептид. Получение эффективной транслокации требует подбора сигнального пептида к выбранному белку-мишени.

4. Распределение белков по компартментам клетки эукариот.

Мембранные структуры клетки активно участвуют во внутриклеточном транспорте белков. Существует три основных механизма, с помощью которых клетка решает эту задачу (рис. 82).

1. Белок после синтеза и фолдинга в неизменном виде доставляется в нужную органеллу через специализированные поры в мембранах. Такой вид доставки называется управляемый транспорт (gated transport).

2. Трансмембранная транслокация белков в ходе которой полипептид сначала денатурируется, затем полипептидная цепочка протягивается через одну или несколько мембран, а затем снова происходит фолдинг функционального белка.

3. Везикулярное движение (vesicular trafficking) белков, в ходе которого от мембраны отпочковывается везикула, в состав которой входят транспортируемые вещества. С помощью управляемого транспорта, например, в ядро клетки через ядерные поры доставляются все вещества. Трансмембранная транслокация обеспечивает доставку синтезированных в цитозоле белков в пероксисомы, митохондрии и хлоропласты. Везикулярное движение обеспечивает доставку веществ в лизосомы и секрецию веществ из клетки.

Распределение белков обеспечивается наличием в их структуре специальных сортировочных сигналов (sorting signals). Сразу после окончания синтеза белка рибосомой в цитозоле, когда он является просто полипептидом, сортировочными сигналами являются последовательности аминокислот на концах белковой цепи, которые называют нацеливающими.

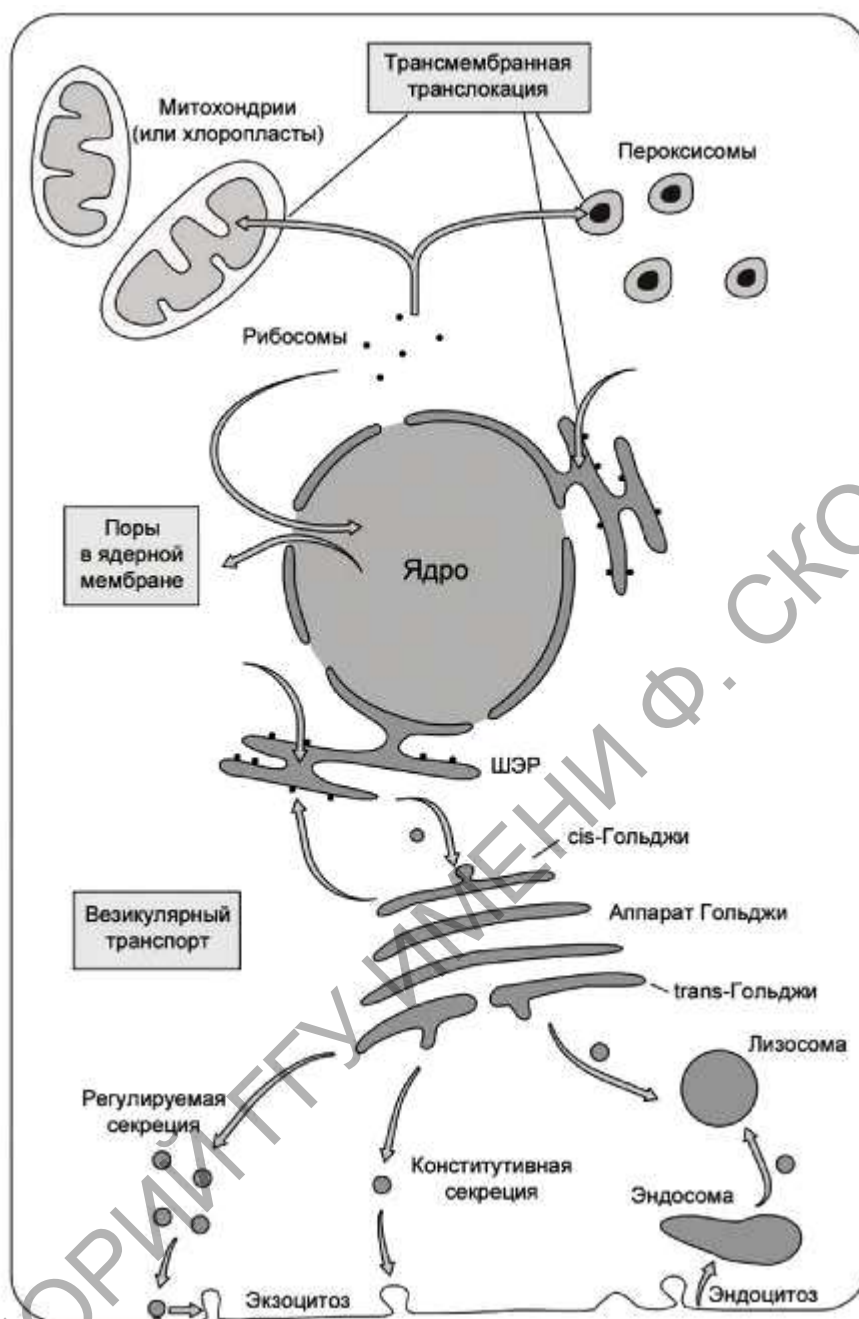


Рисунок 82. Механизмы внутриклеточного транспорта белков в эукариотической клетке.

Для белков, которые синтезируются на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума, дополнительные сортировочные сигналы (такие, как сахара или фосфатные группы) могут быть добавлены с помощью специализированных ферментов в цистернах аппарата Гольджи в ходе посттрансляционной модификации белков. Такие сигналы обычно представляют собой специфические лиганды, которые распознаются рецепторными белками, а эти рецепторные белки с присоединенными к ним транспортируемыми белками, в свою очередь, присоединяются к мембранным транслокационным комплексам соответствующего компартмента. Нацеливающие последовательности

белка, которые представляют собой цепочку из 3–80 аминокислот, также распознаются специализированными рецепторами, доставляющими данный белок к соответствующим транслокационным комплексам. После доставки в нужный компартмент нацеливающие последовательности обычно отрезаются от белковой цепи специализированными ферментами.

Одними из наиболее изученных нацеливающих последовательностей являются сигнальные пептиды (или сигнальные последовательности) – цепочки из 5–15 преимущественно гидрофобных аминокислот. Наличие такой сигнальной последовательности в синтезируемом белке вынуждает рибосому присоединиться к эндоплазматическому ретикулуму, и синтезируемая белковая цепь направляется не в цитозоль, а в люмен ретикулума. Другой пример нацеливающей последовательности – сигнал импортирования для белков, которые должны быть перемещены из цитозоля в матрикс митохондрии. Этот сигнал представляет собой цепочку из 20–80 аминокислот, формирующих полярную α -спираль, у которой положительно заряженные аминокислоты выстроены с одной стороны спирали, а гидрофобные аминокислоты – с другой. Для транспорта белков в ядро клетки определена последовательность из пяти положительно заряженных аминокислот. Для переноса белков в пероксисому служит пероксимальная нацеливающая последовательность Ser-Lys-Lys-COOH – С-концевой трипептид. Существуют сортировочные последовательности, которые не способствуют перемещению белка, а наоборот, служат сигналом о том, что белок уже доставлен к месту назначения. Например, белки с так называемой KDEL-последовательностью Lys-Asp-Glu-Leu-COOH на С-конце остаются в эндоплазматическом ретикулуме и не должны удаляться из него везикулярным транспортом. Иллюстрацией вышесказанного может быть кальций-связывающий белок гладкого эндоплазматического ретикулума калретикулин (calcium-binding protein of the endoplasmatic reticulum – calreticulin). Первые 17 аминокислот на N-конце калретикулина являются сигнальной последовательностью, которая инициирует транслокацию белка в люмен эндоплазматического ретикулума, а последние 4 аминокислоты – последовательность KDEL – не позволяет белку уйти из ретикулума. Между этими сортировочными сигналами располагается первичная структура функционального белка.

5. Дегградация белков. Активность ферментов зависит от их концентрации, а значит, определяется балансом процессов синтеза и дегградации белков в клетке. Диапазон времени жизни белков – от нескольких минут (например, белки, обеспечивающие митоз, митотиче-

ские циклины) до времени жизни всего организма (например, белки в хрусталике глазного яблока). Эукариотические клетки имеют несколько внутриклеточных протеолитических механизмов деградации (утилизации) в основном следующих трех типов белков: 1) неверно свернутые (misfolded) или денатурированные (развернутые) белки, 2) "нормальные" белки, чья концентрация должна быть снижена, 3) внеклеточные белки, захваченные клеткой в результате эндоцитоза или фагоцитоза.

Главный внутриклеточный механизм деградации – это ферментативный протеолиз в лизосомах, чья "кислая" среда заполнена гидролитическими ферментами (рис. 83).

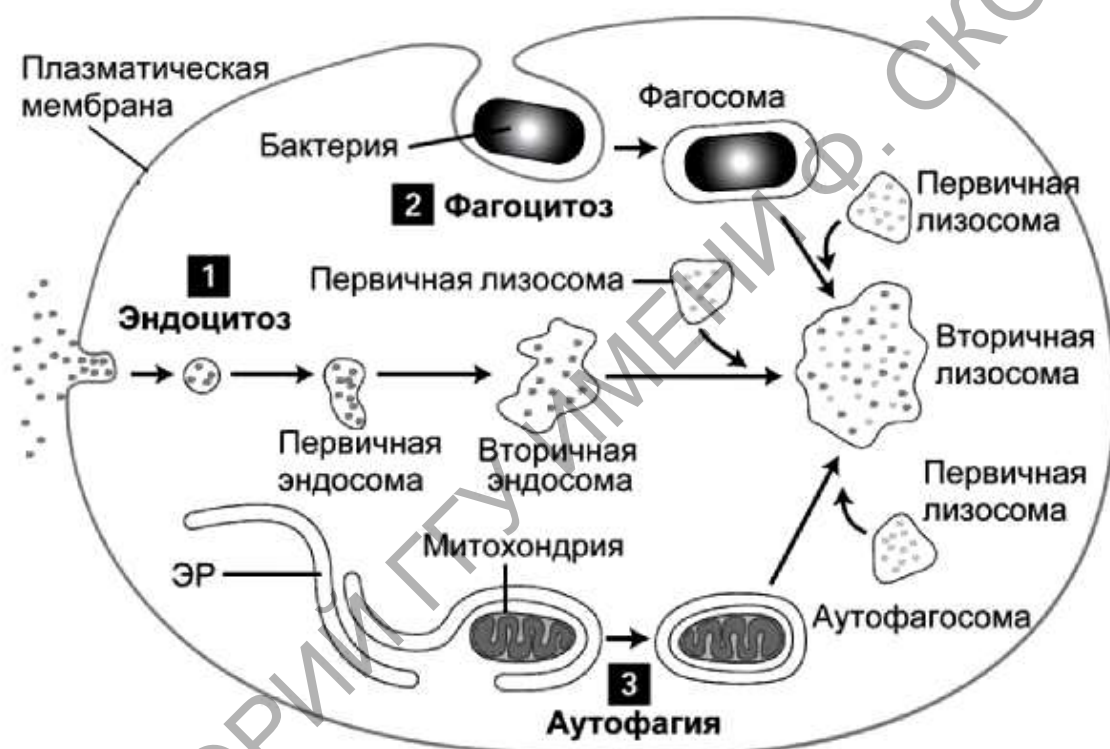


Рисунок 83. Протеолиз в лизосомах.

Деградация в лизосомах предназначена главным образом для: 1) протеолиза чужих белков, попадающих в клетку в результате эндоцитоза и фагоцитоза, 2) протеолиза нефункциональных органелл клетки, которые отторгаются и "перевариваются" клеткой (аутофагия).

Убиквитинирование. Другой, отличный от лизосомального, цитозольный механизм деградации белков реализуется путем модификации лизина в белке добавлением **убиквитина** (ubiquitin). Консервативный белок убиквитин состоит из 76 аминокислотных остатков и имеет одну α -спираль и несколько β -листов. Этот белок пришивается к белкам, которые должны деградировать. Процесс присоединения убиквитина к белку-мишени называется **убиквитинирование** (рис. 84).

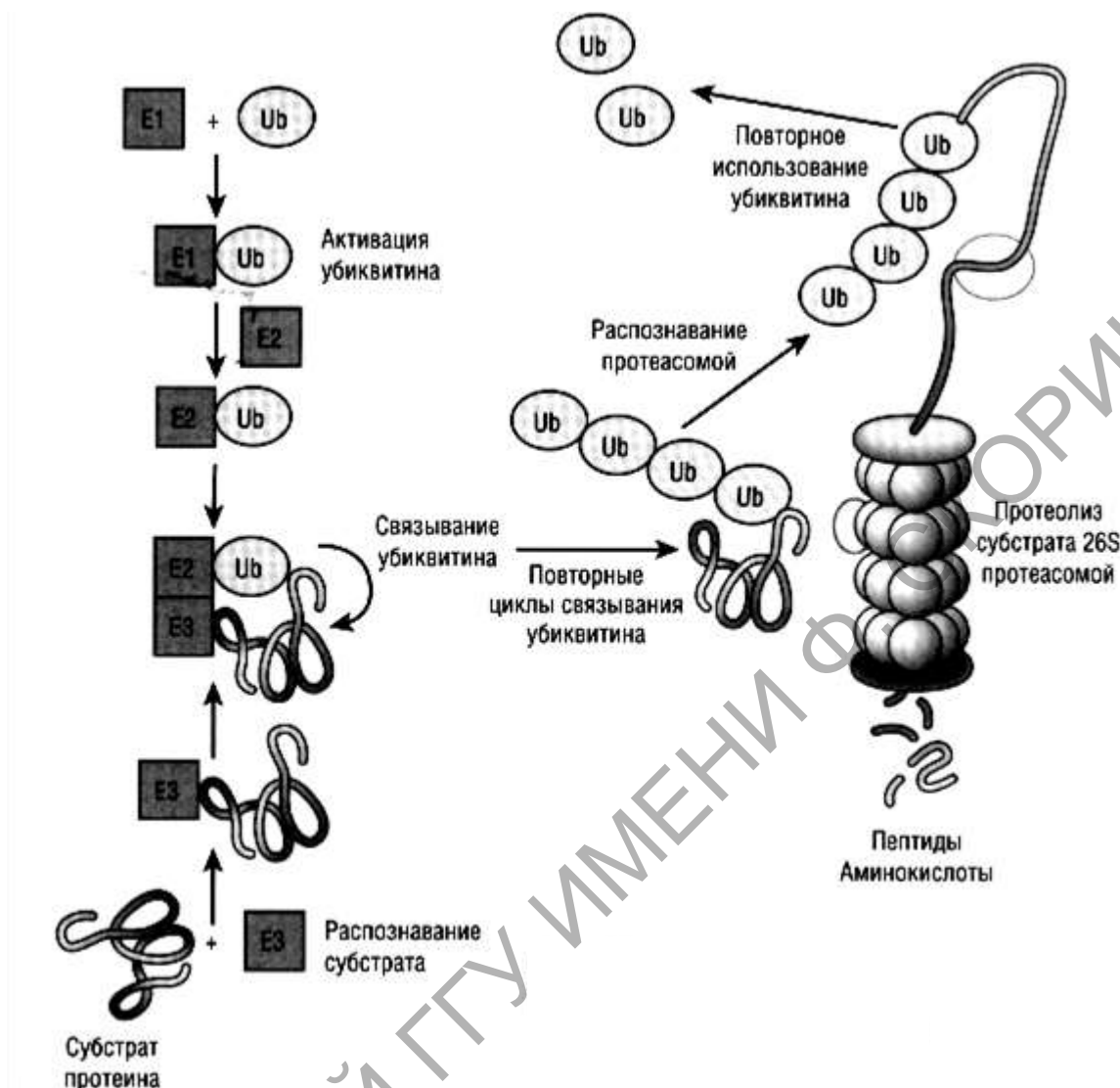


Рисунок 84. Убиквитин-протеасомный путь распада белка

Убиквитинирование осуществляется в три этапа тремя ферментами.

1. АТФ-зависимая активация убиквитин-активирующего фермента E1 (ubiquitin-activating enzyme) посредством присоединения к нему молекулы убиквитина.

2. Перенос молекулы убиквитина на цистеин убиквитинсопряженного фермента E2 (ubiquitin-conjugating enzyme).

3. Формирование пептидной связи между молекулой убиквитина, находящейся на ферменте E2, и лизином на белке, который должен деградировать, реакция катализируется ферментом убиквитин лигаза E3 (ubiquitin ligase).

Эти три этапа повторяются много раз, новые молекулы убиквитина присоединяются к уже присоединенным, в результате чего полиубиквитиновая цепь распознается протеасомой (белковым комплексом, ращепляющим белки). Белок загружается в полое цилиндрическое ядро протеасомы. Внутри протеасомы убиквитинированные белки

разрезаются на короткие (7-8 остатков) пептиды множественными протеазами, расположенными на стенках протеосомы, а молекулы убиквитина отделяются от белков.

Убикитированные белки деградируют затем в протеосомах. Убиквитиновая деградация белков используется в двух случаях.

1. Удаление цитозольных белков, чья концентрация должна быть снижена. Например, циклин должен присутствовать в клетке только на определенном этапе клеточного цикла. Фосфорилирование циклина изменяет его конформацию, и внутренняя, исходно погруженная внутрь белковой глобулы, последовательность $\text{rg-X-X-Leu-Gly-X-Ile-Gly-Asp/Asn}$ (где X – любая аминокислота) становится доступной ферментам убиквитинизации.

2. Протеолиз белковых молекул, неправильно свернутых в эндоплазматическом ретикулуме (misfolding).

Мисфолдинг, так же, как и в предыдущем случае, делает доступными те гидрофильные части белковой нити, которые спрятаны внутрь глобулы при правильном фолдинге. Эти белки переносятся в цитозоль, где распознаются ферментами убиквитинизации.

В обоих случаях белки содержат последовательности аминокислот, распознаваемые ферментами убиквитинизации.

ЛЕКЦИЯ 14. СЕНСОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

1. Передача информации через клеточную мембрану. Белковые каналы, транспортеры и рецепторы.
2. Роль киназ и G-белков в регуляции.
3. Белковые домены, узнающие специфические последовательности ДНК (гомеодомен, "лейциновая молния", "цинковые пальцы").
4. Сенсорные механизмы бактерий. Двухкомпонентные регуляторные системы: принцип действия.
5. Сенсорные механизмы эукариот. Сигнальные пути JAK-STAT и Ras/MAPK.

1. Передача информации через клеточную мембрану. Белковые каналы, транспортеры и рецепторы.

Все клетки и внутриклеточные органеллы окружены мембранами, играющими важную роль в их структурной организации и функционировании: отделяют клетки от окружающей среды и делят ее на компартменты (отсеки); регулируют транспорт веществ в клетки и органеллы и в обратном направлении; обеспечивают специфику межклеточных контактов; воспринимают сигналы из внешней среды.

Биологические мембраны построены из липидов и белков, связанных друг с другом с помощью нековалентных взаимодействий. Основу мембраны составляет **двойной липидный слой**, в состав которого включены белковые молекулы (рис. 85).

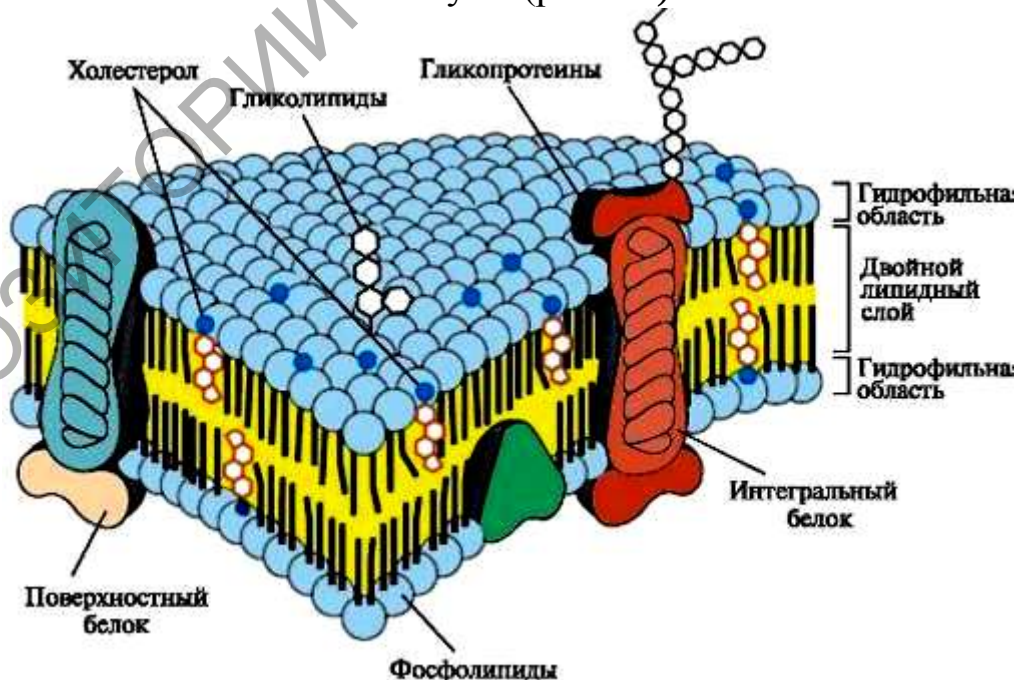


Рисунок 85. Поперечный разрез плазматической мембраны

Липидный бислой образован двумя рядами фосфолипидных молекул, гидрофобные «хвосты» которых направлены внутрь, а гидрофильные группы - полярные «головки» обращены наружу и контактируют с водной средой.

Белки мембран различаются по своему положению в мембране (рис. 86). Белки, контактирующие с гидрофобной областью липидного бислоя, должны иметь неполярный домен. Многие мембранные белки ковалентно связаны с остатками жирных кислот (ацилированы). Ацильные остатки жирных кислот, присоединенные к белку, обеспечивают его «заякорение» в мембране и возможность диффузии. Кроме того, белки мембран подвергаются таким посттрансляционным модификациям, как гликозилирование и фосфорилирование. Гликозилирование наружной поверхности интегральных белков защищает их от повреждения протеазами межклеточного пространства.

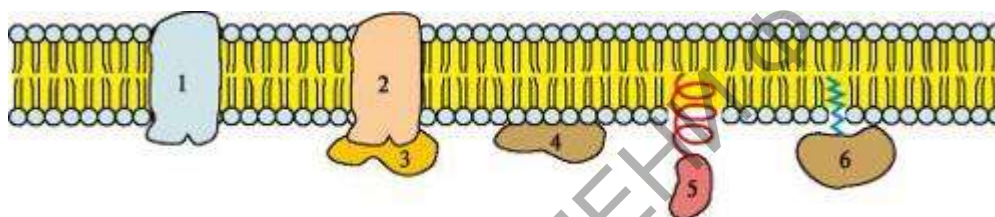


Рисунок 86. Белки мембран: 1, 2 - трансмембранные белки; 3, 4, 5, 6 - поверхностные белки.

Трансмембранная передача сигналов. Важное свойство мембран – способность воспринимать и передавать внутрь клетки сигналы из окружающей среды. Восприятие клетками внешних сигналов происходит при их взаимодействии с рецепторами, расположенными в мембране клеток-мишеней. Рецепторы, присоединяя сигнальную молекулу, активируют внутриклеточные пути передачи информации, это приводит к изменению скорости метаболических процессов.

Сигнальная молекула, специфически взаимодействующая с мембранным рецептором, называется **первичным мессенджером**. В качестве первичных мессенджеров выступают различные химические соединения - гормоны, нейромедиаторы, ростовые факторы или физические факторы, например квант света. Рецепторы клеточной мембраны, активированные первичными мессенджерами, передают полученную информацию системе белков и ферментов, которые образуют **каскад передачи сигнала**, обеспечивающий усиление сигнала в несколько сот раз. Время ответа клетки, заключающееся в активации или инактивации метаболических процессов, мышечного сокращения, транспорта веществ из клеток-мишеней, может составлять несколько минут.

Мембранные **рецепторы** подразделяются на:

- рецепторы, содержащие субъединицу, связывающую первичный мессенджер и ионный канал, например рецептор ацетилхолина на постсинаптической мембране;
- рецепторы, способные проявлять каталитическую активность после присоединения сигнальной молекулы, например рецептор инсулина;
- рецепторы, с помощью G-белков активирующие образование вторичных (внутриклеточных) мессенджеров, передающих сигнал специфическим белкам и ферментам цитозоля (рис. 87).

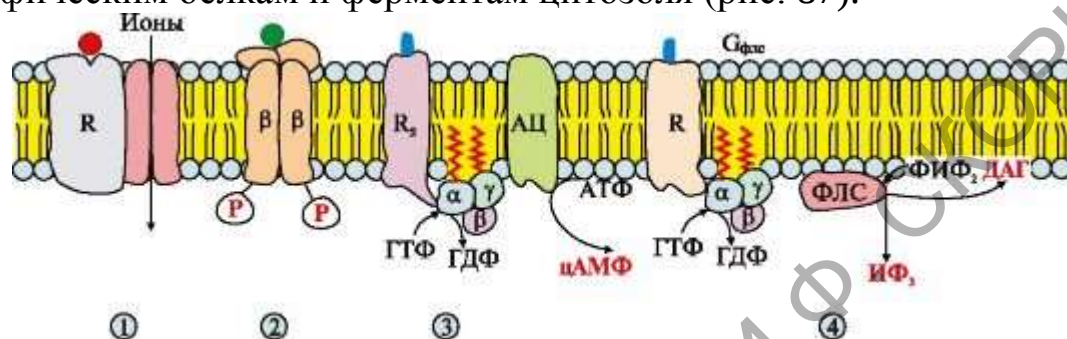


Рисунок 87. Рецепторы, локализованные в мембране: 1 - содержащие субъединицу, связывающую сигнальную молекулу и ионный канал; 2 - проявляющие каталитическую активность после присоединения сигнальной молекулы; 3, 4 - передающие сигнал на фермент аденилатциклазу (АЦ) или фосфолипазу С (ФЛС) при участии мембранных G-белков.

Вторичные мессенджеры имеют небольшую молекулярную массу, с высокой скоростью диффундируют в цитозоле клетки, изменяют активность соответствующих белков, а затем быстро расщепляются или удаляются из цитозоля.

Роль **вторичных мессенджеров** выполняют молекулы и ионы:

- цАМФ (циклический аденозин-3',5'-монофосфат);
- цГМФ (циклический гуанозин-3',5'-монофосфат);
- ИФ₃ (инозитол-1,4,5-трифосфат);
- ДАГ (диацилглицерол);
- Ca²⁺.

Существуют гормоны (стероидные и тиреоидные), которые, проходя липидный бислой, проникают в клетку и взаимодействуют с внутриклеточными рецепторами. Физиологически важным различием между мембранными и внутриклеточными рецепторами является скорость ответа на поступающий сигнал. В первом случае эффект будет быстрым и непродолжительным, во втором - медленным, но длительным.

Мембранным белкам принадлежит решающая роль в транспорте веществ через мембраны, и для выполнения этой роли наилучшим образом подходят трансмембранные белки, которые охватывают про-

странство как внутриклеточное, так и межклеточное.

Транспорт веществ через мембраны белки осуществляют различными способами. Формально разделяют:

- *АТФ-насосы* (рис. 88(а)),
- *ионные каналы* (рис. 88(б)),
- системы вторичного активного транспорта (рис. 89), которые называют *транспортёрами* или переносчиками.

АТФ-насосы, или просто насосы, являются АТФазами, в которых энергия гидролиза АТФ используется для переноса ионов или малых молекул через мембрану (рис. 88(а)).

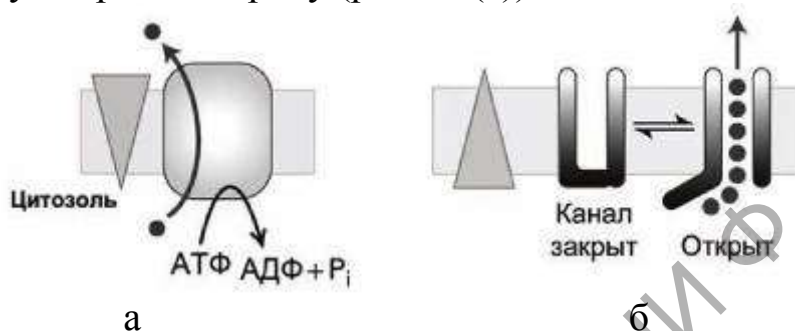


Рисунок 88. Транспорт веществ через биомембрану: а – АТФ-насос; б – ионный канал. Треугольниками обозначены градиенты концентрации.

Направление переноса определяется структурой АТФ-насоса и не связано с направлением градиента концентрации метаболита по обе стороны мембраны. Поэтому насосы используются клетками для создания концентрационного градиента, перенося ионы из клеточного компартмента с низкой концентрацией в компартмент с высокой концентрацией данного иона. Такой транспорт называется активным транспортом, а образующийся градиент концентрации ионов (электрохимический градиент) формирует электрический мембранный потенциал биомембраны.

Хорошо изучены такие ионные насосы, как Ca^{2+} -АТФаза, Na-K-АТФаза и протонная помпа. Характерная величина скорости переноса ионов через мембрану ионным насосом составляет 100–103 ионов в секунду.

Канальные белки (рис. 88(б)) обеспечивают пассивный транспорт молекул и ионов через биомембрану за счет трансмембранного градиента концентрации. Иногда такой процесс диффузии вещества через мембрану, обеспечиваемый канальными белками, называют облегченной диффузией.

Молекулы и ионы проходят через гидрофильный канал в теле белка со скоростью 107–108 ионов в секунду. Некоторые ионные каналы всегда открыты, другие имеют так называемые белковые "воро-

та" – подвижные домены, которые в ответ на внешнее воздействие закрывают канал.

Среди схем вторичного активного транспорта (*транспортёры*) выделяют унипорт, симпорт и антипорт (рис. 89).

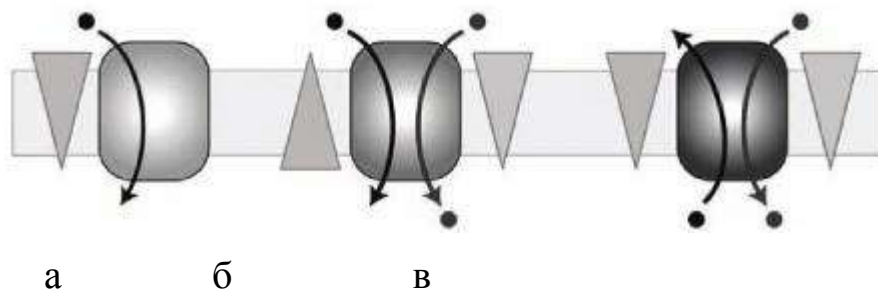


Рисунок 89. Схемы вторичного активного транспорта: а – унипорт, б – симпорт, в – антипорт. Треугольниками обозначены градиенты концентрации или электрического потенциала на биомембране

Унипорты переносят единственный тип молекул по направлению градиента за счет облегченной диффузии. Глюкоза и аминокислоты транспортируются через плазматическую мембрану клетки через такие унипорты.

В отличие от унипортов, в антипортах и симпортах перемещение молекул или ионов данного типа против их градиента концентрации энергетически сопряжено с перемещением одного или нескольких типов других молекул или ионов по их электрохимическому градиенту концентрации. Оба этих типа транспортёров иногда называют общим названием котранспортёры (или копереносчики), подчеркивая их особенность переносить два вида молекул одновременно.

Цикл работы и АТФ-насосов и вторичных транспортёров представляет собой серию конформационных изменений этих транспортных белков, в ходе которой транспортируемые вещества присоединяются к белку с одной стороны мембраны, а после конформационных переходов, оказавшись по другую сторону мембраны, отсоединяются от белка. Поскольку в ходе такого цикла переносится через мембрану от одной до трех молекул, то скорость транспорта АТФ-насосами и транспортёрами относительно мала (1–10 молекул в секунду).

Ионные каналы также конформационно переключаются между закрытым и открытым состояниями, но когда канал открыт, скорость потока ионов через него гораздо выше, достигая значения 10⁸ ионов в секунду.

2. Роль киназ и G-белков в регуляции.

Киназы (фосфотрансферазы) — ферменты, катализирующие перенос фосфатной группы от молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) на различные субстраты. Обеспечивают включение глюко-

зы и гликогена в процесс гликолиза в живых клетках, участвуют в синтезе важных для организма соединений.

Протеинкиназы — подкласс ферментов киназ. Они модифицируют другие белки путем фосфорилирования остатков аминокислот, имеющих гидроксильные группы (серин, треонин и тирозин) или гетероциклической аминогруппы гистидина. Характерным примером является работа протеинкиназы А, так называемой цАМФ-зависимой протеинкиназы, которая активируется с помощью цАМФ (циклического аденозин монофосфата). цАМФ выполняет роль медиатора многих внеклеточных сигналов в клетках животных и образуется из АТФ в процессе реакции, катализируемой ферментом аденилатциклазой (рис. 90).

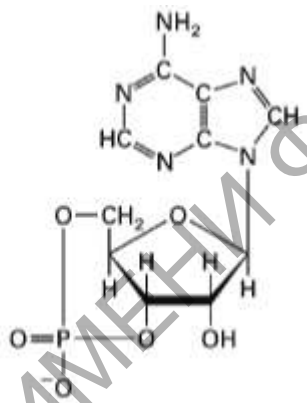


Рисунок 90. Циклический аденозин монофосфат (цАМФ)

Протеинкиназа А, переносит фосфатную группу (фосфорилирует) с АТФ на серин, треонин или тирозин, тем самым изменяя активность необходимых белков, в том числе и в ответ на внешнее воздействие. Активный центр протеинкиназы А расположен на каталитической субъединице, построенной из 240 аминокислот, которая называется киназное ядро (рис. 91).

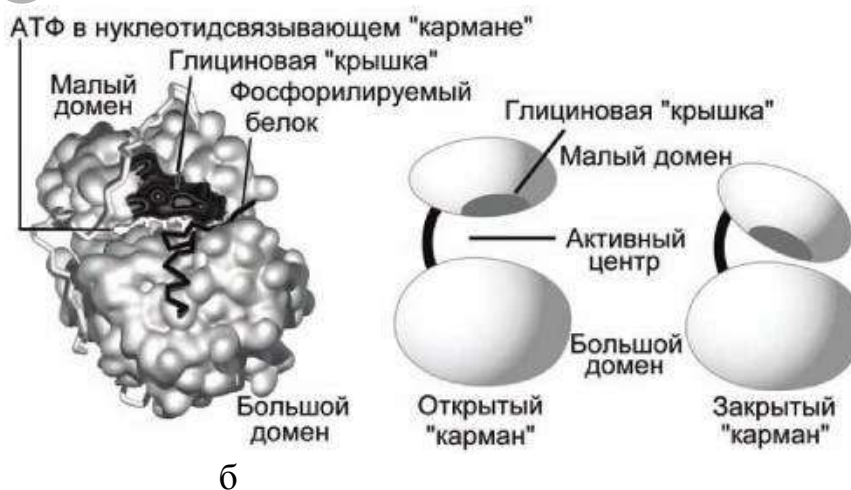


Рисунок 91. Протеинкиназа А: а — схема киназного ядра; б — конформации киназного ядра.

Киназное ядро, состоящее из двух доменов – большого и малого, разделенных глубокой щелью ("карманом") – связывает АТФ и белок-субстрат и активирует перенос фосфатной группы с АТФ на белок-субстрат. Активный центр формируют аминокислотные остатки обоих доменов киназного ядра.

Адениновое кольцо АТФ точно укладывается в основание щели между двумя доменами и фиксируется там "глициновой крышкой", которая образована последовательностью Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val (X – любая аминокислота).

АТФ является общим субстратом для всех протеинкиназ, однако каждая протеинкиназа распознает специфический белок-субстрат по специфической для него последовательности аминокислот. Для протеинкиназы А такая последовательность: Arg-Arg-X-Ser-Y, где X – любая аминокислота, Y – гидрофобная аминокислота.

Каталитическое ядро протеинкиназы А может принимать одну из двух конформаций – "открытый карман" или "закрытый карман".

В "открытой" конформации субстраты могут "погрузиться" в карман и связаться с активным центром.

Связывание субстратов стимулирует конформационный переход молекулы фермента, карман закрывается глициновой крышкой и активируется перенос фосфатной группы с АТФ на белок-субстрат. Это пример механизма "индуцированного соответствия" (induced fit) фермента и субстрата, когда топология активного центра фермента "подгоняется" под топологию субстрата. Молекулы АДФ и фосфорилированного белка-субстрата теряют сродство к ферменту после фосфорилирования, фермент претерпевает конформационный переход в "открытую" форму, "поднимается" глициновая крышка, карман открывается, и модифицированные субстраты выходят из него.

G-белки (ГТФ-связывающие белки) - универсальные посредники при передаче сигналов от рецепторов к ферментам клеточной мембраны, катализирующим образование вторичных посредников гормонального сигнала. Относят к группе "заякоренных" белков (рис. 92). G-белки – олигомеры, состоящие из α , β и γ -субъединиц. В пределах одной клетки все G-белки, как правило, имеют одинаковый комплект $\beta\gamma$ -субъединиц. Поэтому G-белки принято различать по их α -субъединицам. Каждая α -субъединица в составе G-белка имеет специфические центры: связывания ГТФ или ГДФ; взаимодействия с рецептором; связывания с $\beta\gamma$ -субъединицами; фосфорилирования под действием протеинкиназы С; взаимодействия с ферментом аденилатциклазой или фосфолипазой С.



Активированная α -субъединица G-белка (α -ГТФ) взаимодействует со специфическим белком клеточной мембраны и изменяет его активность. Такими белками могут быть ферменты аденилатциклаза, фосфолипаза C, фосфоди-эстераза цГМФ, Na^+ -каналы, K^+ -каналы.

Следующий этап цикла функционирования G-белка - дефосфорилирование ГТФ, связанного с α -субъединицей, причём фермент, ката-

лизирующий эту реакцию, - сама α -субъединица. Дефосфорилирование приводит к образованию комплекса α -ГДФ, который не комплементарен специфическому белку мембраны (например, аденилатциклазе). G-белок возвращается к неактивной форме - $\alpha\beta\gamma$ -ГДФ. При последующей активации рецептора и замене молекулы ГДФ на ГТФ цикл повторяется снова. Некоторые формы протеинкиназ могут фосфорилировать α -субъединицы G-белков. Фосфорилированная α -субъединица не комплементарна специфическому белку мембраны, например аденилатциклазе или фосфолипазе C, поэтому не может участвовать в передаче сигнала.

3. Белковые домены, узнающие специфические последовательности ДНК (гомеодомен, "лейциновая молния", "цинковые пальцы").

Анализ структуры ДНК показал существование локальных ее особенностей, специфически узнаваемых молекулами белков. В случае взаимодействия между поверхностью белка и структурой ДНК образуется множество специфических контактов при участии водородных связей, ионного и гидрофобного взаимодействий. Исследование белков, участвующих в регуляции экспрессии генов, позволило выделить несколько групп, объединенных общими признаками в структурной организации.

Спираль-поворот-спираль. Первая изученная группа таких белков, связывающихся с ДНК, получила название спираль-поворот-спираль. Два спиральных участка молекулы белка, согнутые под углом в области короткого линейного отрезка, располагаются таким образом, что С-концевой отрезок специфически узнает определенную последовательность нуклеотидов в ДНК.

Как правило, все белки с такой структурой выполняют свою функцию в виде димеров. К этой группе белков относится и **гомеодомен**. **Гомеодомен** - высоко консервативный домен из 60 аминокислот, обнаруженный среди большого семейства факторов транскрипции. Семейство было сначала идентифицировано у *Drosophila* (до 60 белков), а в последующем обнаружено у всех живых организмов от дрожжей до человека. Эти белки кодируются группой генов, изменение которых, может вызвать нарушение нормального формирования организма (преобразования одной части тела в другую, так называемые гомеотические преобразования).

Цинковые пальцы: второй тип наиболее часто встречающихся белковых структур, узнающих ДНК содержит в качестве стабилизирующего элемента ион цинка. Существует целое семейство таких белков, наиболее простой из которых составлен из α -спирального отрезка цепи и отрезка с β -структурой, связанных между собой ионами цинка (рис. 94).

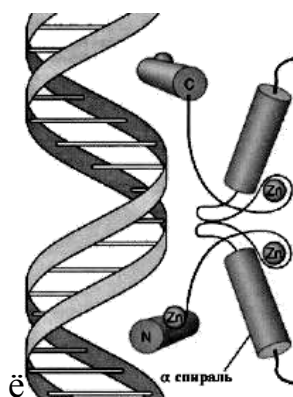


Рисунок 94. Взаимодействие ДНК с белковой структурой «цинковые пальцы».

Этот тип белков участвует в регуляции транскрипции рибосомных РНК (фактор транскрипции РНК pol III, TFIIIA). Вторым вариантом такой структуры составлен из 2-х α-спиральных участков, также связанных ионами цинка. К ним относятся внутриклеточные рецепторы стероидных гормонов и гормонов щитовидной железы. Атомы цинка связываются с остатками цистеина и гистидина, способствуя формированию пальцевидных структур. Области пальца могут "вставляться" в главное углубление спирали ДНК. Интервал цинковой области пальца в этом классе факторов транскрипции совпадает с полуповоротом двойной спирали.

Лейциновая застежка - молния: как указывалось выше, большинство белков взаимодействуют с ДНК в форме димеров, причем в образовании димера участвуют последовательности аминокислот, которые не задействованы в самом механизме взаимодействия с ДНК.

Белки с лейциновым доменом застежки-молнии сочетают при этом обе функции: и образование димера, и связывание с ДНК. В белке имеются участки, богатые гидрофобными аминокислотами (часто лейцином) радикалы которого выступают из α-спиральной структуры белка (рис. 95).

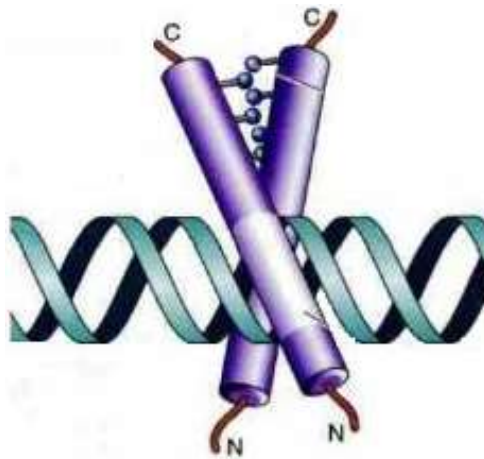


Рисунок 95. Белковая структура «лейциновая застежка-молния».

Два белка с такими участками могут формировать суперспираль в которой выступающие группы радикалов лейцина взаимодействуют с лейциновыми радикалами другого мономера подобно застежке-молнии. Димер при этом приобретает Y- форму.

Ножки этой структуры содержат участки узнавания последовательности ДНК. Область лейциновой застежки-молнии присутствует во многих связывающих ДНК белках, типа с-Мус, С/ЕВР и т.д.

4. Сенсорные механизмы бактерий. Двухкомпонентные регуляторные системы: принцип действия и примеры.

Микроорганизмы способны распознавать, обрабатывать и адекватно отвечать на большое количество сигналов из внешней среды благодаря сигнальной трансдукции. Сигнальная трансдукция заключается в распознавании сигнала, его проведении и активации соответствующих генов. У прокариот сигнальная трансдукция происходит с помощью двухкомпонентных систем, состоящих из **сенсорной гистидиновой киназы** и **активатора транскрипции** (регулятора ответа).

Сигналом для активации может служить изменение окислительно-восстановительного потенциала клетки, ионной концентрации среды, недостаточность калия, низкое осмотическое давление, присутствие антибиотика и т. д. Действие сигнала приводит к взаимодействию клеточного сигнального лиганда, связанного с рецептором, и **сенсорной киназы** - первого компонента сигнальной трансдукции.

Распознавание сигнала приводит к образованию из двух мономеров гистидиновой киназы димера, что сопровождается аутофосфорилированием, в процессе которого фосфатная группа с АТФ переносится на остатки гистидина киназы (рис. 96).

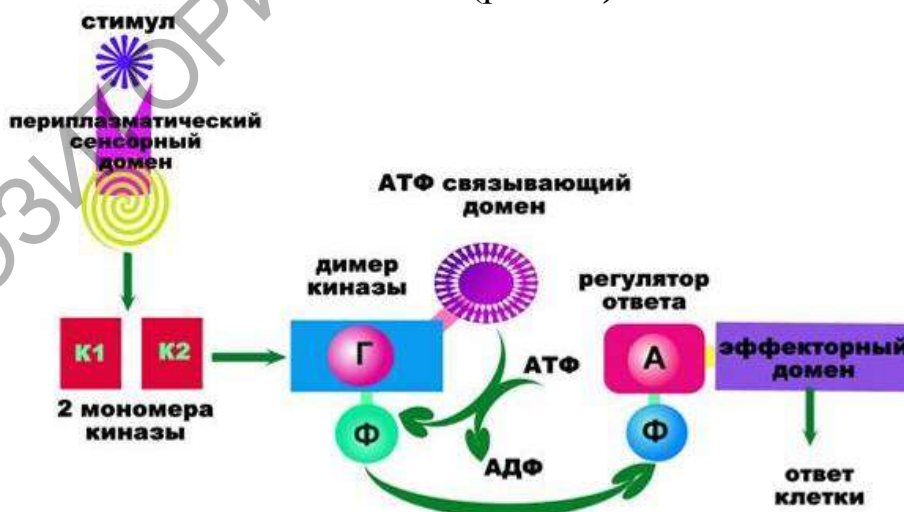


Рисунок 96. Схема устройства двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции прокариот

Фосфорилированная сенсорная киназа взаимодействует с соответствующим ей регулятором ответа, состоящим из двух доменов: регуляторного и ДНК-связывающего. Взаимодействие киназы и регулятора сопровождается переносом фосфатной группы с гистидина на остатки аспартата в составе регулятора ответа, в результате чего происходит активация гена или их группы.

В связи с тем, что сенсорная киназа обладает способностью дефосфорилировать регулятор ответа, то уровень экспрессии гена контролируется и приводится в соответствие с уровнем сигнала. Двухкомпонентные сигнальные системы могут находиться друг с другом в сетевых взаимодействиях.

Двухкомпонентная сигнальная система у патогенных микроорганизмов может приводить к инициации паразитического образа жизни и развитию инфекционного заболевания, а также формированию антибиотикорезистентности. Так например у *Streptococcus pneumonia* двухкомпонентная сигнальная трансдукция *ciaH* – *ciaR* активирует синтез пенициллин связывающего белка, обеспечивающего высокие уровни резистентности к пенициллину.

5. Сенсорные механизмы эукариот. Сигнальные пути JAK-STAT и Ras/MAPK. Способность эукариотических клеток получать внешние сигналы и реагировать на них является очень важной как для их дифференцировки, так и для развития вообще. В ответ на внешние факторы клетка отвечает адаптацией своих метаболических процессов. Переход к делению клеток (пролиферации) также происходит только в ответ на внешние сигналы. Приводящие к пролиферации сигналы названы *митогенами* (стимулирующими митозы). К митогенам относятся полипептидные ростовые факторы, некоторые гормоны (напр., инсулин), цитокины, некоторые физические факторы.

Эффекты митогенов реализуются по специфическим путям. Одним из основных и наиболее хорошо изученных является **Ras/MAPK** – путь, имеющий много боковых ветвей и звеньев. Кроме того, пролиферативные сигналы могут передаваться через **JAK-STAT**- и другие сигнальные пути.

В клетках млекопитающих **Ras/MAPK** каскад (рис. 98) инициируется взаимодействием лиганда (митогена) со *специфическим трансмембранным тирозинкиназным рецепторным белком*.

События, реализуемые в **Ras/MAPK** сигнальном пути:

1. *Взаимодействие митогена с трансмембранным рецепторным белком (активация рецепторной тирозинкиназы)*. Одним из митогенов является *эпидермальный фактор роста* – полипептид из 53 а.о., стимулирующий деление эмбриональных тканей и эпителия. Транс-

мембранный рецепторный белок состоит из внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного домена, обладающего тирозинкиназной активностью.

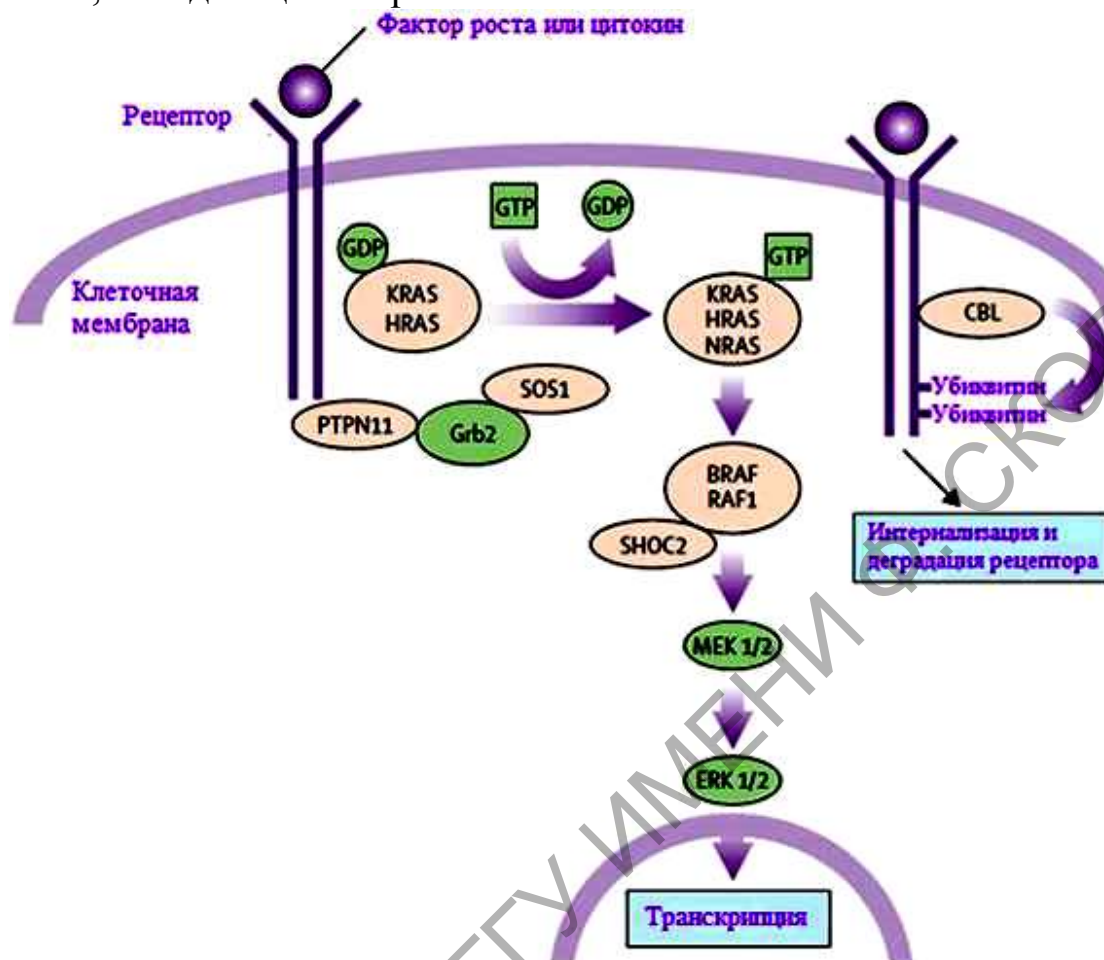


Рисунок 98. RAS-MAPK сигнальный путь. Ростовые сигналы передаются с активированных фактором роста рецепторов к ядру. Мутации в KRAS, SOS1, NRAS и RAF1 ассоциированы с синдромом Нуна.

При взаимодействии эпидермального фактора роста с трансмембранным рецепторным белком происходит аутофосфорилирование внутриклеточного домена данного белка по остаткам тирозина, что приводит к связыванию с ним адапторного белка **Grb2**, который в свою очередь связывается со следующим адапторным белком **Sos** (см. рис. 98).

2. *Активация Ras-белка.* Комплекс **Grb2/Sos** взаимодействует с **Ras**-белком на внутренней поверхности плазматической мембраны. В нормальных клетках молекулы **Ras** присутствуют в неактивной GDP-связанной конформации. **Sos**-белок (в комплексе **Grb2/Sos**) инициирует удаление GDP и последующее связывание **Ras** с GTP, активируя таким образом один из центральных белковых посредников при передаче сигнала. Этот важный белок имеет три формы – **KRas**, **HRas** и **NRas**.

3. *Активация белка Raf.* Белок **Ras** имеет в клетке несколько мишеней. Его эффекторами могут служить **Raf**-белок (следующий компонент в Ras/MAPK-пути), протеинкиназа C, а также другие белки и ферменты. **Raf** – это серин/треониновая киназа, состоящая из двух доменов, один из которых (С-терминальный) является каталитическим. **Raf** является первым компонентом каскада т.н. митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), которые последовательно активируя друг друга (**Raf-MEK-ERK**) путем фосфорилирования в конечном итоге фосфорилируют транскрипционные факторы, поступающие в ядро. Следствием этого является изменение генной экспрессии, увеличение роста и дифференцировки клеток.

JAK-STAT – более простой путь внутриклеточной передачи сигнала с рецепторов цитокинов у эукариот (рис. 99).

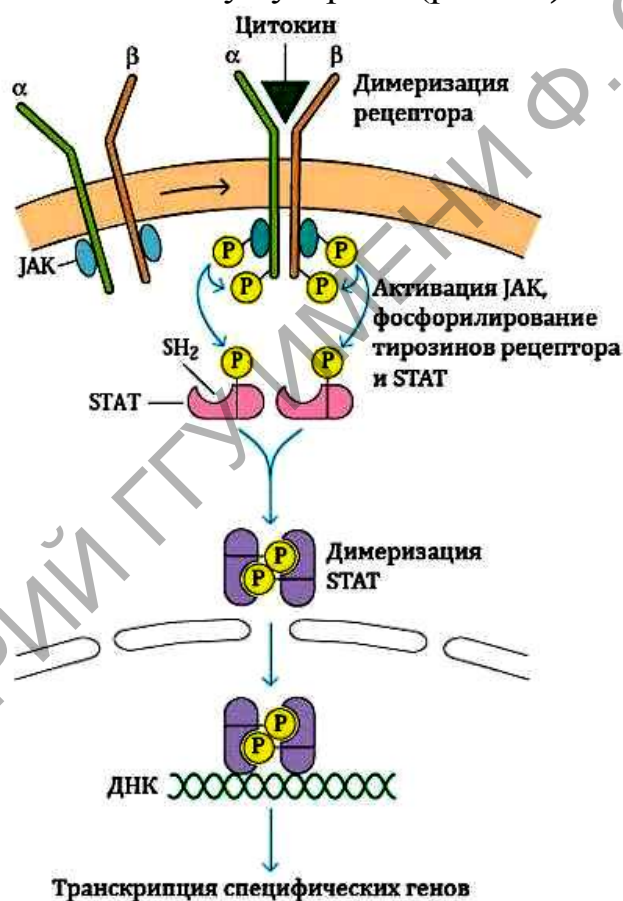


Рисунок 99. Схема сигнального пути JAK-STAT.

Две ключевых молекулы этого пути - киназа **JAK** и транскрипционный фактор **STAT** (англ. signal transducers and activators of transcription - передатчики сигнала и активаторы транскрипции).

Цитокиновый рецептор состоит из двух цепей - α и β, причем цепь α отвечает за связывание с цитокином и передачу сигнала, а β необходима только для передачи сигнала и имеет второстепенную роль в связывании с цитокином. С обеими цепями цитокинового ре-

цептора ассоциирована киназа JAK. При связывании цитокина с рецептором, последний димеризуется, JAK активируется и фосфорилирует специфические тирозиновые аминокислотные остатки в составе рецептора, что дает возможность присоединиться к ним транскрипционному фактору STAT своим SH2-доменом.

JAK киназа также фосфорилирует и присоединенный к рецептору STAT, после чего он отсоединяется от рецептора и формирует *димер*. Димерная форма STAT перемещается в ядро и запускает экспрессию генов, имеющих соответствующие регуляторные последовательности в их промоторных участках.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРЬНЫ

ЛЕКЦИЯ 15

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

1. Клеточный цикл, периоды.
2. Контрольные точки клеточного цикла.
3. Генетическая регуляция процессов, обеспечивающих клеточный цикл.
4. Протоонкогены и гены-супрессоры опухолей. Дополнительная регуляция клеточного цикла белком p53.

1. Клеточный цикл, периоды.

Клеточный цикл – жизнь клетки с момента ее образования в процессе деления материнской клетки до собственного деления (включая это деление) или до гибели.

Современную модель клеточного цикла предложили **Говард** и **Пелк** в 1953 г. Согласно их модели в клеточном цикле выделяют две фазы: интерфаза (включающая пресинтетический (G_1), синтетический (S) и постсинтетический (G_2) периоды) и митоз (M) – собственно деление клетки (рис. 99).



Рисунок 99. Периоды клеточного цикла: G_1 – пресинтетический период; S – синтетический период; G_2 – постсинтетический период; G_0 – период покоя; M – митоз. $2n$ – диплоидный набор хромосом; $2c$, $4c$ – количество сестринских хроматид в наборе.

Интерфаза – промежуток клеточного цикла между двумя делениями. В течение всей интерфазы хромосомы неспирализованы и находятся в ядре клетки в виде хроматина. Интерфаза состоит из трех периодов: пресинтетического, синтетического и постсинтетического.

Пресинтетический период (G_1) – начинается сразу после деления клетки и является наиболее длительной частью интерфазы (продолжительность от нескольких часов до нескольких суток). Во время этого периода клетка восстанавливается после деления: происходит ее активный рост, увеличивается количество органоидов, накапливается энергия и вещества для последующего удвоения ДНК. Происходит деление митохондрий и хлоропластов (в растительной клетке), активно синтезируются молекулы АТФ, белки (гистоны, структурные белки, ферменты), молекулы РНК. В течение пресинтетического периода каждая хромосома состоит из одной хроматиды. Таким образом, набор хромосом и хроматид диплоидной клетки составляет: **$2n2c$** .

Необходимо отметить, что часть клеток многоклеточного организма встает на путь специализации и после начала пресинтетического периода может переходить в **период покоя (G_0)**. В этом состоянии они выполняют свои специфические функции, в них протекают процессы обмена веществ и энергии, но не происходит переход к последующим периодам клеточного цикла. Такие клетки, как правило, навсегда утрачивают способность к делению (нейроны, клетки хрусталика глаза) или в редких случаях сохраняют ее (лейкоциты, клетки печени).

Синтетический период (S). Происходит удвоение ДНК путем репликации, протекает синтез белков, необходимых для последующего формирования хромосом, а также происходит удвоение центриолей. **Репликация** – процесс точного удвоения (самовоспроизведения) молекул ДНК, сопровождающийся передачей точных копий генетической информации дочерним клеткам (рис. 100).

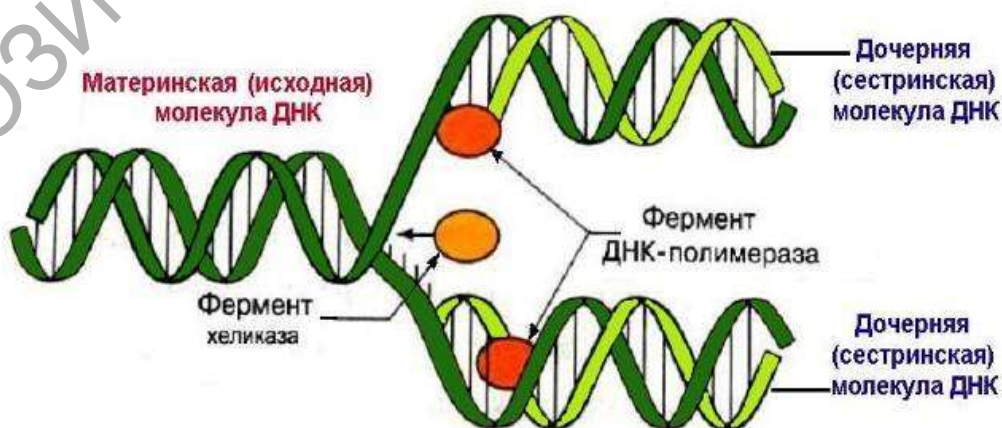


Рисунок 100. Процесс репликации ДНК.

Репликация происходит полуконсервативным способом. Двойная спираль ДНК разъединяется с помощью специфических ферментов **хеликаз** на две одноцепочечные молекулы. С каждой одноцепочечной молекулой связываются «главные» ферменты репликации **ДНК-полимеразы**. Молекулы ДНК-полимераз начинают двигаться вдоль материнских цепей, используя их как матрицу, и синтезировать новые дочерние цепи по принципу комплементарности. В итоге образуются две идентичные двойные спирали ДНК, состоящие из одной материнской и одной дочерней цепей ДНК. К концу синтетического периода хромосома состоит уже из двух идентичных сестринских хроматид, и хромосомный набор диплоидной клетки составляет: **2n4c**.

Постсинтетический период (G₂) наступает после удвоения ДНК. В это время клетка накапливает энергию и синтезирует белки, особенно тубулин, который используется для построения микротрубочек веретена деления, а также ядерные белки. Происходит проверка и восстановление ошибок, допущенных при репликации ДНК в синтетическом периоде (**репарация**). В течение всего постсинтетического периода хромосомный набор клетки остается неизменным: **2n4c**.

После прохождения указанных периодов интерфаза завершается, и клетка переходит к процессу деления – митоза.

В ходе митоза из одной материнской клетки образуются две дочерние клетки. При этом сестринские хроматиды каждой хромосомы материнской клетки отделяются друг от друга и попадают в разные дочерние клетки. В результате образовавшиеся молодые дочерние клетки имеют хромосомный набор: **2n2c**.

Таким образом, клеточный цикл охватывает промежуток времени от возникновения клетки до ее полного разделения на две дочерние и включает интерфазу (G₁, S, G₂) и митоз.

2. Контрольные точки клеточного цикла.

Процессы точной репликации и распределения ДНК зависят от строгой последовательности фаз клеточного цикла. Начало следующей фазы осуществляется только тогда, когда заканчивается предыдущая. Для определения завершения каждой фазы клеточного цикла необходимо наличие в нем **контрольных точек**. Если клетка «проходит» контрольную точку, то наступает следующая фаза клеточного цикла. Если же какие-либо обстоятельства, например повреждение ДНК, мешают клетке пройти через контрольную точку, то клетка останавливается и в другую фазу клеточного цикла не переходит, по крайней мере, до тех пор, пока не будут устранены препятствия, не позволявшие клетке пройти через контрольный пункт. Существует **четыре контрольных точки** клеточного цикла (рис. 101):

1) точка в G₁, где проверяется целостность ДНК, перед вхождением в S-фазу и репликацией ДНК;



Рисунок 101. Контрольные точки клеточного цикла.

2) точка в S-фазе, в которой проверяется правильность репликации ДНК;

3) точка в G_2 , в которой проверяются повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих контрольных точек. В G_2 -фазе детектируется полнота репликации ДНК, и клетки, в которых ДНК недореплицирована, не входят в митоз.

4) точка начальной M фазы, в которой проверяется готовность структур клетки к делению и целостность веретена деления.

3. Генетическая регуляция фаз клеточного цикла.

Закономерная последовательность смены периодов клеточного цикла осуществляется при взаимодействии ряда белковых факторов, к которым относятся **митогены** (факторы, стимулирующие митоз), **белки-циклины** и **циклин-зависимые киназы**. Клетки, находящиеся в G_0 -фазе, могут вступать в клеточный цикл при действии на них специфических митогенов, таких как: эритропоэтин, **факторы роста** некоторых клеток (нервов, фибробластов), гормоны (в особенности эстрогены) и т.д.

Активация пролиферации

В G_1 периоде, в так называемой **R-точке (точка рестрикции, первая «контрольная точка»)**, определяется, будет ли в дальнейшем клетка делиться или нет. Точка рестрикции делит G_1 период на два функционально различных этапа: **G_{1pm}** (постмитотический этап) и **G_{1ps}** (пресинтетический этап). В течение G_{1pm} клетка оценивает присутствующие в ее окружении **ростовые факторы**. Если необходимые ростовые факторы присутствуют в **достаточном количестве**, то клетка **переходит в G_{1ps}** . Клетки, перешедшие в G_{1ps} этап, продолжают нормальное прохождение всего клеточного цикла даже при отсутствии ростовых факторов. Если **отсутствуют** необходимые ростовые факторы в G_{1pm} периоде, то клетка переходит в состояние **пролиферативного покоя (G_0 периода)**.

Переход клетки к G_{1ps} представляет собой **сложный каскадный процесс**, активируемый митогенами. Эффекты митогенов распознаются

соответствующими **рецепторами** и реализуются по специфическим путям.

Важнейшим путем передачи пролиферативного сигнала является **Ras/MAPK-путь** (рис. 102). На этом пути сигнал от тирозинкиназного рецептора передается через ряд белковых посредников, ключевым из которых является **белок Ras**, на митогенактивируемые протеинкиназы (МАРК). Это, в свою очередь, включает каскад фосфорилирования, приводящий в конечном итоге к фосфорилированию многих стартовых белков, индуцирующих транскрипцию ранних генов (в том числе и ответственных за синтез белков циклинов и ферментов Cdk) и обеспечивающих пролиферацию клетки.

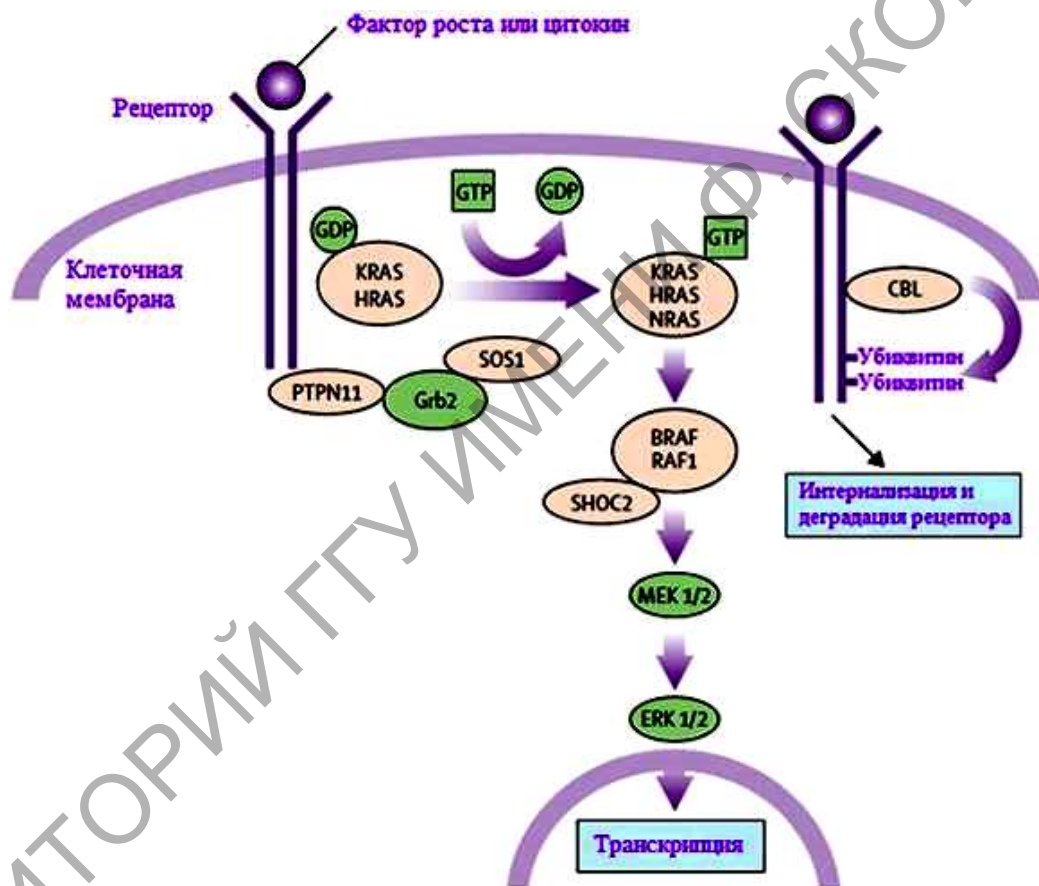


Рисунок 102. RAS-MAPK сигнальный путь. Ростовые сигналы передаются с активированных фактором роста рецепторов к ядру.

Открытие **циклинов и циклинзависимых протеин-киназ** позволило правильно интерпретировать механизмы, регулирующие клеточный цикл. **Циклины** представляют собой группы белков, синтез которых осуществляется в зависимости от периода клеточного цикла. Циклины классифицируются на три группы:

1. периода G_1 – циклины D и E;
2. периода S- циклин A;
3. периода G_2 – циклин B.

Циклины активируют **циклинзависимые киназы (Cdk)**, образуя с ними комплекс, имеющий киназную активность. Во время образования комплексов, циклины вызывают пространственную одификацию Cdk, в результате чего протеинкиназы становятся специфичными для различных субстратов. Специфичность каталитического действия **комплекса циклины/Cdk** лежит в основе прохождения клеткой фаз клеточного цикла (рис. 103).

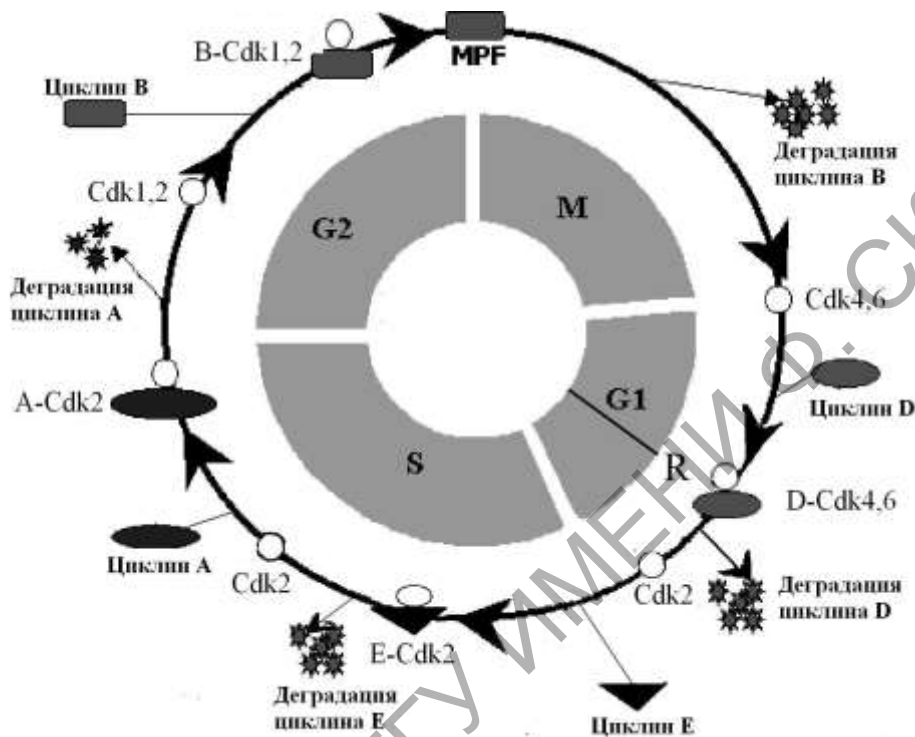


Рисунок 103. Регуляция клеточного цикла.

Регуляция G_1 периода

Основным результатом каскадного процесса, происходящего вследствие связывания ростового фактора с рецептором на поверхности клетки, является **активация комплекса циклин D-Cdk4,6**. Этот комплекс **фосфорилирует мишени**, необходимые для прохождения в S период.

Основным субстратом комплекса циклин D-Cdk4,6 является продукт гена **ретинобластомы (белок Rb)**. Фосфорилирование белка Rb комплексами циклин D-Cdk4,6 приводит к **высвобождению транскрипционных факторов E2F**, которые инициируют **транскрипцию генов белков**, необходимых для **репликации ДНК**, а также **генов циклина E** и **циклина A**. Активация пары циклин E-Cdk2 ведет к инициации репликации ДНК. Циклин A экспрессируется сразу же после циклина E на границе G1 и S фаз. Активность обоих комплексов — циклин E-Cdk2 и циклин A-Cdk2 — необходима для инициации и правильного протекания ДНК-репликации, а также для гарантии того,

что репликация ДНК инициируется и проходит в течение каждого клеточного цикла только один раз. К тому же циклин A–Cdk2 способствует эффективному протеканию S-фазы, повышая транскрипцию гистоновых и других генов, необходимых для согласованной репликации.

Остановку клеточного цикла в G_1 периоде могут вызвать: повышение уровня ингибиторов Cdk, отсутствие ростовых факторов, повреждения ДНК, внешние негативные воздействия.

Регуляция S периода

S период – это этап клеточного цикла, когда происходит **репликация ДНК**. Каждая из двух дочерних клеток, которые образуются в конце клеточного цикла, должна получить **точную копию ДНК** материнской клетки. Именно поэтому синтез ДНК регулируется крайне жестко. При этом ДНК должна быть активирована для репликации, и тот фрагмент ДНК, который уже был удвоен, не должен вновь реплицироваться.

Репликация ДНК начинается в **точке ori**, где **ORC (Origin of replicating complex)** связывается с ДНК. Несколько компонентов этого комплекса, необходимых для синтеза ДНК, такие как **белок Cdc6** и **белок Mcm** и некоторые другие образуют **пререплекативный комплекс (pre-RC)** уже в поздней M фазе или раннем G_1 периоде, что активирует ДНК для репликации. При переходе от G_1 к S периоду к pre-RC присоединяется еще ряд белков, необходимых для репликации. Для инициации репликации комплекс **циклин A-Cdk2** соединяется с протеинкиназой, которая фосфорилирует ORC и инициирует репликацию. При этом белок Cdc6 отсоединяется от ORC после начала репликации и деградирует. Эти изменения препятствуют повторному запуску репликации. Комплекс **циклин A-Cdk2** так же фосфорилирует Mcm белковые комплексы, что завершает синтез ДНК и запускает проверку ДНК на ошибки (**вторая «контрольная точка»**). Остановка в S периоде происходит вследствие повреждения ДНК.

Регуляция G_2 периода

G_2 период – это этап клеточного цикла, который начинается после завершения репликации ДНК и вплоть до начала деления. Основным регулятором прохождения G_2 периода служит комплекс **циклин B-Cdk2**, который активируется после завершения репликации. Остановка клеточного цикла в G_2 периоде происходит вследствие **инактивации комплекса циклин B-Cdk2** (**третья «контрольная точка»**), который реагирует на повреждения ДНК.

Регулятором перехода от G_2 к M фазе является комплекс **циклин B-Cdk1**, который ингибирован белком Wee1. На протяжении G_2 пе-

риода концентрации **циклин В-Cdk1** постепенно нарастает и после прохождения третьей контрольной точки **циклин В-Cdk1** активирует белок Cdc25, который дефосфорилирует **циклин В-Cdk1**, что вызывает ингибирование и отсоединение белка Wee1 и переход в М фазу. Способность циклин В-Cdk1 активировать свой собственный активатор (Cdc25) и ингибировать свой собственный ингибитор (Wee1) предполагает, что активация циклин В-Cdk1 в митозе резко усиливается при наличии такой позитивной обратной связи

Регуляция митоза

Переход к делению активирует комплекс **циклин В-Cdk2**, который поддерживает процесс деления клетки, однако основным регуляторным комплексом митоза является **циклин В-Cdk1**. Активность комплекса циклин В-Cdk1 приводит к деградации ядерной оболочки, конденсации хроматина и формированию метафазной пластинки. **Активированный комплекс циклин В-Cdk1** гарантирует, что **переход из интерфазы в митоз необратим** за счет его обратного фосфорилирования членами **семейства фосфатаз Cdc25 (четвертая «контрольная точка»)**. Перед тем как клетка переходит из метафазы в анафазу, происходит **деградация циклина В**. Утрата активности комплекса циклин В-Cdk1 индуцирует миграцию хромосом к полюсам и деление клетки надвое.

Таким образом, на разных стадиях клеточного цикла синтезируются разные циклины и в особых случаях супрессорные белки, а также клетка проходит ряд контрольных точек, чем в совокупности и обуславливается регуляция клеточного цикла.

4. Протоонкогены и гены-супрессоры опухолей. Дополнительная регуляция клеточного цикла белком p53.

В настоящее время описаны два класса генов, кодирующих белки, непосредственно участвующие в контроле клеточного цикла: **протоонкогены и гены супрессоры опухолей (антионкогены)**.

Протоонкогены присутствуют в нормальных клетках, функции которых связаны с процессами роста, деления и дифференциации клеток. Они кодируют факторы роста, рецепторы для факторов роста, циклины и т.д. Протоонкогены активны в эмбриональных клетках, а у взрослых – только в пролиферативных тканях (эпителиальные клетки, клетки гематопоеза). В результате мутаций, которые могут происходить случайно, протоонкогены превращаются в **онкогены** (например, c-bcl, c-myc, c-ras, c-jun и т.д.). Онкогены являются таким образом, аномальной гиперактивной формой протоонкогенов, которые способны вызывать избыточную пролиферацию, характерную для опухолевых клеток.

Гены супрессоры опухолей (ГСО) играют чрезвычайно важную роль в физиологии клеток. Их белковые продукты образуют сети межклеточной сигнализации с функциями, противоположными тем функциям, которые вызываются белками, кодируемыми протоонкогенами. ГСО в норме ингибируют клеточную пролиферацию и дифференциацию. Некоторые ГСО кодируют белки, контролирующие репликацию и репарацию ДНК, задерживают клетку в периоде S до полного завершения этих процессов. К таким генам относится ген человека, кодирующий белок p53. Этот ген называется **TP53** и расположен в **хромосоме 17 (17p13.1)**.

Белок p53 («Хранитель генома», «Охранник клеточного цикла») – наиболее мощный и универсальный транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. Белок состоит из **393** аминокислотных остатков и имеет **5 доменов**:

- 1) N-концевой домен, активирующий транскрипцию (англ. transcription-activation domain; TAD) (аминокислотные остатки 1-42);
- 2) Богатый пролином домен, важный для апоптотической активности p53 (АК 80-94);
- 3) ДНК-связывающий домен – «цинковый палец» (АК 100-300);
- 4) Домен, отвечающий за олигомеризацию (АК 307-355);
- 5) С-концевой домен, задействованный в отсоединении ДНК-связывающего домена от ДНК (АК 356-393).

При отсутствии повреждений ДНК белок **p53** находится в неактивном состоянии и активируется только при их появлении. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК; при сильном стрессовом сигнале – запуск **апоптоза**.

В нормальных условиях в клетке экспрессируются белки **p53** и **Mdm2**. Белок Mdm2 препятствует активирующему действию белка p53. N-концевой домен белка Mdm2 связывается с N-концевым активирующим транскрипцию доменом белка p53, в результате чего образуется **комплекс Mdm2-p53** и осуществляется протеолиз p53. Этим объясняется низкая концентрация p53 в клетке в отсутствие стресса.

При повреждении ДНК происходит фосфорилирование **p53** **киназой АТМ** (активируется путем связывание **белка АТМ** с двуцепочечным разрывом ДНК) по остатку **Ser15** и **Ser37**. Данные остатки серина располагаются в той части белка p53, которая взаимодействует с белком Mdm2. Предполагается, что в фосфорилированной форме белок p53 не взаимодействует с белком Mdm2, что увеличивает период полураспада белка p53 и приводит к его **активации**. Активированный белок p53 является специфическим транскрипционным фактором. Гены, транскрипцию которых стимулирует белок p53, кодируют

белки-компоненты **апоптотической программы** и белки, которые регулируют клеточный цикл. Кроме того, активированный белок p53 формирует комплексы с неспецифическими транскрипционными факторами: **белком TBP** (англ. TATA-box binding protein), **белком CBF** (англ. CCAAT binding factor) и **белком SP-1**, что вызывает репрессию транскрипции. Также белок p53 индуцирует синтез продуктов **генов p21, p15 и p16**, которые **блокируют ферменты Cdk**, обеспечивающие смену периодов клеточного цикла.

Таким образом, **активация белка p53 приводит к остановке клеточного цикла** для репарации ДНК. При **тяжелых повреждениях**, не устранимых путем репарации ДНК, p53 запускает программу **апоптоза** (рис. 104).

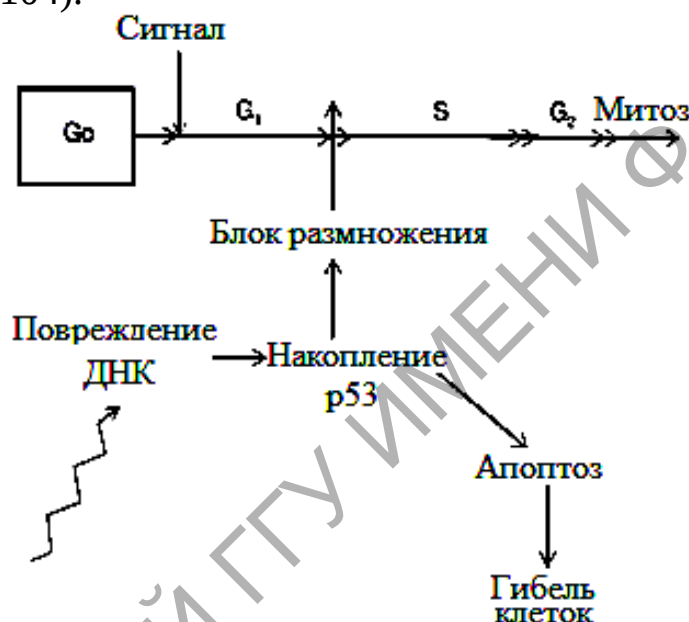


Рисунок 104. Схема фаз клеточного цикла и процессов, защищающих геном

Апоптоз

С увеличением количества дефектов ДНК и невозможностью их устранения нарастает концентрация активированного белка p53, что инициирует процесс апоптоза. Апоптотические программы реализуются белком p53 через несколько одновременно идущих процессов:

- 1) Непосредственная активация генов каспаз - специализированных ферментов, осуществляющих апоптоз;
- 2) Взаимодействие белка p53 с **инициатором апоптоза - белком Вах**;
- 3) **Активация p53-зависимого модулятора апоптоза PUMA** (p53 upregulated modulator of apoptosis), который блокирует действие ингибитора апоптоза **белка Bcl-2**.

Как правило, апоптоз реализуется по **митохондриальному пути** в результате выхода **набора апоптогенных белков** из межмембран-

ного пространства митохондрий в цитоплазму клетки. Белки-инициаторы апоптоза, прежде всего белок Вах, активированный белком р53, **встраиваются в наружную мембрану митохондрий и полимеризуется**. Это вызывает **повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий** (MOMP от Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). При повышении MOMP из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль высвобождаются белки, участвующие в апоптозе: **цитохром С; прокаспазы-2, -3 и -9**; «фактор, индуцирующий апоптоз» **белок AIF** (Apoptosis Inducing Factor). Цитохром С взаимодействует с «активирующим фактором апоптотической протеазы-1» **белком АРАФ-1** (Apoptosis Protease Activating Factor-1). Цитохром С и АРАФ-1 в комплексе участвуют в формировании **апоптосомы**. Апоптосома активирует **прокаспазу-9**. **Каспаза-9** связывает и активирует **прокаспазу-3** с образованием **эффекторной каспазы-3**. В результате запускается каспазный каскад, приводящий к деградации ключевых физиологических процессов и структур клетки.

Под действием каспаз гидролизу подвергаются белки ядерной оболочки, разрушается цитоскелет, расщепляются белки, регулирующие клеточную адгезию. В результате действия каспаз происходит распад регуляторных и эффекторных доменов ферментов, участвующих в **репарации ДНК, мРНК-сплайсинга и ДНК-репликации**. Каспазы вызывают **инактивацию белков, блокирующих апоптоз**, в частности **расщепляется «фактор фрагментации ДНК» ингибитор DFF** (DNA fragmentation factor), что приводит к **активации апоптозой ДНКазы CAD** (caspase-activated DNase) и расщеплению ДНК клетки.

Итогом программируемой клеточной гибели путем апоптоза является **деградация клетки с фрагментацией на отдельные апоптотические тельца**, ограниченные плазматической мембраной. **Фрагменты погибшей клетки** обычно очень быстро, в среднем за 90 минут, **фагоцитируются** макрофагами либо соседними клетками, **минуя развитие воспалительной реакции**.

Оба вида реакций защищают организм от репликации и передачи дочерним клеткам генетически поврежденного материала. Наряду с геном р53 выделяют и другие **антионкогены: RB** (ген ретинобластомы), **DCC, APC, WT1, NF1** и др.

Инактивация функции антионкогенов и развитие опухолей. Потеря функции гена р53 (в результате мутации или делеции) приводит к утрате контроля над клеточным циклом: клетки-мутанты продолжают активно пролиферировать, несмотря на повреждения ДНК. Выявлена четкая связь между утратой функции гена р53 и развитием бо-

более 50 видов злокачественных опухолей у человека. Так, изменения гена p53 обнаружены в 55-70% случаев рака легкого, в 25-30% – рака молочной железы. Опухоли с потерей функции гена p53 характеризуются наиболее злокачественным течением. В некоторых видах опухолей (в 60% меланом и лейкозов, в 80% глиом) обнаруживаются изменения гена p16; описаны опухоли, связанные с дефектами гена p15. Клетки рака шейки матки часто содержат инактивированные гены RB и p53. Мутация гена RB обнаруживается при ретинобластоме, опухолях костей, мочевого пузыря, легкого и молочной железы. Делеция гена DCC характерна для опухолей толстой и прямой кишки. Делеция гена APC – для аденоматозного полипоза толстой кишки.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРНИНЫ

ЛЕКЦИЯ 16. СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДНК

1. Характеристика метода ПЦР и его основные стадии.
2. Методы секвенирования фрагментов ДНК.
3. Электрофоретический метод анализа.
4. Построение рестрикционных карт ДНК.
5. Метод Саузерн-блот гибридизации.

1. Характеристика метода ПЦР и его основные стадии.

Несмотря на то, что методы исследования наследственного материала (нуклеиновых кислот) все время совершенствовались, тем не менее для анализа структуры ДНК требовалось определенное количество клеточного материала. Например, даже при использовании такого чувствительного метода, как **фингерпринт**, требуется наличие капли крови или другого эквивалентного количества образца животной или растительной ткани, содержащих в клетках достаточное для анализа количество копий ДНК.

Ситуация радикально изменилась благодаря появлению метода, который был разработан Кэри Мюллісом. Этот метод получил название **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** и стал неотъемлемой процедурой, освоенной во всех генно-инженерных лабораториях мира. Использование ПЦР методики позволяет **амплифицировать (размножить)** ДНК или её фрагмент *in vitro* увеличивая количество копий **в миллионы раз за несколько часов**. ПЦР осуществляют в пробирке с помощью специального термостабильного фермента ДНК-полимераза (**Таг-полимеразы**), набора всех четырех нуклеотидов А, Т, Г и Ц и коротких **олигонуклеотидных затравок** – праймеров. **Праймеры** – это короткие, длиной в **20-30 нуклеотидов**, одноцепочечные фрагменты ДНК, комплементарные **3'-концевым последовательностям** копируемой **ДНК-матрицы**. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопирован Таг-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к **3'-концам праймеров** и достраивающие их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рис. 105).

1. **Денатурация**. Инкубационную смесь, в которой содержится образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90 °С. При этом, в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы образуется две одноцепочечные.

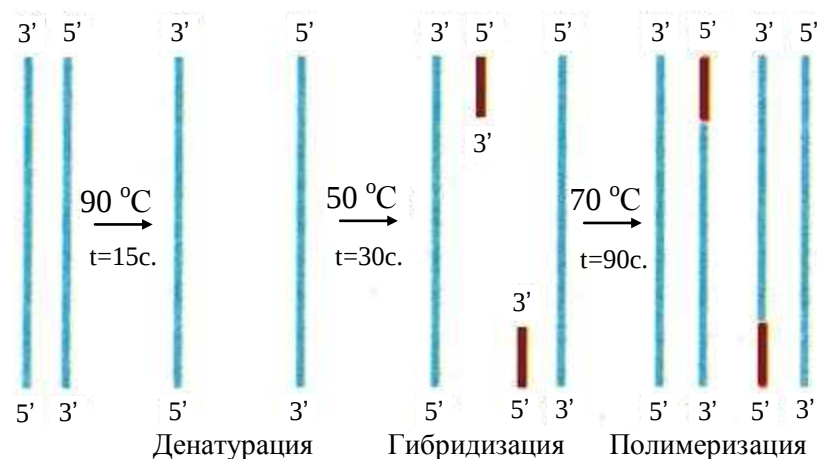


Рисунок 105. Последовательные стадии одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. **Гибридизация праймеров.** Температуру снижают до 50 °С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

3. **Полимеризация.** Инкубационную смесь нагревают до температуры 70°С. При этой температуре Tag-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате **количество ДНК удваивается**. Фермент Tag-полимераза была выделена из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Tag-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины 10^6 .

В последние годы удалось создать специальный прибор—амплификатор, с помощью которого все три стадии размножения ДНК производятся автоматически, что превратило процесс ПЦР-амплификации последовательности ДНК в простую задачу.

За разработку метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1993 г. Кэри Мюллис (K. Mullis) был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

ПЦР технологии позволили ученым без огромных временных и материальных затрат получать точные данные по структуре генов и фрагментов ДНК при наличии самого минимального количества биологического материала.

2. Методы секвенирования фрагментов ДНК.

В середине 70-х гг. XX в. были предложены два метода определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) неболь-

ших фрагментов ДНК. Первый прямой метод определения последовательности ДНК был предложен **Ф. Сэнгером** и **Д. Коулсоном** в **1975 г.** Этим способом была секвенирована короткая ДНК фага ϕ x174 (5,4 кб). Второй метод секвенирования ДНК был разработан **А. Максом** и **У. Гилбертом** в **1977 г.** С его помощью удалось установить последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб).

В основе **метода Сенгера** лежит ферментативное копирование с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I из *E.coli* (рис. 106).

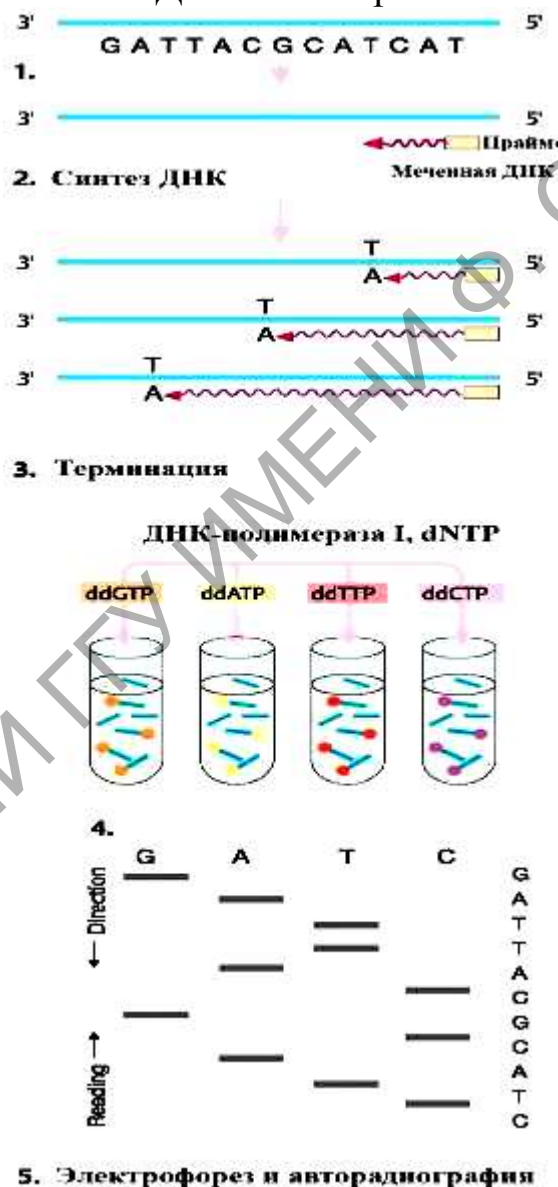


Рисунок 106. Этапы секвенирования по Сэнгеру.

В качестве праймеров используются синтетические олигонуклеотиды. Специфическую терминацию синтеза обеспечивают добавлением в реакционную смесь помимо четырех типов dNTP (один из которых радиоактивно мечен по α положению фосфата) еще и одного из 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или

ddGTP), способного включаться в растущую цепь ДНК, но не способного обеспечивать дальнейшее копирование из-за отсутствия 3'-ОН группы. Соотношение концентраций dNTP/ddNTP подбирается экспериментально так, чтобы в итоге получить набор копий ДНК различной длины. Таким образом, для определения первичной структуры исследуемого фрагмента ДНК требуется провести четыре реакции копирования: по одному типу терминаторов в каждой реакции. После этого полученные продукты разгоняются в полиакриламидном геле (ПААГ) на соседних дорожках и по расположению полос определяется последовательность нуклеотидов.

Метод Максама-Гилберта основан на химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца (рис. 107).

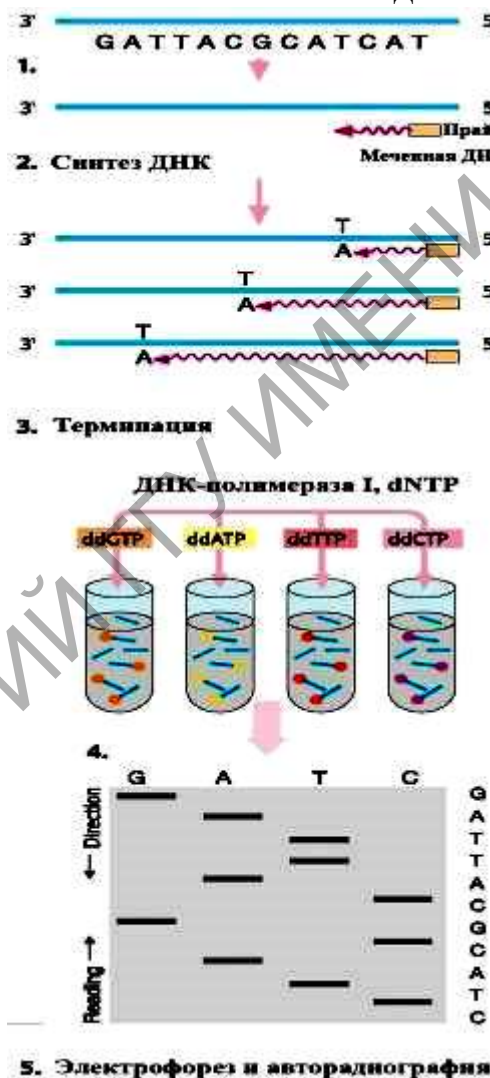


Рисунок 107. Этапы секвенирования по Максаму-Гилберту.

Препарат меченной ДНК разделяют на четыре части (или аликвоты) и каждую обрабатывают реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований.

А. Максам и У. Гилберт предложили модифицировать *пуриновые основания* (А, Г) диметилсульфатом. При этом происходит метилиро-

вание адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых – по азоту – в положении 7. Обработка образца ДНК соляной кислотой (0° С) приводит к выщеплению метиладенина. Последующая инкубация в щелочной среде (90 °С) вызывает разрыв сахарно-фосфатной цепи ДНК в местах выщепления оснований. Обработка пиперидином приводит к гидролизу образца по остаткам метилгуанина. *Пиримидиновые основания (Ц,Т) модифицируют* гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин; если обработку вести в присутствии NaCl, то модифицируется лишь цитозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осуществляется пиперидином. Условия подбирались таким образом, чтобы в итоге получить полный набор фрагментов разной длины.

Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

В 1986 году Лерой Худ с сотрудниками провел автоматизацию процесса секвенирования. Был усовершенствован метод Сэнгера и вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК стал использовать флуорисцентные красители разного цвета для четырех дидезоксинуклеотидов. Флуорисцентный анализ позволил все четыре смеси электрофорезировать вместе, что дало возможность определять последовательность ДНК автоматически и выводить результат на экран компьютера.

В основу автоматического секвенирования (рис. 108,109) заложен уже упоминавшийся метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP (*).

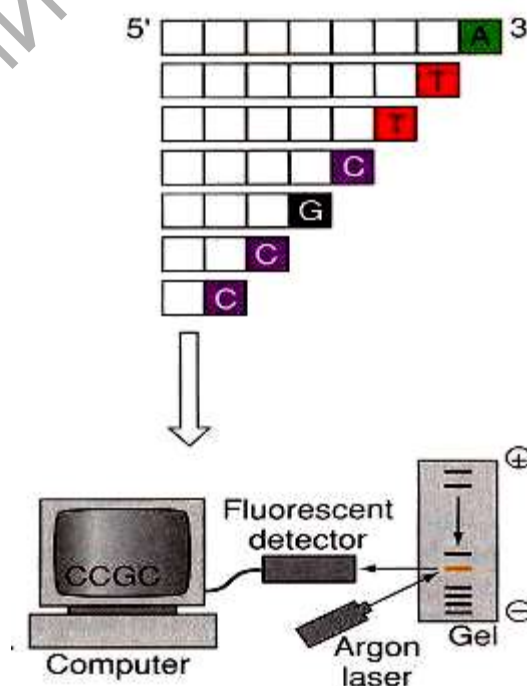


Рисунок 108. Автоматическое секвенирование.

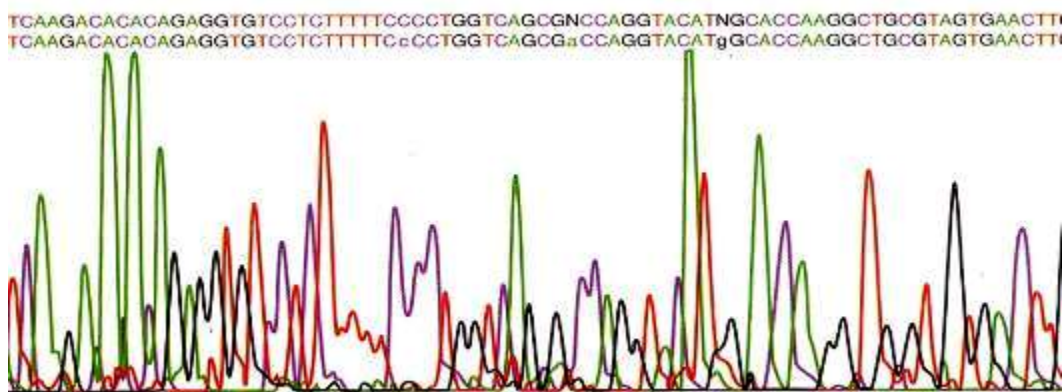


Рисунок 109. Отображение спектра, полученного в результате секвенирования

Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение их продуктов с помощью электрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченных фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующая обработка собранных данных.

Таким образом, автоматическое секвенирование отличается от ручного секвенирования только типом используемой метки.

Обычно флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции согласно следующим схемам: меченный праймер (четыре разных красителя) и немеченные терминаторы; меченный праймер (один краситель) и немеченные терминаторы; меченные терминаторы (каждый тип терминатора своим красителем) и немеченный праймер. Использование меченных праймеров предполагает проведение четырех независимых реакций (отдельно с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образца. Использование меченных терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется единственный краситель, то разделение продуктов секвенирования в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красок позволяет разгонять продукты реакции на одной дорожке.

3. Электрофоретический метод анализа.

В ходе манипуляций с различными фрагментами ДНК часто необходимо определить размер или выделить конкретный участок ДНК из смеси. Оказалось, что фрагменты ДНК легче всего разделять с помощью метода **электрофореза в агарозном геле**.

ДНК, обработанную одной или несколькими рестриктазами, помещают в лунки застывшего агарозного геля, который помещается в специальную камеру для электрофореза (рис. 110).

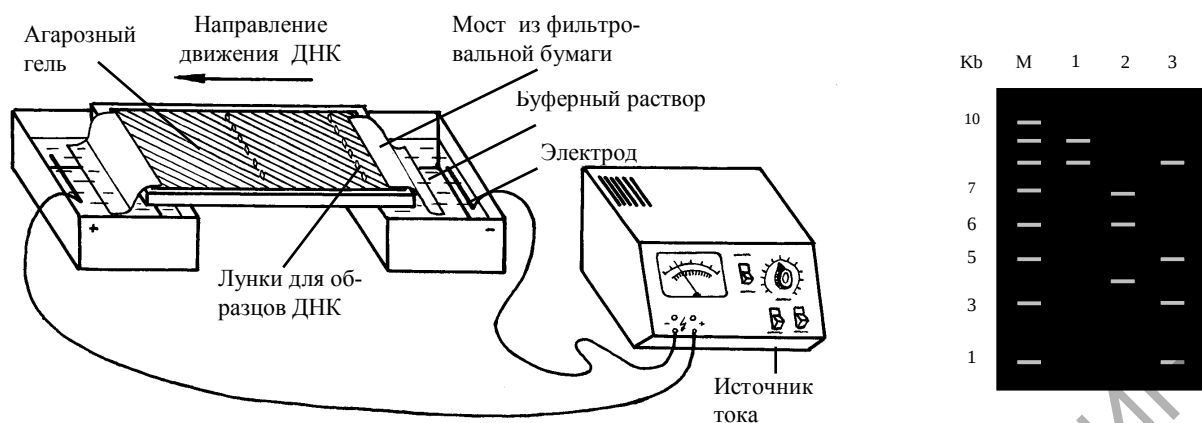


Рисунок 110. Схематическое изображение камеры для электрофореза ДНК в агарозном геле. Справа представлена электрофореграмма фрагментов ДНК, окрашенная этидиум бромидом и помещенная под УФ свет. (М – маркеры, 1,2,3 – образцы одной и той же ДНК, разрезанные различными рестриктазами).

В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают перемещаться в пористом, похожем на мармелад геле. **Скорость продвижения** фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные. Это позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно **выделить из геля** без всяких повреждений и потери биологических свойств.

Если после электрофореза окрасить гель специальным **красителем этидиум бромидом**, связывающимся с ДНК и поместить гель под ультрафиолетовый свет, то на нем будут хорошо видны окрашенные в красный цвет, расположенные на различном расстоянии друг от друга **светящиеся фракции ДНК**. Каждая фракция соответствует одному фрагменту ДНК. Следует подчеркнуть, что разные рестриктазы дают разную картину расщепления одной и той же ДНК (электрофореграмма на рис. 16 справа). Таким образом, электрофорез в агарозном геле позволяет разделить, а затем легко извлечь любые рестрикционные фрагменты ДНК в чистом виде для последующего использования.

4. Построение рестрикционных карт ДНК.

Анализируя электрофоретические **спектры ДНК на геле**, наблюдая за исчезновением одних и появлением других фракций под действием разных рестриктаз, исследователи начали составлять **генетические рестрикционные карты** расположения участков ДНК для разных видов. Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК вируса SV-40.

3 Метод Саузерн-блот гибридизации.

В 1975 году был разработан метод, который позволяет **иденти-**

фицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, **денатурируются до одноцепочечных** молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК **отпечатывается (blotting)** за счет капиллярных сил на приложенной к гелю **нитроцеллюлозной мембране (пленке)**, после чего фиксируется при помощи высокой температуры (рис. 111).

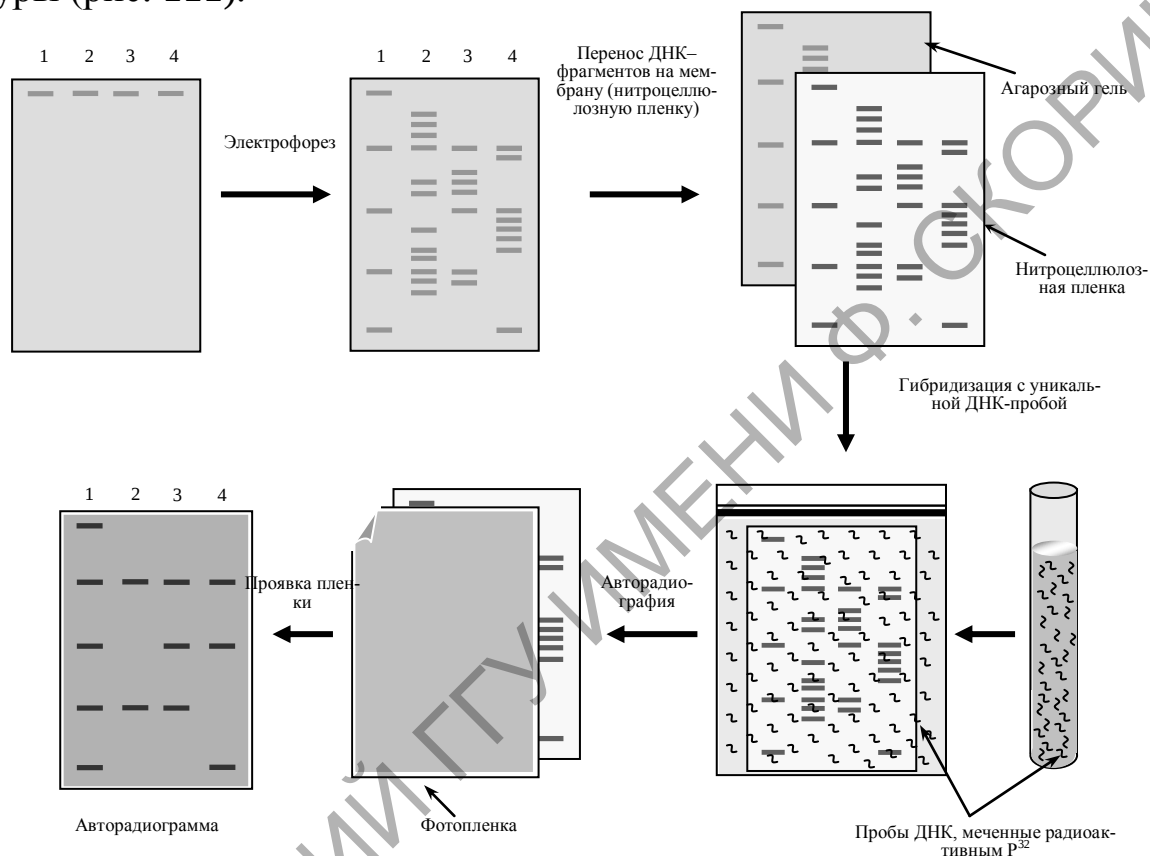


Рисунок 111. Схематическое изображение основных этапов Саузерн-блот гибрилизации.

Далее мембрана помещается в гибрилизационный буфер, содержащий **специальный радиоактивно меченый ДНКовый зонд** – короткую специфическую последовательность ДНК. Зонд способен гибридоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая **фракции, гибризовавшиеся с радиоактивно меченым зондом**, прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (**автораддиограмме**) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Это метод получил название

Саузерн-блот гибридизации в честь разработавшего его Эдварда Саузерна.

К настоящему времени удалось практически полностью расшифровать (прочитать) абсолютное большинство генов даже у таких сложных видов, как человек и дрозофила. Для этих и многих других видов получено огромное количество различных **ДНКовых зондов (проб)**, которые успешно используются в **Саузерн-блот анализе**.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

ЛЕКЦИЯ 17. ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМОВ ПРО- И ЭУКАРИОТ. ГЕНОМИКА

- 1 Определение нуклеотидных последовательностей в геномах
- 2 Аннотация расшифрованной последовательности.
- 3 Характеристика геномов прокариот.
- 4 Характеристика геномов эукариот.
- 5 Минимальный геном необходимый для жизни.

С начала 20 века основные силы генетиков были сосредоточены на идентификации и картировании генов различных организмов. Для этого проводили поиск спонтанных мутаций или мутаций, возникших в результате физических или химических воздействий. Однако процесс получения мутаций довольно долгий и трудоемкий. Кроме того, возникшие мутации часто приводят к гибели организма, и это делает невозможным картирование мутантного гена.

В последние десятилетия генетика сделала мощный рывок, перейдя от классических подходов мутагенеза и картирования к методам рекомбинантных ДНК. Для этого были созданы коллекции генных клонов – **геномные библиотеки**. Анализируя перекрывающиеся области последовательностей ДНК из различных клонов, генетики начали определять последовательность всех генов в геномах некоторых видов. Это направление получило название **геномики**.

Анализ геномов представляет собой крупномасштабное исследование, требующее координированной работы многих лабораторий. Самый большой и широкоизвестный проект «Геном человека» (The Human Genome Project) был инициирован в 1988 году Национальным Институтом Здоровья, США. В ходе запланированных работ проанализированы геномы человека (*H. sapiens*), бактерий (*E. coli*), дрожжей (*S. cerevisiae*), круглых червей (*S. elegans*), плодовой мушки (*D. melanogaster*) и мыши (*M. musculus*).

1 Определение нуклеотидных последовательностей в геномах.

Первым разработанным методом определения нуклеотидных последовательностей в генах, составляющих геном был **метод «клон за клоном»**. На первом этапе создаются геномные (хромосомные) библиотеки фрагментов, которые покрывают всю геномную ДНК организма (геномные клоны). Извлеченные из библиотек клоны анализируют, чтобы создать **генетические и физические карты** на основе наследования генетических маркеров (RFLPs, STSs) в гетерозиготных семьях. После этого в клонах ищут перекрывающиеся друг с другом последовательности. Таким образом, перекрывают всю хромосому.

На последнем этапе определяют нуклеотидную последовательность каждого клона, и, связывая их вместе, составляют последовательность ДНК всей хромосомы (генома). Основные этапы определения нуклеотидных последовательностей генома методом «клон за клоном» представлены на рисунке 112.

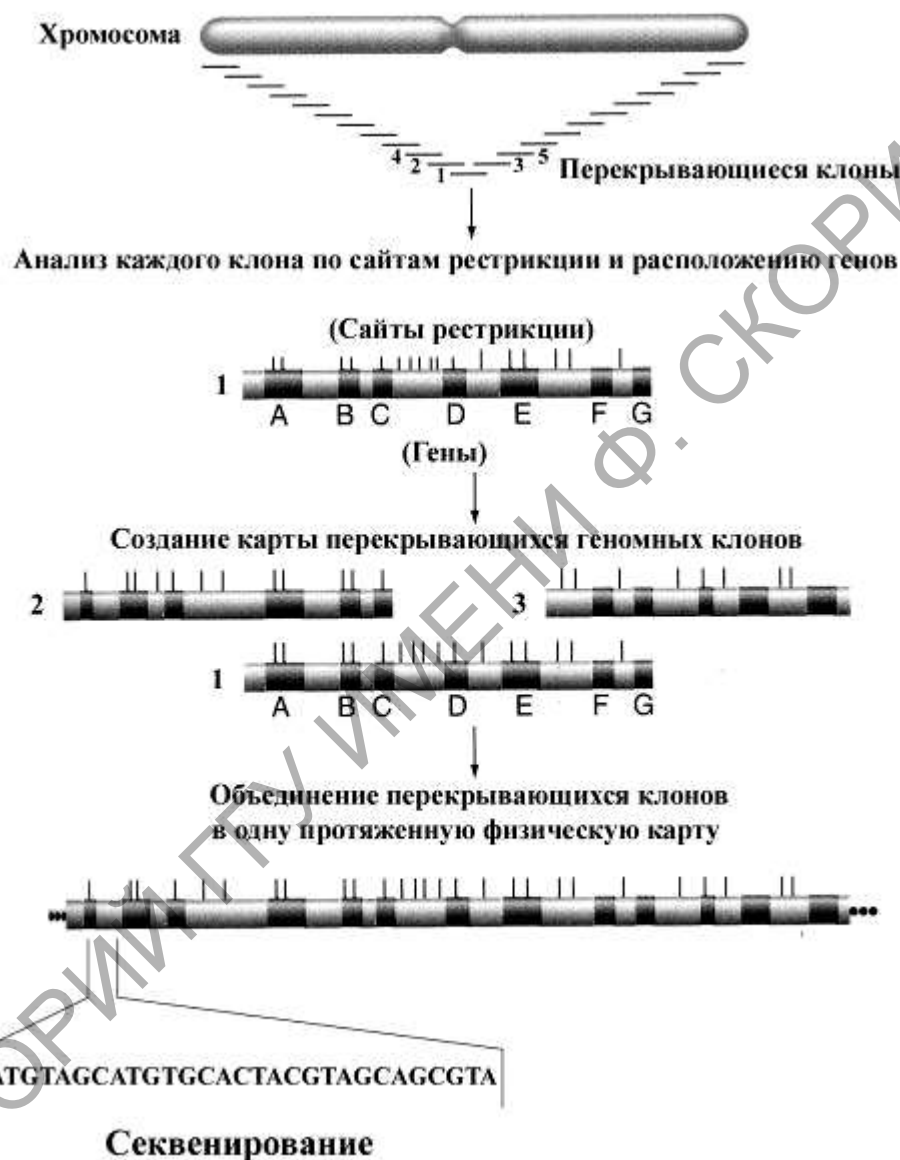


Рисунок 112. Этапы анализа перекрывающихся клонов, создание протяженной физической карты молекулярных маркеров по длине хромосомы и последующее секвенирование клонов для составления последовательности ДНК всей хромосомы.

При использовании второго метода, названного методом дробовика или «шот-ган» (shotgun) клоны из геномных библиотек отбираются случайным образом. В отобранных клонах проводят определение последовательности нуклеотидов на основе секвенирования ДНК фрагментов с обоих концов. Аналогичным образом поступают до тех пор, пока все клоны библиотеки не будут проанализированы. Специально разработанные компьютерные программы позволяют проанализировать перекрывающиеся ДНК-последовательности клонов и связать их

вместе. Таким образом, удастся получить информацию о последовательности генома (хромосомы) в целом. Этот метод, разработанный К. Вентором в Институте исследования генома, был использован для определения последовательности генома *Haemophilus influenzae* в 1995 г. После усовершенствования метода Вентор организовал компанию Celera, чтобы определять последовательности геномов эукариот, включая человека.

Следует подчеркнуть, что для исключения ошибок в нуклеотидной последовательности, составляющей геном, работы по секвенированию ДНК проводятся многократно. Так применяя метод дробовика при исследовании генома бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ($6,3 \times 10^6$ н.п.) ученые определяли последовательность нуклеотидов 7 раз. Но даже после этого в результате компьютерной обработки данных было выявлено 1604 участка ДНК, для которых были нужны дополнительные исследования. На заключительном этапе полученные методом «шот-ган» данные по двум участкам генома длиной 82 тыс. н.п. сравнили с данными, полученными стандартным методом и результаты полностью совпали.

В частном проекте компании Celera Genomics для определения последовательности **ДНК человека** ($3,2 \times 10^9$ н.п.), используя метод дробовика, последовательность генома была перекрыта 35 раз. И хотя в черновом варианте **расшифровка генома человека** завершена, необходимо еще провести коррекцию ошибок, заполнение пробелов размером 150 Mb, а также расшифровку 15% генома **гетерохроматических районов**.

2 Аннотация расшифрованной последовательности.

После определения нуклеотидной последовательности встает следующая задача по ее аннотации, которая заключается в идентификации всех генов и кодируемых белков, мобильных элементов и семейств повторов, которые могут присутствовать в геноме.

Гены, кодирующие белки, обнаруживаются при анализе нуклеотидной последовательности самим исследователем или при помощи компьютерных программ. Гены, кодирующие белки, содержат так называемую **открытую рамку считывания**, которая начинается с **инициирующего кодона** АТГ и заканчивается одним из трех **терминирующих кодонов** - ТАА, ТАГ или ТГА. Сканирование последовательности ДНК для обнаружения открытой рамки считывания, ограниченной АТГ с одной стороны и стоп-кодоном с другой, является одной из стратегий поиска генов. Однако этот метод высоко эффективен только для аннотации бактериальных геномов. В случае же геномов эукариот продуктивность метода резко снижается, поскольку

большинство эукариотических генов состоят из **экзонов** (кодирующих участков гена) и **интронов** (некодирующих участков гена), и программа часто интерпретирует экзоны, как отдельные гены, т. к. стоп-кодона часто встречаются в интронах.

Следует отметить, что последние версии программ настроены на поиск специфических черт открытых рамок: интрон-экзонных сочленений, 3'полиА-сигналов и **преимущественных кодонов**. Например, аланин может кодироваться четырьмя кодонами, но в геноме человека кодон ГЦЦ встречается в 41% аланиновых кодонов, а ГЦГ только в 11%. Наиболее часто встречающиеся кодоны присутствуют в экзонах, но не встречаются в интронах и пространствах между генами.

После обнаружения предполагаемых открытых рамок считывания для определения гена проводят поиск гомологичных последовательностей среди расшифрованных генов других организмов в базах данных (например, в Genbank).

3 Характеристика геномов прокариот.

На сегодняшний день завершена расшифровка последовательностей нескольких десятков геномов прокариот и эукариот. Поскольку прокариоты имеют маленький геном, подходящий для клонирования генов методом дробовика, то для более **50 видов геномы уже расшифрованы** и анализ более 200 находится в стадии завершения. Размеры геномов и количество генов у некоторых прокариот приведены ниже в таблице 8.

Таблица 8. Размер генома и количество генов у некоторых прокариот.

Виды	Размеры генома (Mb)	Количество генов
<i>Escherichia coli</i>	4,64	4397
<i>Bacillus subtilis</i>	4,21	4212
<i>Haemophilus influenza</i>	1,83	1791
<i>Rickettsia provaseki</i>	1,11	834
<i>Micoplasma pneumoniae</i>	0,82	710
<i>Micoplasma genitalum</i>	0,58	503

На основе полученных результатов установлено, что размеры геномов простейших относительно малы (в основном менее 5 мегабаз), но широко варьируют от больших геномов бактерий (30 мегабаз у *Bacillus megaterum*) до маленьких геномов эукариот (12 мегабаз у дрожжей). Большинство исследованных геномов прокариот организованы в **кольцевые молекулы ДНК**. Однако, *Borrelia burdoferi* – возбудитель болезни Лайма у человека и некоторые виды *Streptomyces* имеют геномы в виде линейной ДНК.

Еще одной характерной чертой геномов бактерий оказалась очень

высокая плотность генов, которая составила в среднем 1 на 1000 пар оснований (табл. 8). Причем, такая плотность присуща и *E. coli* с относительно большим геномом 4,6 мегабаз (4397 генов) и *M. genitalum* с самым маленьким геномом 0,6 мегабаз (503 гена). Плотно расположенные гены у бактерий обуславливают высокую пропорцию ДНК, кодирующую белки (85-90 %). Интересно, что **только 1%** бактериальной ДНК является **некодирующей** и чаще всего она представлена в форме **транспозонов** – элементов, которые могут перемещаться по геному. **Интроны** в бактериальных геномах **практически отсутствуют**. Необходимо подчеркнуть важное свойство бактериальных геномов, связанное с тем, что большая часть генов у них локализуется совместно и являются **полицистронными транскрипционными единицами**, имеющими **общий промотор и регулятор**. Такая структура регуляции была открыта в ходе исследования метаболизма лактозы у *E. coli* еще в начале 60-х и получила название **оперона**. Упрощенная схема **лактозного оперона**, его структурных и регуляторных генов представлена на рисунке 113.

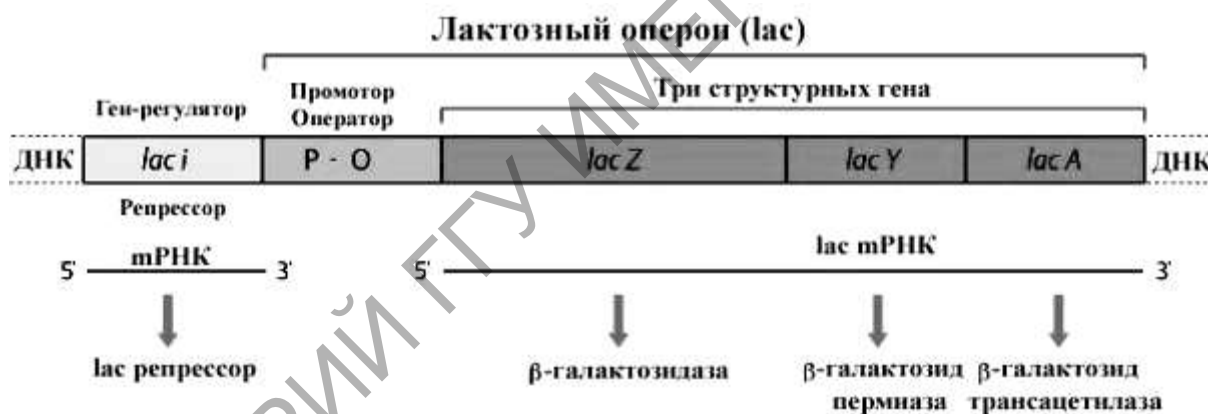


Рисунок 113. Упрощенная схема lac-оперона – структурных и регуляторных генов, контролирующих метаболизм лактозы у *Escherichia coli*. Структурные гены lac-Z, lac-Y, lac-A транскрибируются в одну полицистронную м-РНК, с которой одновременно транслируется сразу три фермента (β-галактозидаза, пермиаза и трансацетилаза).

В настоящее время установлено, что в геноме *E. coli* около 600 транскрипционных единиц являются оперонами.

4 Характеристика геномов эукариот.

Эукариоты по сравнению с прокариотами имеют **низкую плотность генов**. Причем, более сложные эукариоты имеют менее компактные геномы и меньший уровень плотности генов (табл. 9). Если сравнить участки длиной 50 килобаз хромосомы 3 дрожжей и хромосомы 7 человека, то можно выявить несколько различий.

Таблица 9. Размер генома и количество генов у некоторых эукариот.

Виды	Размеры генома (Mb)	Количество генов
<i>S. cerevisiae</i> (дрожжи)	12	6548
<i>P. falciparum</i> (плазмодий)	30	ок 6500
<i>C. elegans</i> (нематода)	97	> 20000
<i>A. thaliana</i> (арабидонсис)	120	20000
<i>D. melanogaster</i> (дрозофила)	170	ок 16000
<i>O. sativa</i> (рис)	415	ок 20000
<i>Z. mays</i> (кукуруза)	2500	ок 20000
<i>H. sapiens</i> (человек)	3200	ок 35000
<i>H. vulgare</i> (ячмень)	5300	ок 20000

Во-первых, у дрожжей на таком участке расположено 20 генов, а у человека только - 6. Кроме того, ни один из генов дрожжей не содержит **интронов**, тогда как почти все гены человека их содержат. В некоторых генах имеется **более 100 интронов**. Ниже в качестве примера представлена схема β -глобинового гена, содержащего 2 интрона (рис. 114). Во-вторых, большой размер геномов эукариот обусловлен наличием так называемых **ДНК-повторов**. Например, у кукурузы более 80% суммарной ДНК представляет собой ДНК-повторы, что и обуславливает очень низкую плотность генов в геноме этого растения.

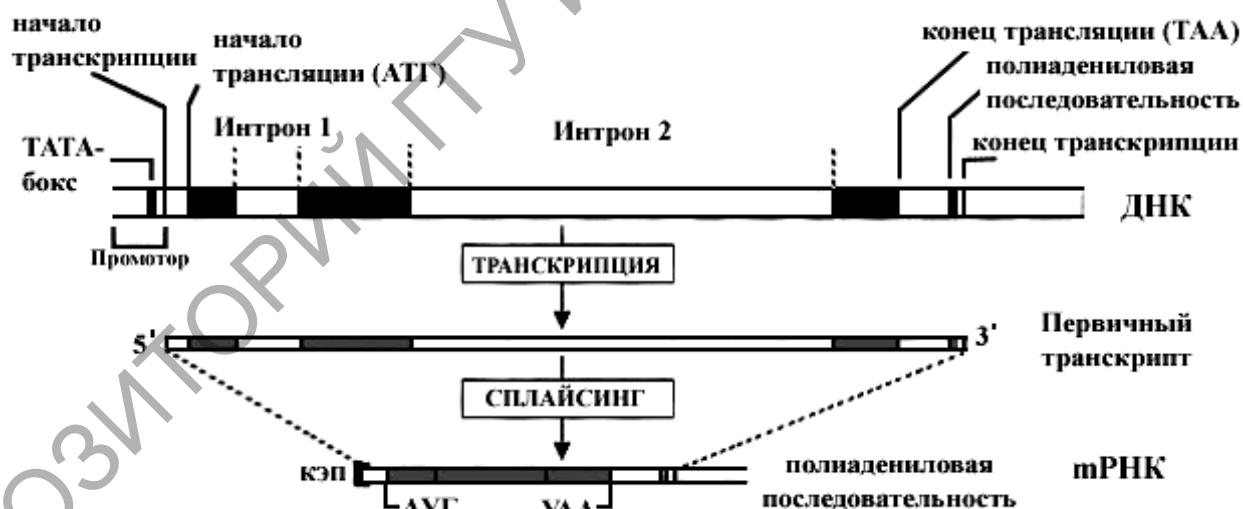


Рисунок 114. Упрощенная схема β -глобинового гена человека и матричной мРНК после процесса транскрипции и сплайсинга. Этот ген состоит из более чем 2 тыс. н.п. Однако из них только около 450 н.п. несут информацию об аминокислотной последовательности β -глобина. Кроме трех кодирующих участков (экзонов), ген включает два некодирующих (интроны 1 и 2). В левой части гена располагается промотор (200 н.п.), к которому присоединяется РНК-полимераза II осуществляющая процесс транскрипции. Образующийся первичный транскрипт РНК состоит из ~1600 н.п. Во время сплайсинга РНК интроны, удаляются и оба конца РНК модифицируются.

Хотя не вся нуклеотидная последовательность генома человека расшифрована, очевидно, что наши гены являются типичными эука-

риотическими. Суммарная ДНК составляет более 3 000 мегабаз длиной и распределена по 24 хромосомам, размеры которых варьируют от 55 до 250 мегабаз. Хромосома 19 имеет наибольшую плотность генов, а хромосома 13 и Y - наименьшую. Сначала предполагалось, что человеческий геном содержит от 80000 до 100000 генов. Однако, в результате проведенных исследований в рамках проекта «Геном человека» стало ясно, что число генов вряд ли превысит 35000 – 40000.

Геном человека по размеру больше чем геном дрозофилы (см. табл. 9) и содержит больше интронов. Средний размер генов у человека вместе с интронами составляет 27 килобаз. Самый большой ген у человека кодирует белок дистрофин (рис. 115.). Этот ген составляет

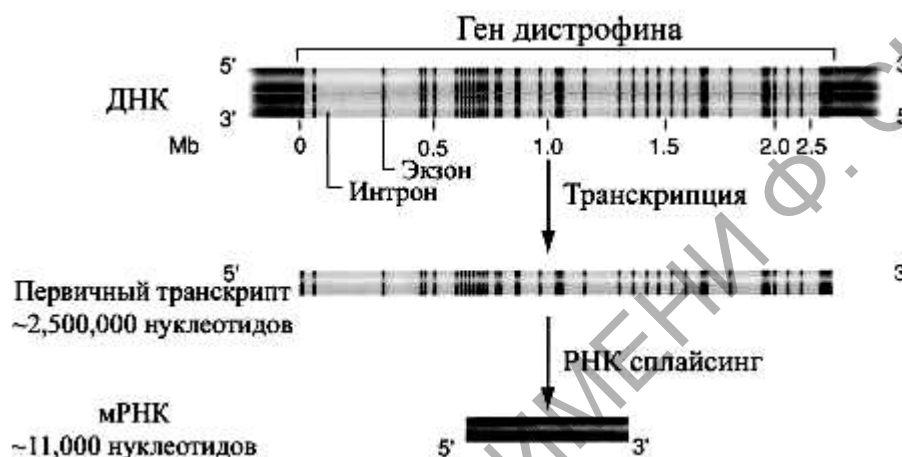


Рисунок 115. РНК сплайсинг на примере человеческого гена дистрофина. Несмотря на то, что размер гена составляет 2500 килобаз, после процесса сплайсинга размер мРНК изменяется до 14 килобаз, так как более чем 80 интронов удаляются из первичного транскрипта.

2,5 мегабазы и превосходит геномы многих бактерий. Единицы транскрипции в **гене дистрофина** разделены интронами. Мутации в этом гене вызывают развитие мышечной дистрофии. В ряде генов человека обнаружено 30, 40 и даже 50 интронов. В целом доля ДНК, кодирующая белки в геноме человека составляет только 5%. По крайней мере 50% генома приходится на транспозон подобные области ДНК представленные семейством Alu и L1-повторов.

5 Минимальный геном необходимый для жизни.

Какое минимальное количество генов необходимо для того, чтобы организм был жизнеспособным? Абсолютно точно на этот вопрос ответить пока нельзя, так как еще не все функции генов, обнаруженных в геномах, известны. Тем не менее, основываясь на информации, полученной для генов с известной функцией, можно предположить, какое минимальное число генов необходимо для выполнения основных клеточных функций.

Очевидно, что клетки должны содержать гены, кодирующие про-

дукты, необходимые для репликации и репарации ДНК, для транскрипции и трансляции, транспорта белков и выполнения общих клеточных процессов, включая деление клеток и секрецию, а также для множества биохимических реакций, вовлеченных в клеточный метаболизм. В таблице 6 приведена итоговая информация о функциях генов трех видов бактерий.

Если сравнить число необходимых для жизнедеятельности генов у различных бактерий, то видно, что *E. coli* имеет 131 ген для метаболизма аминокислот, *H. influenza* – 68, а *M. genitalum* – только 1. Несмотря на то, что общее количество генов у *H. influenza* почти в 4 раза больше, чем у *M. genitalum*, физиологические способности у этих ви-

Таблица 10. Функциональные классы генов в трех видах бактерий.

Функциональный класс	<i>E. coli</i>	<i>H. influenza</i>	<i>M. genitalum</i>
Гены, кодирующие белки	4288	1727	470
Репликация и репарация ДНК	115	87	32
Транскрипция	55	27	12
Трансляция	182	141	101
Регуляторные белки	178	64	7
Биосинтез аминокислот	131	68	1
Биосинтез нуклеиновых кислот	58	53	19
Обмен липидов	48	25	6
Энергетический обмен	243	112	31
Распознавание, транспорт белков	427	343	123

дов очень сходны. Большая часть генов *H. influenza* входит в категорию необходимых для биосинтеза. Эта более сложная бактерия имеет 68 генов, необходимых для биосинтеза аминокислот, в то время как микоплазма – только 1 такой ген. Обладая очень низкой способностью к биосинтезу аминокислот, микоплазмы должны использовать ряд метаболитических продуктов клеток хозяина. В целом результаты проведенного сравнительного анализа двух микоплазм - *M. genitalum* и *M. pneumoniae* и некоторые эксперименты по мутагенезу у *M. genitalum* указывают на то, что необходимых для жизнедеятельности организма генов должно быть **не менее 250-350**.

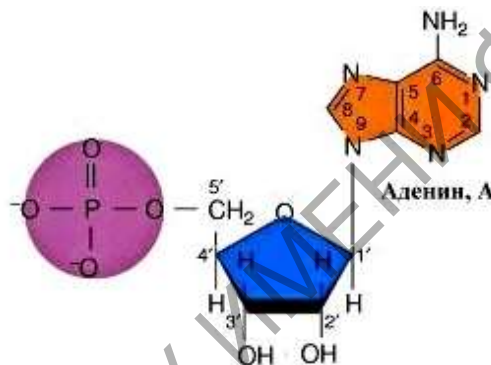
1.2 ГЛОССАРИЙ

А

Авторадиограмма — фотографический отпечаток, фиксирующий расположение фракций ДНК, полученных в результате электрофореза и гибридизовавшихся с радиоактивно меченым зондом. Получают путем наложения чувствительной к радиоактивному излучению фотопленки на нитроцеллюлозную мембрану, полученную после Саузерн-блот гибридизации (см.).

Аденин, А (adenine, А, гр. *aden* – железа и лат. *-in(e)* – суффикс, обозначающий «подобный») – пуриновое азотистое основание, 6-аминопурин. А. содержится во всех живых клетках в составе нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), аденозинфосфорных кислот, циклического АМФ, коферментов (НАД, НАДФ) и др. В ДНК аденин комплементарен тимину (см.) и образует с ним две водородные связи.

Аденозин 5'-монофосфат (АМФ) – нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пуринового азотистого основания аденина.



Аденозинтрифосфат (АТФ) – рибонуклеозид-5-трифосфат, участвующий в энергетическом цикле клетки в качестве донора фосфатной группы.

Alu-семейство – семейство умеренно повторяющихся последовательностей ДНК, известное у многих млекопитающих и у некоторых других организмов; размер *Alu*-повтора около 300 п. н., а в каждом таком повторе расположен сайт узнавания для рестриктазы *AluI*.

Альтернативный сплайсинг иРНК – вариант сплайсинга, при котором происходит соединение экзонов гена в разных комбинациях, и, следовательно, образование различных зрелых молекул иРНК.

Аминоацил-тРНК-синтетаза (кодаза) – фермент, который катализирует присоединение аминокислоты к соответствующей ей молекуле тРНК. Существует 20 типов аминоацил-тРНК-синтетаз (по числу аминокислот). У каждой тРНК-синтетазы 3 центра связывания: для аминокислоты, тРНК и АТФ. Сначала осуществляется связь аминоацил-тРНК-синтетазы с определенной аминокислотой, а затем активированная с помощью АТФ аминокислота присоединяется к аденину акцепторного триплета ЦЦА тРНК.

Аминокислота – органическое соединение, содержащее аминогруппу ($-\text{NH}_2$) и карбоксильную группу ($-\text{COOH}$). Известно 20 основных аминокислот входящих в состав белков. Общая формула для аминокислоты: $\text{NH}_2\text{-CR-COOH}$, где R – это радикал, специфичный для каждой отдельной аминокислоты.

Амплификация (amplification) — процесс увеличения (размножения) количества нитей ДНК, числа копий гена (см. Амплификация генов).

Амплификация генов (*gene amplification*) — 1. Увеличение числа копий к.-л. гена в данной клетке или в пробирке методом ПЦР — полимеразной цепной реакции (см.). 2. Любой процесс, при котором специфическая последовательность ДНК увеличивается непропорционально родительским клеткам. В течение развития некоторые гены амплифицируются в специализированных тканях, напр., рибосомные гены амплифицируются и активно функционируют в течение оогенеза, особенно в ооцитах некоторых амфибий. Гены у дрозофилы, кодирующие белки хорионов, также амплифицируются в оволирующих фолликулярных клетках.

Амплификатор, термоциклер (*amplificator or thermocycler*) — прибор, обеспечивающий по программе быстрое нагревание и охлаждение малых объемов реакционной смеси. А. используется для осуществления ПЦР — полимеразной цепной реакции (см.). Он позволяет проводить тепловую денатурацию ДНК (ок. 90-94°C), отжиг праймера (при 50°C) и удлинение праймера (синтез цепи ДНК при 70-72°C).

Антикодон — группа из трёх оснований, занимающая фиксированное положение в транспортной РНК (см. Транспортная РНК), которая комплементарна кодону (см.) в информационной (матричной) РНК (см. Информационная (матричная) РНК).

Антионкогены (гены-супрессоры опухолевого роста) — гены, активность которых препятствует развитию опухолей. По своему функциональному назначению антионкогены являются антагонистами онкогенов. Хорошо изученным антионкогеном является ген Rb, (кодирует белок pRb, подавляющий клеточные деления в нормальных клетках). Мутация гена Rb приводит к образованию ретинобластомы и некоторых других опухолей (остеосаркомы, карциномы лёгких, мочевого пузыря и др.).

Апоптоз — процесс программированной гибели клетки, которая происходит при нормальном развитии, функционировании и обновлении тканей. Отличается от некроза, при котором гибель клетки обусловлена действием внешних факторов (стресс или токсины).

Аутосплайсинг — сплайсинг предшественников мРНК, происходящий без участия каких-либо др. макромолекул (ферментов), т.е. мРНК сама является катализатором этого процесса (рибозимом); явление А. открыто Т. Цехом с соавт. в 1981 при анализ процессинга рибосомной 26S-рРНК у инфузории *Tetrahymena thermophila*.

Б

Банк генов (*gene bank*) — набор генов данного организма, полученный на основе рекомбинантных ДНК (см. Геномная библиотека, Библиотека генов).

Белки «цинковые пальцы» — одна из основных групп ДНК-связывающих белков: являются регуляторами транскрипции, содержат характерный домен, который включает 2 цистеиновых и 1 гистидиновый остаток: — эти аминокислоты взаимодействуют с ионом цинка, а расположенная между ними полипептидная цепочка выпетливается в виде «пальца»; обширная группа Б.«Ц.П.» кодируется широко диспергированными по геному генами группы Zfp (например, у мыши известны на хромосомах X, Y, 11 и 8); один из наиболее известных Б.«Ц.П.» кодируется геном Крюппеля.

Библиотека генов (*gene library*) — коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК организма (см. Геномная библиотека, Банк генов) или специальный набор фрагментов ДНК, представляющих, напр., коллекцию иРНК (см. РНК информационная, кДНК), экспрессирующуюся в клетке в определенное время. В таких библиотеках фрагменты инсерцируются (вставляются) в подходящие вектора, напр, космидные или бактериальные векторы, и трансформируются в подходящего хозяина. В идеале геномная библиотека должна содержать практически весь геном

вида, из которого она происходит, а библиотека кДНК — все различные молекулы иРНК данной клетки на одной и той же стадии развития.

Биополимеры — высокомолекулярные органические соединения, входящие в состав живых организмов (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты).

Блоттинг (blotting – промакание) — этап процесса Саузерн-блот гибридизации, в результате которого весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры.

Бокс Хогнесса, ТАТА-бокс — специфическая последовательность нуклеотидов, присутствующая в промоторных областях генов эукариот; обобщенная структура Б.Х. – ТАТА(АТ)А(АТ); выполняет регуляторную функцию — участвует в инициации транскрипции, обеспечивая ориентацию РНК-полимеразы относительно промотора, функционально эквивалентен боксу Прибнова у прокариот.

Бокс Прибнова — нуклеотидная последовательность у прокариот, расположенная за 10 нуклеотидов от точки инициации транскрипции и обычно состоящая из 6 (иногда до 9) оснований, каноническая последовательность Б.П. — ТАТААТ; предполагается, что на участке Б.П. происходит расплетание цепей ДНК в момент инициации транскрипции, также Б.П. необходим для правильного ориентирования РНК-полимеразы на промоторе; аналогом Б.П. у эукариот является бокс Хогнесса, выполняющий те же функции.

В

Величина генома (genome size) — количество пар оснований (п.о.) ДНК в расчете на гаплоидный геном; иногда (что неверно) понятие В.г. используется для обозначения весового содержания ДНК (в пикограммах на клетку). По последним данным В.г. составляет: у бактерий— $2 \cdot 10^6$ п.о., нематод— $1 \cdot 10^8$ п.о., насекомых— $2,3 \cdot 10^9$ п.о., моллюсков— $1,6 \cdot 10^9$ п.о., рыб— $1,4 \cdot 10^9$ п.о., птиц— $1,2 \cdot 10^9$ п.о., млекопитающих— $2,6 \cdot 10^9$ п.о., человека— $3 \cdot 10^9$ п.о., голосеменных— $1,6 \cdot 10^{10}$ п.о.

Вирусы — формы внеклеточной жизни, которые состоят из ДНК (ДНК-вирусы: аденовирусы, бакуловирусы, геминивирусы и др.) или РНК (РНК-вирусы: бромовирусы, ретровирусы и др.) и белковой оболочки. В. не содержат клеточных органелл и используют для репликации метаболизм клетки хозяина. Клетка хозяина может быть разрушена в процессе репликации, и В. освобождается из клетки. В., патогенные для бактерий называют бактериофагами (см.).

Вторичный мессенджер (вторичный посредник) — химическое соединение внутри клетки, вовлеченное в инициацию ответа на сигнал от химического носителя (например, гормона), который не может проникнуть в клетку-мишень.

Вырожденность кода - свойство генетического кода, заключающееся в том, что 18 из 20 аминокислот кодируются несколькими кодонами. Одним кодоном кодируются только аминокислоты метионин и триптофан.

Высокоповторяющаяся ДНК — нуклеотидные последовательности, содержащиеся в геноме в сотнях тысяч или миллионах повторов и первыми реассоциирующиеся во время ренатурации тотальной ДНК; как правило, единица («мономер») В.ДНК состоит из небольшого числа нуклеотидов (например, на половых хромосомах известны многомиллионные повторы тетра nukлеотидов ГАТА и ГАЦА), входят в состав гетерохроматина и сателлитной ДНК.

Г

Г белки – белки, локализованные на внутренней поверхности плазматической мембраны, которые соединены с гуанозин три- и дифосфатами (ГТФ и ГДФ). Передают сигналы с внешней стороны мембраны через трансмембранные рецепторы (G-белок сопряженный рецептор) к аденилатциклазе, которая катализирует формирование внутри клетки вторичного переносчика - циклической АМФ.

Гель — желеобразный матрикс, состоящий из полимерного компонента и буферного раствора, используется для разделения в процессе электрофореза макромолекул ДНК и РНК (агарозный Г., полиакриламидный Г.) или белков (полиакриламидный или крахмальный, Г.).

Ген — основная физическая и функциональная единица наследственности, несущая информацию от одного поколения к другому. Г. представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК, а у некоторых вирусов — в РНК, детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК (тДНК), или рибосомных РНК (рДНК), или последовательность аминокислот в белках. Как правило, Г. состоят из кодирующих (экзоны) и не кодирующих (интроны) последовательностей. Интронные последовательности чаще всего встречаются у эукариот. Любая Г., занимает строго определенное место, или локус, в хромосоме и может мутировать в различные аллельные состояния, а также рекомбинировать с гомологичными генами. Действие Г. проявляется в фенотипе. По выполняемым функциям Г. подразделяют на 3 класса: а) структурные Г., которые транскрибируются (см. Транскрипция) на ДНК, а затем транслируются на рибосомах (см. Трансляция) в полипептидные цепочки; б) структурные Г., которые транскрибируются в рРНК или тРНК и сами непосредственно используются; в) регуляторные Г., которые не транскрибируются, но служат сайтами узнавания (см.) для ферментов и др. белков при репликации и транскрипции ДНК. Термин введен В. Иогансеном в 1909 г. и нередко заменяется понятиями "наследственный фактор".

Ген-регулятор (*regulator gene*) — ген, кодирующий белок-репрессор, взаимодействующий с геном-оператором и таким образом регулирующий транскрипцию "своего" оперона.

Генетическая дактилоскопия и идентификация индивидуумов — точная идентификация индивидуумов животных и растений на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. Генная дактилоскопия, ДНК-фингерпринтинг, Фингерпринт ДНК, Секвенирование ДНК, ПЦР-технологии).

Генетические карты — карты линейного расположения генов на хромосоме (группы сцепления), выявленные в экспериментах по генетическим рекомбинациям, а также распределение генов по разным хромосомам, как правило, с указанием генетического расстояния между ними.

Генетический код – система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот (см.), основанная на определенном чередовании последовательностей нуклеотидов в ДНК или РНК, образующих кодоны (см.) для соответствующих аминокислот в белках. Г. к. триплетен (см. Триплет) – 3 нуклеотида кодируют 1 аминокислоту. Код называют вырожденным (см. Вырожденность кода), т.к. 18 из 20 аминокислот определяется не одним, а большим числом кодонов. Код читается с фиксированной точки старта, в одном направлении, по 3 последовательно следующих друг за другом нуклеотида (триплета). Г. к. универсален для всех живых организмов.

Геном (*genom*) — совокупность генов, характерных для гаплоидного набора хромосом данного вида организмов. Основным гаплоидный набор хромосом.

Геномная библиотека (*genomic library*) — набор клонированных (см. Клонирование) фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (видовой) геном (см. Библиотека генов, Банк генов). У млекопитающих (в т. ч. у человека) геномы крупные, поэтому для них обычно создают хромосомные библиотеки (см.).

Геномная ДНК (*geitomic DNA*) — 1. Вся хромосомная ДНК организма; 2. Ядерная ДНК в клетках эукариот (см. Дезоксирибонуклеиновая кислота).

Гетеротрофы — организмы, питающиеся готовыми органическими веществами. Г. являются животные, грибы, большинство бактерий, многие протисты и паразитические растения.

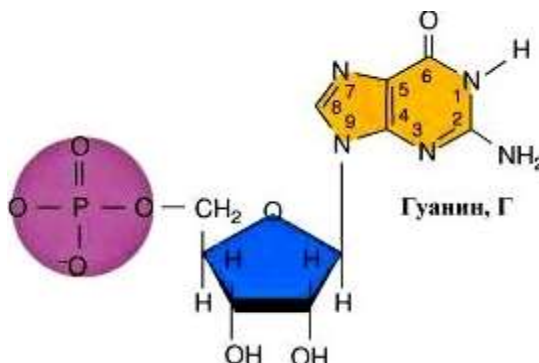
Гетерохроматин (*heterochromatin*) — часть хроматина, находящаяся в конденсированном состоянии в интерфазе клеточного цикла, как правило, реплицируется позже эухроматина и в основном составлен высокоповторяющимися последовательностями; ДНК в составе Г. чаще всего не транскрибируется; термин «Г» предложен Э. Хейтцем в 1922 г.

Гибридизация праймеров — вторая стадия ПЦР в ходе которой при снижении температуры в реакционной смеси *in vitro* с 92°C до 50°C происходит гибридизация праймеров с матричными цепями ДНК (см. отжиг). Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

Гибридная (рекомбинантная) ДНК — новая последовательность ДНК, образованная *in vitro* путем сшивания (лигирования (см.)) двух или более негомологичных молекул ДНК. Напр., рекомбинантная плазида (см.), содержащая одну или более вставок чужеродной ДНК. Организмы, содержащие такие *in vitro* сконструированные ДНК, также относятся к рекомбинантам (рекомбинантный фаг, бактерия).

Гуанин, Г (*guanine, G*) [исп. *huanu* — навоз и лат. *-in(e)* — суффикс, обозначающий «подобный»] — пуриновое основание (2-амино-6-оксипурин), комплементарное цитозину (см. Цитозин, Ц) в нуклеиновых кислотах, содержится во всех живых клетках в составе ДНК и РНК, входит в состав гуанозина Г. — структурный компонент низкомолекулярных коферментов, исходное вещество при биосинтезе птеринов, рибофлавина, фолиевой кислоты. Нуклеотид Г. (гуанозинтрифосфат, ГТФ) участвует в синтезе белка, активации жирных кислот, цикле трикарбоновых кислот, глюконеогенезе.

Гуанозин 5'-монофосфат (GMF)— нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пуринового азотистого основания гуанина.



Д

Двухцепочечная молекула кДНК — см. кДНК, комплементарная ДНК.

Двунаправленная репликация — репликация, при которой две репликационные вилки движутся в противоположных направлениях от общего старта - *oriC*.

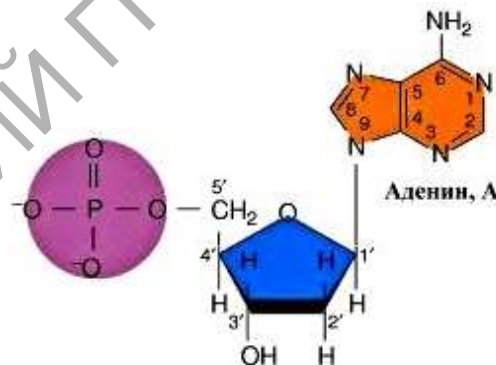
D-петля – область внутри митохондриальной ДНК, в которой небольшой участок РНК-прайма взаимодействует с одной из цепей ДНК, вытесняя исходную комплементарную цепь. Этот же термин используется при описании события, катализируемого RecA-белком, которое заключается в замене одной цепи в дуплексной ДНК другой одноцепочечной ДНК, захваченной извне.

Дезоксирибоза – молекула рибозы у которой отсутствует гидроксильная группа при 2'-углеродном атоме сахарного кольца, входит в состав дезоксинуклеотидов.

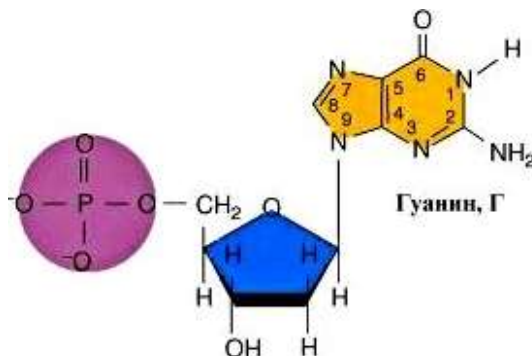


Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А, Т, Ц, Г), аperiodическим чередованием которых кодируется генетическая информация вирусов, бактерий и высших организмов. ДНК может быть однонитчатой (ssДНК), как, напр., у некоторых вирусов, или двунитчатой (dsДНК) у всех высших организмов. У двунитчатой ДНК две комплементарные нити закручены в спираль, одна нить вокруг другой с противоположной ориентацией (антипараллельны, $5' \rightarrow 3'$ и, наоборот, $3' \rightarrow 5'$). Две нити удерживаются вместе водородными связями между комплементарными основаниями ($A = T$; $G = C$). ДНК способна к самоудвоению, что обеспечивает генетическую преемственность между поколениями в процессе размножения. Нарушение последовательностей нуклеотидов в цепи ДНК приводит к наследственным изменениям — мутациям.

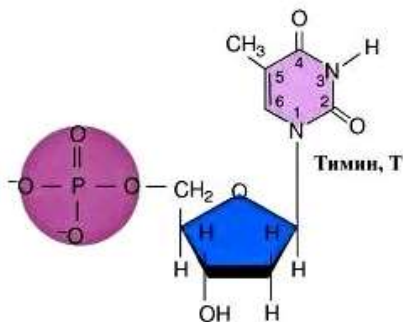
Дезоксиаденозин 5'-монофосфат (dAMF) – нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пуринового азотистого основания аденина.



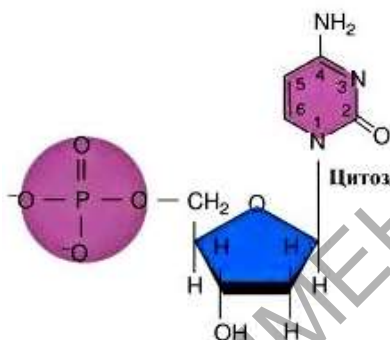
Дезоксигуанозин 5'-монофосфат (dGMF)– нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пуринового азотистого основания гуанина.



Дезокситимидин 5'-монофосфат (dTMP) – нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пиримидинового азотистого основания тимина.



Дезоксицитидин 5'-монофосфат (dCMP) – нуклеотид молекулы ДНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода дезоксирибозы и пиримидинового азотистого основания цитозина.



Денатурация ДНК — 1. Процесс разъединения двойной спирали нуклеиновых кислот на комплементарные одноцепочечные нити под действием физических и химических факторов (температуры, давления, pH и др.). 2. Первая стадия ПЦР в ходе которой происходит нагревание температуры в реакционной смеси *in vitro* до 90°C. При этом, в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы ДНК образуется две одноцепочечные.

Дидезоксинуклеотид, ddNTP (Dideoxynucleotide) - Полученный искусственным путем нуклеозидтрифосфат, без гидроксильных групп при 2'- и 3'-углеродных атомах сахарного кольца (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP).

Дидезоксирибоза – молекула рибозы у которой отсутствуют гидроксильные группы при 2'- и 3'-углеродных атомах сахарного кольца, входит в состав дидезоксинуклеотидов (см. рибоза, дезоксирибоза).

Дистрофин (dystrophin) — крупный мышечный белок (молекулярная масса Д. человека - 427 кД), связанный с внешней мембраной многоядерных мышечных волокон и вовлеченный в патогенез широко распространенных мышечных дистрофий Дюшенна и Беккера; ген Д. расположен в X-хромосоме (Xp21.2), и является одним из самых больших генов человека (длина около 2,6 млн. п. н., состоит из 79 экзонов).

ДНК-ДНК гибридизация (DNA-DNA hybridization) — процесс образования двухцепочечной ДНК из двух комплементарных однонитчатых молекул ДНК.

ДНК-лигазы — ферменты, которые катализируют образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК. Связи образуются между C—C, C—S, C—O и C—N за счет энергии сопряженной реакции гидролиза. В технологии рекомбинантной ДНК используются в основном две ДНК-л., выделенные из *E. coli* и фага T4. ДНК-л. соединяют две молекулы ДНК путем лигирования (см.) ту-

пых или липких концов. Впервые была выделена Б. Вейсом и К. Ричардсоном в 1966 г.

ДНК-зонд (проба) — определенная (известная) радиоактивно- и флюорисцентно меченая последовательность нуклеиновой кислоты, используемая в молекулярном клонировании для идентификации специфических молекул ДНК, имеющих комплементарные последовательности. Для этого используется радиоавтография или к.-л. др. система детекции (обнаружения) меченого зонда.

ДНК-матрица (template) – последовательности оснований ДНК (РНК), служащие в качестве основы для синтеза комплементарных нитей нуклеиновых кислот.

ДНК-полимеразы (DNA-polymerases) — ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У *E. coli* были выделены 3 типа ДНК-п.: *pol I*, *pol II* и *pol III*. *Pol III* является основным ферментом, ответственным за репликацию (см.) ДНК в клетке бактерий. Два др. фермента функционируют преимущественно при восстановлении (репарации) ДНК. Эукариоты содержат множество видов ДНК-п., находящихся в разных частях клетки: в ядре, цитоплазме или митохондриях, и выполняют различные функции, такие, как репликация, репарация и рекомбинация.

ДНК-топоизомеразы – группа ферментов, которые контролируют уровень суперскрученности ДНК.

ДНК-фингерпринтинг, метод фингерпринта ДНК (DNA fingerprinting or DNA fingerprint technique) (см. Фингерпринт ДНК) – метод, при котором геномная ДНК рестриктируется эндонуклеазами (см.), образующиеся фрагменты разделяются при помощи гелевого электрофореза (см.), переносятся на мембраны (нитроцеллюлозные фильтры, см.) и гибридизуются с мечеными зондами (с.м.). В случае наличия в исследуемой ДНК участков, гомологичных зондам, образуются полиморфные полосы гибридизации, как правило, специфичные для каждого образца ДНК. Поэтому метод может быть использован для генетической идентификации (дактилоскопии) индивидуумов одного вида. Применяется при картировании геномов, выяснении отцовства, в криминалистике.

Домен – участок полипептидной цепи белка, выполняющий какую-либо его функцию (например, цитоплазматический Д., трансмембранный Д. и т.п.); каждый Д. кодируется участком гена, расположенным между соседними интронами (т.е. одним экзоном), что обуславливает эволюционный консерватизм положения интронов (например, в генах гемоглобина млекопитающих); также Д. – дискретный участок хромосомы, спирализующийся независимо от соседних участков (доменов) или обладающий повышенной чувствительностью к ДНКазе.

Е

***Escherichia coli*, *E. coli*, кишечная палочка** — грамотрицательная кишечная бактерия, широко известная в молекулярной биологии. Её геном (хромосома) включает ок. 4500 кб ДНК, организованных в 50 независимых топологических доменов, и содержит серию инсерций. В н. вр. весь геном *E. coli* секвенирован полностью. *E. coli* имеет большое значение для экспериментальных исследований рекомбинантной ДНК (см.), т. к. она служит хозяином для большого числа разных вирусов, плазмид и космидного клонирования векторов (см. Вектор клонирования. Космида).

ERK1 и 2 (extracellular signal-regulated kinases) – экстрацеллюлярная сигнальная киназа, активируемая MEK-киназой путем фосфорилирования. Непосредственно ERK1 и 2 фосфорилируют факторы, поступающие в ядро.

3

Запаздывающая цепь – цепь дочерней ДНК, на которой синтез комплементарной цепи во время репликации осуществляется посредством соединения фрагментов Оказаки.

И

Изоакцепторные тРНК – группа тРНК, связывающих одну и ту же аминокислоту, но имеющих разные антикодоны; разные И.тРНК узнаются одной и той же аминоацил-тРНК-синтетазой; И.тРНК отсутствуют у метионина и триптофана, а наибольшее их число (по 6) распознают кодоны аденина, лейцина и серина; И.тРНК могут иметь одинаковые антикодоны, но различную первичную структуру.

Инвертированные концевые повторы – короткие гомологичные последовательности, ориентированные в противоположных направлениях, расположенные на концах некоторых мобильных генетических элементов, например, IS-элементов.

Инвертированный повтор – участок молекулы нуклеиновой кислоты, два сегмента которого имеют одинаковую нуклеотидную последовательность, но противоположную ее ориентацию.

Иницирующий кодон (*initiator codon*) — кодон АУГ в составе мРНК, кодирующий метионин (формилметионин), с которого начинается (инициируется) синтез многих (возможно - всех) полипептидных цепей, у бактерий кроме АУГ инициацию определяет иногда ГУГ, у эукариот – всегда АУГ.

Иницирующий комплекс – структура, необходимая для инициации синтеза полипептидной цепи рибосомами, состоит из малой (30S) субъединицы рибосомы, молекул иницирующих факторов, формилметиониновой тРНК, ГТФ и собственно транслируемой мРНК; также И.К. – комплекс РНК-полимеразы с матричной ДНК и инициаторным рибонуклеозидтрифосфатом, образование которого необходимо для инициации транскрипции.

Информационная (матричная) РНК (и-РНК, мРНК) — форма РНК, осуществляющая передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка, состоит из одной цепи, содержит от одной до десяти тысяч пар оснований.

Интроны, интрогенные районы (*introns or intragenic regions or intervening sequences*) — последовательности нуклеотидов у эукариотических генов, транскрибируемых в про-иРНК, которые затем вырезаются и деградируют в ядре. Остающиеся последовательности транскрипта (см. Экзоны) соединяются, образуя зрелую информационную РНК (см.), с которой осуществляется трансляция белка. Т. о. И. никогда не присутствуют в белке. И. различаются по длине (от 50 до 12000 нуклеотидов), по их числу на один ген (один и более) и по последовательности нуклеотидов. Однако в большинстве И. пограничные сайты между И. и экзоном идентичны. Эти пограничные участки обеспечивают правильное вырезание (эксцизию, см.) И. и сплайсинг экзонов.

Искусственные генетические структуры — целенаправленно сконструированные (созданные) новые формы биологически активных ДНК и генетически новые формы клеток с помощью искусственных приёмов переноса фрагментов ДНК, целых генов или их частей.

In vitro (лат.), **"в пробирке"** — биологические процессы, смоделированные при их экспериментальном изучении в условиях изоляции от всего (целого) организма, т. е. "в пробирке", напр., культура ткани, фермент-субстратная реакция и т.д.

In vivo — выращивание живого материала в естественных условиях.

К

Картирование (*mapping*) — установление позиций генов или каких-то определенных сайтов (см.) вдоль нити ДНК (см. Генетические карты, Рестрикционные карты).

Картирование генов (*gene mapping*) — установление линейной организации генов, определение относительной локализации генов на хромосомах (см. Хромосомные карты) или плаزمидях (кольцевая карта сцепления) и относительного расстояния между ними. Генетические карты можно создавать на основе анализа рекомбинаций (см.), принятого в классической генетике, или на основе данных молекулярной генетики, т. е. напрямую используя данные секвенса ДНК (см. Секвенирование ДНК).

Каспазы (англ. *caspases*) — протеазы, имеющие цистеин в активном сайте и разрезающие белки-мишени по аспарагиновой кислоте.

Катаболическая репрессия — ослабление экспрессии многих бактериальных оперонов, происходящее при добавлении глюкозы; вызывается уменьшением уровня циклического АМР в клетке и инактивацией вследствие этого регуляторного CAP-белка.

Кб, килобаза (*kb, kilobase*) — единица, используемая для выражения размера нуклеиновых кислот (см.), 1 кб = 1000 нуклеотидов, или пар оснований (п. о.), в двухцепочечной ДНК.

кДНК, комплементарная ДНК (*cDNA, complementary DNA*) — одно- или дву-нитчатая молекула ДНК, комплементарная молекуле иРНК. Образуется при обратной транскрипции иРНК с помощью обратной транскриптазы (см.) *in vitro*. кДНК соответствует определенному гену без интронов.

Киназы — ферменты, катализирующие перемещение фосфатной группы из высокоэнергетического положения (как в АТФ) в другую молекулу.

Кишечная палочка — см. *Escherichia coli*.

Клеточный цикл — жизнь клетки с момента ее образования в процессе деления материнской клетки до собственного деления (включая это деление) или до гибели.

Клонирование гена (*gene cloning*) — см. Клонирование ДНК.

Клонирование ДНК (*DNA cloning*) — использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, напр, гена (см.), в клонирующий вектор и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, напр, в клетки кишечной палочки.

Кодон — последовательность из трех соседних нуклеотидов в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту либо начало и конец трансляции (см.), т. е. это дискретная единица генетического кода. Всего возможно 64 сочетания нуклеотидов в триплетах — 61 из них кодирует 20 аминокислот, а 3 являются нонсенс-кодонами (см. Стоп-кодон).

Кольцевые молекулы ДНК — см. плазмиды (кольцевые).

3'-Конец (*3'-carbon atom end or 3'-terminus*) — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной группой (ОН⁻) у 3'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы.

3'-Конец праймера — конец праймера со свободной гидроксильной группой (ОН) у 3' атома углерода рибозы с которого Таг-полимераза достраивает растущую цепь ДНК в 5'-3' направлении на третьей стадии цикла ПЦР (см.).

5'-Конец (*5'-carbon atom end or 5'-terminus*) — один из концов линейной молеку-

лы ДНК или РНК, несущий нуклеотид с гидроксильной (ОН⁻) группой в остатке фосфорной кислоты у 5'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы. С 5'-конца начинается синтез полинуклеотидных цепей в процессе репликации (см.), транскрипции (см.) и репарации (см.).

Конструирование гибридных молекул ДНК — создание новых форм биологически активных ДНК с помощью искусственных приёмов переноса и сшивания различных фрагментов ДНК.

Концевая (терминальная) трансфераза (*terminal transferase*) – фермент, катализирующий достройку 10-40 дезоксинуклеотид-5'-трифосфатов к 3'-ОН-группам обоих концов двуничей ДНК или к одоничной ДНК, образуя 3'-гомополимерное удлинение нити (полидезоксиденилат) и освобождая неорганический пирофосфат. Фермент используется для радиоактивного мечения молекулы ДНК и образования гомополимерных хвостов на 3'-концах ДНК. Т. т. широко используется в технологиях рекомбинантной ДНК (см.).

Кроссинговер – (от англ. *crossingover* – перекрест) – механизм взаимного обмена генами и целыми сегментами хроматид между спаренными гомологичными хромосомами в процессе мейоза. При конъюгации хромосом за счёт перекреста двух хроматид, переходящих от одной хромосомы к другой, возникают хиазмы. Кроссинговер характеризуется разрывом этих хиазм, причём сегменты перекрещенных хроматид остаются включенными в состав соседних гомологичных хромосом, в результате чего и происходит обмен наследственными факторами между гомологичными хромосомами. Термин введен Морганом (1911).

Кэп – структура на 5'-конце эукариотических иРНК; образуется после транскрипции за счёт присоединения 5'-конца гуанинового нуклеотида к 5'-концевому основанию иРНК. Эта структура может быть метилирована, по крайней мере, по той молекуле гуанина, которая присоединилась. «Кэп» имеет следующее строение - 7MeG5'ppp5'Nr...

Л

Лактозный оперон, lac-оперон – комплекс генов (общий размер – около 6 тыс. пар нуклеотидов) ДНК *E. coli*, включающий генератор и 3 структурных гена: *lacZ* (кодирует β-галактозидазу), *lacY* (β-галактозидпермеазу), *lacA* (β-галактозидтрансацилазу), – в результате транскрипции Л.о. образуется полицистронная мРНК; белокрепрессор кодируется геном *lacI*, кодируемые генами *lacY* и *lacZ* ферменты участвуют в транспорте и расщеплении лактозы, а продукт гена *lacA* изомеризует лактозу с образованием алло-лактозы, которая является индуктором Л.О

lac-Z-ген (*lac-Z-gene*) — ген лактозного оперона *E. coli*, кодирующего β-галактозидазу. Этот фермент катализирует превращение дисахаридов лактозы в моносахариды и глюкозу. *lac-Z-ген* входит в состав различных клонирующих векторов и выполняет роль репортерного гена (см.) в экспериментах по трансформации.

Лигаза, синтетаза — см. ДНК-лигаза.

Лиганд – небольшая молекула (например, активаторы, субстраты и ингибиторы активности фермента), связанная с белком нековалентными связями; ион или молекула, которая связывает другие химические компоненты, образуя сложный комплекс.

Лигирование (*ligation*) — 1. Процесс ковалентного соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемый с участием фермента лигазы. 2. Прием в генетической инженерии, в ходе которого чужеродная ДНК встраивается между в плазмидную ДНК с помощью фермента лига-

зы (см.).

Лидирующая цепь – дочерняя цепь ДНК в репликативной вилке, синтезирующаяся непрерывно.

Лизирование, лизис (*lysis*) — разрушение/растворение вирусами, клеток хозяина под действием ферментов, содержащихся в лизосомах и выделяемых инфицирующими вирусными частицами, в результате чего в среду высвобождается новое потомство вируса.

Линкер, линкерная ДНК (*linker, l. DNA*) — Синтетический олигодезоксирибонуклеотид определенной последовательности, содержащий один или несколько сайтов узнавания (см.) для рестрикционных эндонуклеаз (см.). Л. может быть лигирован к любому тупому концу (см.) дуплексной ДНК с помощью *T4*ДНК-лигазы (см.).

Липкий конец — термин, относящийся к двунитчатой молекуле ДНК, у которой одна нить длиннее ("выступающая"), чем другая ("заглубленная"). Выступающий участок нити может спариваться с др., комплементарным ему выступающим (липким) концом. Пример: два коротких (12 нуклеотидов) однонитчатых 5'-выступов на каждом конце линейного генома фага лямбда (*cos*-сайт). Эти Л. к. комплементарны по последовательностям нуклеотидов друг другу и могут спариваться, образуя кольцевую ДНК.

М

Макросателлит – относительно крупный спутничным элемент, диаметр которого превышает половину толщины нити хроматиды.

Малая ядерная РНК (мяРНК) – транскрипты РНК длиной 100-300 п. о., которые, связываясь с белками, формируют малые ядерные рибонуклеопротеиновые частицы. Большинство мяРНК являются компонентами сплайсосом

Метод дробовика («шот-ган») (*shotgun*) — получение случайной массивированной выборки клонированных фрагментов ДНК данного организма (т.е. «дробление» генома), на основе которых может быть составлена его геномная библиотека; полученные в результате «Ш.-г.» последовательности нуклеотидов после дополнительного клонирования могут быть использованы в различных генетических экспериментах.

Метилирование – процесс присоединения к нуклеотиду метильной группы – в частности, в ДНК клеток животных «в норме» метилированы до 7% остатков цитозина, причем сателлитная ДНК обычно метилирована в значительно большей степени, чем ДНК структурных генов, у которых метилированная ДНК обычно ассоциирована с неактивным состоянием, а деметилированная – с активацией генов, исключением из этого правила является ген Об-метилгуанин-ДНКметилтрансферазы, более экспрессированный при большем уровне М.; у бактерий процесс М. сайтов рестрикции (модификация) предохраняет ДНК от разрушения собственными эндонуклеазами и контролируется специфическими метилазами.

Микросателлиты, микросателлитные локусы (STR-локусы, Short Tandem Repeats) — варьирующие участки (локусы) в ядерной ДНК и ДНК органелл (митохондрий и пластид), состоящие из большого количества – до ста и выше - tandemно повторяющихся идентичных «мотивов». Мотивом является короткая последовательность из нескольких (от двух до восьми) пар нуклеотидов, обычно называемая «повтором». В зависимости от длины повтора микросателлиты классифицируют на локусы с ди-, три-, тетра-, пента-, и гексануклеотидными повторами. Являются широко распространёнными молекулярными маркерами в генетических и геномных исследованиях.

Минисателлиты (*minisatellites*) — короткие (14-100 н.п.), среднеповторяющиеся, tandemно организованные, высоко-вариабельные последовательности ДНК (обычно богатые ГЦ-последовательностями), рассредоточенные по геному человека (встречаются также у растений и животных). М.-с. проявляют значительный полиморфизм по длине, который возникает в результате неравного кроссинговера. В итоге в М.-с. изменяется число коротких tandemных повторов (см.), что ведет к образованию последовательностей длиной от 0,1 до 20 кб. Короткий tandemно повторяющийся М.-с., являясь хорошим генетическим маркером для анализа сцепления (см. ДНК-фингерпринтинг), может использоваться в качестве гибридизационного зонда для одновременного обнаружения высокополиморфных М.-с. в пределах рестриктов ДНК. Вероятность идентичности того же набора фрагментов ДНК у двух человек теоретически настолько мала, что каждый человек считается уникальным по набору полос (за исключением однойцевых близнецов, см.), выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах.

Митоген (*mitogen*) – любое соединение (продукты дегенерации, специфические митотические гормоны и др.), стимулирующее клетки к вступлению в митоз; фактор, вызывающий переход клеток из G₀-фазы к клеточному делению. Пример – факторы роста.

Митоген-активируемые киназы (МАРК) – это протеинкиназы, которые отвечают на внеклеточные стимулы (митогены) и регулируют многие клеточные процессы (экспрессию генов, деление, дифференцировку и апоптоз). Внеклеточные стимулы ведут к активации МАРК через сигнальный каскад (наприм., **Ras/MAPK-каскад**). К членам семейства МАРК относятся: белки **Raf**, киназы **ERK1 и 2** (extracellular signal-regulated kinases); киназы **MEK** (MEKK, – mitogen activated extracellular kinases) и др.

Митохондриальный геном – кольцевая двунитевая молекула ДНК, входящая в состав митохондрий (размер мтДНК у животных обычно около 16 тыс. пар оснований, а в различных группах растений и микроорганизмов эта величина существенно больше и высокоизменчива); М.Г. включает гены тРНК и рРНК, некоторых ферментов (субъединицы АТФазы, цитохромоксидазы и др.), в нем имеются некоторые отклонения от универсального триплетного кода (например, триплет УГА, являющийся стоп-кодом в ядерном геноме, в М.Г. животных кодирует триптофан); как правило, М.Г. наследуется по материнскому типу; анализ структуры мтДНК с использованием рестриктаз широко применяется в популяционно-генетических исследованиях.

Медиаторы (от лат. mediator - посредник) — вырабатываемые нервными клетками и выделяемые в межклеточное пространство физиологически активные вещества, с помощью которых осуществляется начальный этап передачи нервного импульса. Связываясь с мембраной рецептора, медиатор изменяет ее проницаемость для определенных ионов, что приводит к созданию необходимого для передачи импульса активного электрического потенциала. К числу медиаторов центральной нервной системы относятся ацетилхолин, адреналин, серотонин и др.

Модель двухцепочечной молекулы ДНК - В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик, основываясь на данных Э. Чаргаффа и Р. Франклин, построили пространственную модель молекулы ДНК и истолковали ее роль, как носителя генетической информации (рис.). Согласно их модели молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных комплементарных цепочек, закрученных в двойную спираль. Азотистые основания нуклеотидов обеих цепей ДНК заключены внутри между витками спирали и соединены водородными связями. В соответствии с правилами Чаргаффа аденин одной цепи

связан только с тиминном другой цепи, а гуанин – только с цитозином. Такой порядок соответствия азотистых оснований (А=Т и Г=Ц) называется комплементарностью, и, следовательно, цепи в ДНК комплементарны друг другу. В каждой из цепей ДНК нуклеотиды последовательно соединены друг с другом с помощью остатка фосфорной кислоты и молекулы дезоксирибозы. Обе цепи в молекуле ДНК имеют противоположную направленность, одна имеет направление 5'-3', а другая 3'-5'.

Модификация – видоизменение, преобразование, характеризующееся появлением новых свойств.

Молекула ДНК — см. Дезоксирибонуклеиновая кислота.

Молекулярная биология — область биологии, исследующая проявление жизни на молекулярном уровне. Основное направление М. б. — выяснение роли биологически важных молекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) в росте и развитии организмов, хранении и передаче наследственной информации, превращении энергии в живых клетках и т. п. явлениях. М. б. включает в себя молекулярную генетику, молекулярную вирусологию, молекулярную иммунологию и т. д. М. б. сформировалась в середине XX в. и бурно развивается в наши дни.

Молекулярная генетика — раздел современной генетики, изучающий закономерности и молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и передачи наследственных признаков.

Молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний — точная идентификация наследственных заболеваний на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. Саузерн-блот анализ, ДНК-фингерпринтинг, Секвенирование ДНК, ПЦР-технологии). Молекулярно-генетическая диагностика может давать точную идентификацию наследственных заболеваний на всех стадиях развития и жизни организма человека, начиная с восьмиклеточного пре-эмбриона, всех эмбриональных стадий внутриутробного развития, пост эмбриональных стадий и т.д.

Рес-мутация – мутация, нарушающая процесс гомологичной рекомбинации у *E.coli*; *R.-M.* происходят в нескольких генах, кодирующих ферменты, которые участвуют в рекомбинации по типу «разрыв-соединение» (экзонуклеаза, ДНК-полимераза, ДНК-лигаза и т.д.); впервые *R.-M.* была получена у *E.coli* А. Кларком и А. Маргуэлисом в 1965, кроме того, они показали резкое возрастание чувствительности Рес-мутантов к ультрафиолету, что подтвердило близкую связь репарационного и рекомбинационного процессов, в частности, общность участвующих в них ферментов.

Мутаген — физический или химический агент, увеличивающий частоту мутаций по сравнению со спонтанным уровнем.

МЕК 1 и 2 (МЕКК, – mitogen activated extracellular kinases kinases) – митогенактивируемые экстрацеллюлярные киназы киназ, которые активируется путем фосфорилирования RAF белками. МЕК фосфорилируют ERK1 и 2, которые в свою очередь фосфорилируют факторы, поступающие в ядро.

Н

Нуклеиновая кислота – универсальный биополимер, состоящий из рибо- или дезоксирибонуклеозидмонофосфатов, соединенных фосфодиэфирными связями, образованными между 5'-фосфатом одного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой следующего; молекулярная масса Н.К. может достигать 10¹⁰; различают (по типу входящих сахаров) 2 основных типа Н.К. – ДНК и РНК, главная роль Н.К. – хранение и передача генетической информации; термин «Н.К.» предложен в 1889 (впервые Н.К. обнаружена

в лейкоцитах человека Ф. Мишером в 1868).

Нуклеозид – химическое соединение, состоящее из остатков азотистого основания и углевода – рибонуклеозид и дезоксирибонуклеозид; основные природные Н. входят в состав нуклеиновых кислот (аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, тимидин); Н. образуются при гидролизе нуклеиновых кислот и нуклеотидов.

Нуклеосома – дисковидная структура диаметром около 10 нм, являющаяся элементарной единицей упаковки хромосомной ДНК в хроматине; состоит из белкового ядра (включает октамер гистонов H2, H3, H4, но не H1), «опоясанного» 7/4 оборота двойной спирали ДНК (140 пар нуклеотидов), межнуклеосомные участки ДНК (линкеры) по длине варьируют в пределах 15–100 и более пар нуклеотидов; суммарная молекулярная масса одной Н. оценивается в 262 кД (108 кД приходится на гистоны, 130 кД – на ДНК, 24 кД – на небольшие негистоновые белки); нуклеосомная структура универсальна для эукариотических организмов – ее отсутствие известно в сайтах, сверхчувствительных [к ДНКазе].

Нуклеотиды – органические вещества, состоящие из пуринового или пиримидинового основания, сахара рибозы (дезоксирибозы) и фосфорной кислоты; составная часть нуклеиновых кислот и многих коферментов (НАД, НАДФ, кофермента А и др.). Являются мономерами нуклеиновых кислот. Н. также называют нуклеозидфосфатами: аденозинмонофосфат (АМФ), гуанозинмонофосфат (ГМФ), цитидинмонофосфат (ЦМФ), уридинмонофосфат (УМФ) и тимидинмонофосфат (ТМФ). Н. являются некоторые макроэргические соединения, напр. АТФ.

О

Обратная транскриптаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза (*reverse transcriptase, RNA-dependent DNA-polymerase*) — ретровирусный многофункциональный фермент класса трансфераз, синтезирующий двунитчатую ДНК с использованием в качестве матрицы однонитчатой РНК. О. т. широко используются в ДНК-рекомбинантной технологии для синтеза кДНК (см.) с информационной РНК и в генной инженерии для получения нужных ДНК *in vitro*. У некоторых ретровирусов (см.) О. т. является мономером, у других — димером.

Олиго(dT) праймер (*oligo(dT) primer*) — синтетический гомополимерный олигодезоксирибонуклеотид, который может быть подсоединен к поли(А) хвосту (см.) полиаденилированной иРНК и использоваться как праймер (см.) для синтеза первой нити кДНК с помощью обратной транскриптазы.

Олигонуклеотидные затравки — см. праймер.

Оператор – участок ДНК, узнаваемый специфическими белками-репрессорами и негативно регулирующий транскрипцию структурных генов, размер – несколько десятков нуклеотидов; как правило, О. непосредственно примыкает к регулируемому структурному гену (согласно модели оперона); известны точковые мутации О., ведущие к постоянной (конститутивной) экспрессии соответствующего гена.

Оперон, транскриптон (*operon*) — участок бактериальной хромосомы, содержащий несколько структурных генов (например, *lac*-О. *E. coli* включает 3 гена), транскрибируемых с образованием одной полицистронной молекулы мРНК (см.); каждый О., как правило, включает специфические ген-оператор и ген-регулятор, контролирующие его транскрипцию.

Открытая рамка считывания (*open reading frame, ORF*) — последовательность нуклеотидов ДНК, которая начинается с иницирующего кодона АТГ и заканчивает-

ся одним из трех терминирующих кодонов - ТАА, ТАГ или ТГА; потенциально **О.р.с.** может быть транслирована в полипептидную цепь.

Отжиг (*annealing*) — процесс восстановления (ренатурация), называемый также гибридизацией, нуклеиновой кислоты, во время которого одноцепочечные полинуклеотиды образуют двухцепочечную молекулу с водородными связями между комплементарными нуклеотидами двух цепей. О. может происходить между комплементарными цепочками ДНК или РНК, в результате образуются гибридные двухцепочечные молекулы. Название обусловлено тем, что процесс О. связан с первоначальным нагреванием образца и последующим его охлаждением.

П

Палиндром – участок двухцепочечной молекулы ДНК, обе цепи которого обладают одинаковой последовательностью нуклеотидов при прочитывании от 5' – к 3'-концу, т.е. П. является тандемным инвертированным повтором. П. играют важную роль в обеспечении процессов терминации транскрипции (у прокариот П. обнаружены во всех терминаторных участках генов), являются сайтами действия рестриктаз, а также участвуют в ряде др. процессов.

Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК — создана в 1972 г. П. Бергом, которая включала в себя фрагменты фага λ , *E. coli* и вируса обезьян sv-40.

Плазмиды — внехромосомный (экстрахромосомный) генетический элемент, кольцевая, автономно реплицирующаяся двухцепочечная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 и более кб и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку. Число копий П. может зависеть от факторов среды. П. обычно придают селективные преимущества клетке хозяина (напр., устойчивость к антибиотикам). Конъюгативные П. имеют набор генов, обеспечивающих их перенос в др. клетки. Бактериальные П. широко используются для конструирования векторов клонирования. Термин «П.» предложен Дж. Ледербергом и др. в 1952 г.

Повторяющаяся нуклеотидная последовательность (ДНК) (*repetitious DNA*) — последовательность нуклеотидов, содержащаяся в хромосомной ДНК в виде идентичных копий; различают высокоповторяющиеся нуклеотидные последовательности (млн. копий на геном), а также умеренно повторяющиеся последовательности (десятки и сотни копий на геном).

Поли(А), полиаденилат (*poly(A) or polyadenylate*) — гомополимер, содержащий остатки адениновых нуклеотидов. Практически все мРНК эукариот на своих 3'-концах содержат последовательность поли(А) или поли(А) хвост.

Полилинкер, сайт множественного клонирования (*polylinker or multiple cloning site*) — синтетический двунитчатый олигонуклеотид, содержащий много сайтов рестрикции (см.). П. вводят в векторы, чтобы расширить их возможности для встраивания чужеродных ДНК.

Полимеризация — третья стадия цикла ПЦР в ходе которой при увеличении температуры в реакционной смеси *in vitro* с 50°C до 72°C *Tag*-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов до размеров матричной нити ДНК. Этот процесс протекает в течении 90 секунд. В результате количество ДНК удваивается. Фермент *Tag*-полимераза был выделен из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°C гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а *Tag*-полимераза способна работать с большой скоростью.

Полимеразная цепная реакция, ПЦР (*polymerase chain reaction, PCR*) — процесс амплификации (см.) *in vitro*, при котором фрагмент ДНК длиной до 15 кб

может быть амплифицирован (размножен) до 10^8 раз (копий). Для этого синтезируются два праймера размером в 10-30 нуклеотидов, комплементарных последовательностям на двух концах исследуемой ДНК. Избыточное количество этих двух олигонуклеотидных праймеров (см.) смешивается с геномной ДНК, смесь нагревается для денатурации дуплексов ДНК до 90°C . При последующем снижении температуры до 50°C праймеры присоединяются к их геномным гомологам и могут с помощью ДНК-полимеразы удлиниться, т. е. на ДНК-матрице синтезируется вторая цепь. Последовательный процесс (цикл процессов) денатурации, отжига праймера и его удлинения повторяется 20-40 раз. В результате происходит экспоненциальное увеличение копий изучаемой ДНК. За 25 амплификационных циклов количество целевых последовательностей ДНК увеличивается приблизительно в 10^6 раз. Для синтеза новых цепей ДНК используются термостабильные ДНК-полимеразы (*Taq*-полимераза, *Vent*TM-ДНК-полимераза). В н. вр. ПЦР нашла широкое распространение в молекулярной биологии и на ее основе разработано множество методов анализа геномов. Имеет место также инвертированная полимеразная цепная реакция, т. е. модификация обычной ПЦР, позволяющая амплифицировать неизвестные последовательности ДНК, прилежащие к коровой области известной последовательности.

Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (*arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR*) — модификация стандартного метода ПЦР, позволяющая осуществлять амплификацию (см.) целевых последовательностей ДНК с помощью произвольно взятых праймеров (см.), без предварительного знания нуклеотидных последовательностей данного генома.

Полисахариды — линейные или разветвленные полимеры, состоящие более чем из 10 моносахаридов, связанных гликозидными связями.

Полицистронная мРНК (*polycistronic message*) — молекула мРНК, кодирующая последовательности более чем одного белка; образуется при транскрипции двух или нескольких соседствующих генов, входящих в состав одного оперона.

Полуконсервативная репликация — способ репликации двухцепочечной молекулы ДНК, при котором исходная молекула разделяется на две цепи (с образованием репликативной вилки), каждая из которых служит матрицей для синтеза второй (новой) комплементарной полинуклеотидной цепи; гипотеза П.Р. была выдвинута Дж. Уотсоном и Ф.Криком одновременно с идеей о двойной спирали ДНК, а доказана опытами М. Мезельсона и Ф. Сталя по переносу меченой ДНК с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия.

Последовательность Шайна-Далгарно — консервативная последовательность в прокариотических иРНК, комплементарная последовательности, находящейся вблизи 5' —конца 16S рибосомной РНК, и, таким образом, участвующая в процессе инициации трансляции.

Последовательность узнавания — см. Сайт узнавания.

Правило Чаргаффа — правило, гласящее, что в любой двунитчатой молекуле ДНК число адениновых оснований всегда равно числу тиминовых ($A = T$), а число гуаниновых — числу цитозиновых ($G = C$) оснований. Согласно П. Ч. количество пиримидинов ($T + C$) равно сумме пуринов ($A + G$). П. Ч. открыто в 1950 г. и является одним из главных принципов в создании классической модели ДНК Уотсона—Крика.

Праймер, затравка (*primer*) — короткий олигонуклеотид ДНК или РНК, комплементарный участку более длинной молекулы ДНК или РНК. К его 3'-ОН-концу ДНК-полимераза (см.) может добавлять нуклеотиды в растущую цепь ДНК в 5'—3'-направлении. У прокариот РНК-полимераза (см.) катализирует синтез таких РНК-

праймеров для репликации ДНК. П. также нужны для РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы, см). *In vitro* (см.) используются синтетические П. размером до 10 п. о. для реакции полимеризации ДНК с помощью ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы, П. нужны для синтеза кДНК, ДНК секвенирования по Сэнгеру (см.), полимеразной цепной реакции, ПЦР (см.) и др.

Праймазы, ДНК-праймазы (DNA primase) – ферменты, осуществляющие синтез РНК-затравок для последующего синтеза фрагментов Оказаки, а также синтез РНК-затравок в процессе синтеза репликативной формы ДНК бактериофагов. У эукариот ДНК-праймаза является субъединицей ДНК-полимеразы. В отличие от обычных РНК-полимераз ДНК-праймаза способна использовать в качестве субстрата как рибо-, так и дезоксирибонуклеотиды; образует комплекс с другими ферментами – праймосому (см).

Праймосома – комплекс ферментов, обеспечивающих синтез запаздывающей цепи в репликативной вилке посредством образования фрагментов Оказаки; один из основных ферментов П. – ДНК-праймаза (см).

Пре-мРНК – предшественник мРНК (часто очень большого размера), синтезированный на матрице ДНК структурного гена в процессе транскрипции и до выхода из ядра претерпевающий посттранскрипционные модификации.

Принцип комплементарности — пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая к образованию вторичных (Ван-дер-Вальсовых, водородных, ионных) связей между ними. Уникальность и прочность комплементарных структур определяется высокой избирательностью, большой площадью взаимодействия на уровне атомных группировок или зарядов по принципу «ключ - замок» (комплексы антиген – антитело и фермент – субстрат, четвертичная структура белков, вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот). Наиб. ярко К. проявилась в структуре двуспиральных ДНК и РНК, где две полинуклеотидные цепи образуют в результате комплементарного взаимодействия пар пуриновых и пиримидиновых оснований (А-Т, Г-Ц) двуспиральную молекулу. Уникальная вторичная и третичная структура одноцепочечных полинуклеотидов (тРНК, рРНК) также определяется комплементарным спариванием оснований с образованием «петель» и «шпилек» вдоль по цепи. К. лежит в основе мн. явлений биол. специфичности, связанных с «узнаванием» на молекулярном уровне.

Прионы (от англ. proteinaceous infectious particles — белковые заразные частицы) — особый класс инфекционных агентов, чисто белковых, не содержащих нуклеиновых кислот, вызывающих тяжёлые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда высших животных (т. н. «медленные инфекции»). Прионный белок, обладающий аномальной трёхмерной структурой, способен прямо катализировать структурное превращение гомологичного ему нормального клеточного белка в себе подобный (прионный), присоединяясь к белку-мишени и изменяя его конформацию. Как правило, прионное состояние белка характеризуется переходом α -спиралей белка в β -слои. Прионы — единственные инфекционные агенты, размножение которых происходит без участия нуклеиновых кислот.

Прокариоты – организмы, клетки которых лишены ограниченного мембраной ядра; аналогом ядра является нуклеоид, генетическая система которого (генофор) соответствует примитивной хромосоме; митоза у П. нет, клетки П. лишены хлоропластов, митохондрий, аппарата Гольджи, центриолей, а рибосомы существенно отличаются от рибосом эукариотических клеток; П. составляют отдельное царство (возможно, надцарство), включающее одноклеточные (архебактерии, эубактерии) и многокле-

точные (сине-зеленые водоросли, или цианобактерии) организмы; термин «П.» предложен в 1937 Э. Шаттоном, который впервые сформулировал принципиальные различия П. и эукариот.

Промотор (*promoter*) — участок молекулы ДНК длиной 80-120 п. н., к которому присоединяются молекулы РНК-полимеразы, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов; каждый ген (или оперон) имеет свой П., контролирующий его транскрипцию; существование П. впервые было показано Ф. Жакобом и Ж. Моно при анализе *lac*-оперона *E. coli*.

Протеазы — ферменты, катализирующие гидролиз белков, то есть расщепление пептидных связей, которыми соединены остатки аминокислот в белковых молекулах. Синоним: пептидазы.

Протеинкиназы — ферменты, катализирующие присоединение к молекуле белка фосфатной группы (групп) в местах расположения остатков серина, треонина или тирозина.

Протоонкоген (*proto-oncogene*) — ген, контролирующий нормальную пролиферацию или дифференцировку клеток, который в результате соматической мутации или транспозиции может превращаться в онкоген; в норме протоонкогены кодируют протеинкиназы (напр., гены семейства *c-src*), мембранно-связанные белки (семейство *c-ras*), факторы роста и их рецепторы.

Процессинг — комплекс процессов образования зрелых молекул РНК и белков в клетке; включает ряд последовательных расщеплений молекулы-предшественника эндонуклеазой или протеазами с образованием конечных, функционально активных продуктов (например, 41S-, 32S-, 20S-рРНК у многих эукариот — промежуточные; 5,8S-, 18S-, 28S-рРНК — конечные) и деградации «избыточных» участков; у эукариот П. мРНК включает этап вырезания интронов и образования зрелой молекулы в результате сплайсинга; также к системе П. относят различные модификации — например, метилирование отдельных оснований и др.

ПЦР (*PCR*) — см. Полимеразная цепная реакция.

ПЦР-амплификации — см. полимеразная цепная реакция (ПЦР), амплификация генов.

ПЦР технологии — различные методы размножения (амплификация) ДНК с помощью ПЦР.

p53 (белок p53) — это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, соответственно ген TP53 является антионкогеном.

Р

Радиоактивно меченный ДНК-зонд — см. ДНК-зонд.

Разделение рестрикционных фрагментов ДНК — см. Электрофорез в агарозном геле.

Распознаваемые участки — см. Сайты распознавания.

recA - обнаруженный у большинства бактерий белок, играющий важную роль в процессах репарации и рекомбинации ДНК.

Рекомбинация — перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости; в общем смысле под Р. понимают создание новой комбинации генов при соединении гамет родителей, более узко Р. — обмен участками хроматид и хромосом в процессе клеточного деления; у прокариот Р. осуществляется в процессе конъюгации, трансформации либо трансдук-

ции, у вирусов – при смешанной инфекции; у эукариот, как правило, Р. характерна для мейоза (мейотическая Р.), но иногда имеет место и в митозе (соматическая Р.); различают реципрокную (взаимный обмен участками молекулы ДНК), нереципрокную (односторонний перенос участка ДНК); общую (кроссинговер), сайт-специфическую и незаконную Р. (обмен участками негомологичных хромосом в результате хромосомных перестроек).

Рекомбинация генов – (от лат. re – снова и combine – соединять) – обмен генами между двумя хромосомами или между двумя клетками, отличающимися друг от друга своими геномами. Последнее может происходить при «гибридизации» соматических клеток, соматическом кроссинговере. Единицей генетической рекомбинации является рекон. Рекомбинация генов имеет большое биологическое значение в плане эволюционных преобразований клеток и организмов, так как вследствие ее могут возникнуть такие сочетания генов, которые отсутствуют у родительских форм.

Рекомбинационная репарация – один из молекулярных механизмов репарации, имеющих место при рекомбинации по типу «разрыв-соединение», – образование нативной молекулы ДНК путем обмена ее поврежденного сегмента на неповрежденный в процессе рекомбинации между 2 молекулами.

Рентгеноструктурный анализ – один из важных методов исследования молекулярной организации клеток, основанный на использовании явления дифракции (огнивания) рентгеновых лучей при пропускании их через объект. В зависимости от характера расположения молекул в пространственной решетке объекта на фотопластинке возникает изображение концентрических колец и дуг, по ширине которых и расстоянию между ними определяют размеры и расположение молекул. На основе рентгеноструктурного анализа предложена схема строения молекулы ДНК.

Ренатурация – восстановление нативной (биологически активной) пространственной структуры биополимера (белка или нуклеиновой кислоты); в частности, Р. ДНК (после денатурации нагреванием) может происходить при медленном охлаждении, что используется для получения гибридных гетеродуплексов.

Репаративная репликация – этап эксцизионной репарации, в процессе которого происходит застройка образовавшихся брешей, осуществляемая в соответствии с принципами репликации ДНК с участием ДНК-полимеразы I.

Репаративные ферменты – набор специфических ферментов клетки, участвующих в процессе репарации; к Р.Ф. относятся нуклеазы (например, кодируемые у E.coli генами *uvrA* и *uvrB* и вырезающие поврежденные участки ДНК), ДНК-полимераза I, фотореактивирующий фермент – дезоксирибопиримидинфототиаза (кодируется у E.coli геном *phr*), участвующий в фотореактивации, а также ряд др. менее специфических для репарации ферментов – например, ДНКлигаза.

Репарация, репаративный синтез – восстановление нативной первичной структуры молекулы ДНК (т.е. исправление повреждений, спонтанно возникающих в процессе репликации и рекомбинации или вызванных действием внешних факторов); различают фотореактивацию, эксцизионную и пострепликативную Р.; Р. осуществляется с помощью набора специфических репаративных ферментов; дефектность Р. ДНК наблюдается при некоторых наследственных заболеваниях человека – пигментной ксеродерме, атаксии-телангиэктазии, анемии Фанкони, трихотриодистрофии и др.

Репликация — процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот, сопровождающийся передачей точных копий генетической информации в ряду поколений. Термин Р. в основном используется для определения процесса синтеза новой нити ДНК на матричной нити ДНК с целью точного копирования информации,

содержащейся в геноме. Р. ДНК является полуконсервативной. Основные стадии этого процесса включают разделение нитей ДНК с образованием репликативной вилки, связывание ДНК-полимеразы и добавление комплементарных нуклеотидов начиная с 3'-конца. Нить, непрерывно реплицирующаяся (ведущая цепь, лидирующая цепь нить), должна отделяться от др. (запаздывающей) нити, которая реплицируется прерывисто, короткими кусками (фрагменты Оказаки). После синтеза фрагменты Оказаки лигируются (с участием ДНК-лигазы), образуя целую запаздывающую нить.

Репликация по типу «Катающиеся кольцо» - способ репликации, при котором репликационная вилка совершает множество оборотов на циркулярной матрице; синтезирующаяся в каждом цикле цепь ДНК вытесняет цепь, синтезированную в предыдущем цикле, образуя хвост, состоящий из линейного набора последовательностей, комплементарных одноцепочечному матричному кольцу.

Репликон – автономная единица репликации, находящаяся под контролем одной точки инициации репликации (репликатора); у прокариот Р. представлен всем геномом, а у эукариот геном может включать множество Р.; термин «Р.» предложен Ф. Жакобом и С. Бреннером в 1963.

Реплицирующийся участок – участок ДНК (репликон), проходящий процесс репликации в определенный момент времени; ввиду значительной десинхронизации процесса репликации у эукариот распределение Р.У. оказывается видо- и хромосомоспецифичным, что было продемонстрировано, в частности, для генома человека В. Шмидом в 1963.

Репрессор – (от лат. *repressio* – подавление) – белок, кодируемый геном-регулятором, способный блокировать действие функционирующего гена-оперона, что приводит к снижению уровня синтеза белков. При связывании репрессора метаболитами, называемыми эффекторами, синтез белков вновь активизируется.

Репортерный ген (*reporter gene*) — ген, хорошо изученный генетически и биохимически, который легко может быть сшит с регуляторной областью др. генов. Его активность в норме не обнаруживается в организме, в который этот ген переносится. Активность большинства Р. г. можно легко протестировать достаточно простыми методами (напр., определением ферментативной активности белкового продукта для галактозидазы, β -глюкуронидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы и др.).

Рестриктазы — ферменты рестрикции, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым сайтами рестрикции (см.). Р. могут кодироваться не только геномом бактерий, но также плазмидами и бактериофагами. Являются одним из главных инструментов генной инженерии, широко используются для получения рекомбинантных ДНК(см.). Синоним – рестрикционные эндонуклеазы.

Ретротранспозоны – группа мобильных генетических элементов, перемещение которых осуществляется с использованием механизма обратной транскрипции (при участии обратной транскриптазы); к Р. относятся мобильные диспергированные гены дрозофил, Ту-элемент дрожжей и др.

Рецептор – локализованный в плазматической мембране трансмембранный белок, способный связываться с лигандом на наружной стороне мембраны и, тем самым, вызывать изменение активности на стороне, обращенной к цитоплазме. Часто используется для обозначения участка молекулы, который делает возможным связывание лигандов.

Реципиентный организм, реципиент — 1. Любая клетка или организм, получающий: а) новую генетическую информацию в форме чужеродной ДНК или РНК; б) к.-л. биологический материал от др. организма-донора. 2. Клетка, принимающая гене-

тический материал при трансдукции и конъюгации.

Ровные (тупые) концы — термин, относящийся к двухцепочечным фрагментам ДНК у которых ни одна нить на концевых участках не выступает за другую в отличие от липких концов (см.). Р.к. образуются в результате действия рестриктаз (рестрикционных эндонуклеаз) *Alu I*, *Ecor V*, *Hpa I*, *Nac I*, *Pvu II*, *Sma I* и др., а также путем удаления одностранных концов с помощью S1-нуклеазы или достройки их с помощью ДНК-полимеразы I.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — чаще всего одностранный полинуклеотид, характеризующийся наличием в нем сахара рибозы и урацила (вместо дезоксирибозы и тимина в ДНК). Обеспечивает передачу генетической информации (информационная иРНК и транспортная тРНК), служит в качестве структурного каркаса для рибосом (рибосомная рРНК) и выполняет ферментативные функции (рибозимы). Около 90% всей клеточной РНК составляет рРНК, около 8% составляет тРНК, а на долю иРНК приходится менее 2%. У эукариот молекулы РНК, как правило, транскрибируются в виде больших молекул (предшественников про-РНК), а затем путем сплайсинга и др. посттранскрипционных модификаций преобразуются в активные (зрелые) формы, имеющие меньшие (иногда существенно) размеры. У про- и эукариот функции РНК сильно различаются. У многих вирусов вся генетическая информация вместо ДНК содержится в одно- и двустранных РНК.

Рибосома — органоид клетки, с помощью которого осуществляется биосинтез белка. Р. представляет собой асимметричную рибонуклеопротеидную частицу диаметром 10—20 μm , которая состоит из двух субъединиц и обладающая каталитической функцией, ответственной за образование пептидных связей, т. е. за полимеризацию аминокислотных остатков в полипептидную цепь белка. При связывании Р. с иРНК начинается синтез полипептидов. Малая субъединица содержит единственную цепь рРНК (16S — у прокариот, хлоропластов и растений, 18S рРНК — у животных), ассоциированную с рибосомным белком (S-белки), которая связывается с иРНК. Крупная субъединица является комплексом единственной большой цепи рРНК (23S рРНК — у прокариот, 25S — у растений и митохондрий, 28S — у животных), одной или двух малых рРНК (5S — у прокариот, 5S и 5,8S — у эукариот) и рибосомных L-белков. Этот комплекс несет сайт для присоединения 2—3 молекул тРНК.

РНК-затравка — олигорибонуклеотид, синтезируемый с участием РНК-полимеразы (см) или ДНК-праймазы (см): с 5'-конца РНК-3. с участием ДНК-полимеразы III инициируется синтез новой молекулы ДНК (или фрагмента Оказаки), после чего РНК-3. отщепляется, образуемая брешь одновременно застраивается ДНК-полимеразой I, а одноцепочечные разрывы репарируются ДНК-лигазой.

РНК-полимераза, РНК-синтетаза — фермент, осуществляющий матричный синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов; в зависимости от используемой матрицы — ДНК или РНК — различают ДНК-зависимую и РНК-зависимую РНК-П.; у прокариот имеется 2 типа РНК-П.: одна из них синтезирует РНК-затравки для фрагментов Оказаки, а другая — все остальные типы РНК; у эукариот — 3 типа РНК-П.: РНК-П. I осуществляет синтез рРНК, РНК-П. II синтезирует мРНК, а РНК-П. III — тРНК, 5S-РНК и др. небольшие РНК; активность РНК-П. может полностью подавляться некоторыми антибиотиками — например, рифамицином и актиномицином D (бактериальная РНК-п.), альфа-аманитином (РНК-П. II прокариот).

Ро-зависимый терминатор — терминатор (последовательность нуклеотидов, обеспечивающая терминацию транскрипции), для нормального функционирования которого необходимо присутствие ро-фактора.

Ро-независимый терминатор – терминатор, функционирующий в отсутствие ро-фактора; характерной особенностью структуры Р.-Н.Т. является наличие ГЦ-богатого участка с центральной симметрией, предшествующего кластеру из 4–8 адениловых нуклеотидов в значащей цепи.

Ро-фактор, фактор терминации – белок E.coli, необходимый для осуществления терминации транскрипции на ро-зависимых терминаторах; Р.-Ф. в активной форме – тетрамер с молекулярной массой 55 кД; *in vitro* Р.-Ф. в каталитических количествах функционирует как фактор терминации, а также обладает РНК-зависимой АТ-Фазной (ГТФазной) активностью, необходимой для его функционирования.

Ras-белки – регуляторные мембраносвязанные G-белки, состоящие из 189 аминокислотных остатков. Они осуществляют один из первых этапов передачи сигнала извне клетки и, как правило, регулируют размножение клеток. В соответствии с характером посттрансляционной модификации имеется три изоформы Ras: N, H и K. Некоторые мутации могут приводить к постоянной активации Ras, что нарушает регуляцию деления клеток. Ошибки в регуляции Ras могут привести к росту опухоли и метастазированию.

Ras/MAPK-путь – сложный разветвленный путь внутриклеточной передачи сигнала у эукариот. На этом пути сигнал от тирозинкиназного рецептора передается через ряд белковых посредников, ключевым из которых является белок Ras, на митогенактивируемые протеинкиназы (MAPK), которые последовательно активируя друг друга (Raf-МЕК-ERK) путем фосфорилирования в конечном итоге фосфорилируют транскрипционные факторы, поступающие в ядро. Следствием этого является изменение генной экспрессии, увеличение роста и дифференцировки клеток.

Raf-белки – это серин/треониновые киназы, активируемые с помощью Ras-белков. Состоят из двух доменов, из которых С-терминальный является каталитическим. Известны три изоформы Raf – А, В и С. Каждая изоформа различается по активности. Raf путем фосфорилирования активирует одну из цитоплазматических MAPK – МЕК – серин/треониновую киназу (прежде известную как MAP киназа киназы, MAPKK). Далее следует каскад последовательной активации протеинкиназ. Непосредственно МЕК или другие MAPK фосфорилируют факторы, поступающие в ядро.

С

Сайленсер (англ. silencer) — последовательность ДНК, с которой связываются белки-репрессоры (факторы транскрипции). Связывание белков-репрессоров с сайленсерами приводит к понижению или к полному подавлению синтеза РНК ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Сайленсеры могут находиться на расстоянии до 2500 пар нуклеотидов от промотора.

Сайт клонирования — место (сайт) расщепления ДНК определенной рестриктазой в векторе клонирования, которое локализовано в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде в процессе клонирования (см.).

Сайт узнавания — специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Для каждой рестриктазы имеется собственная специфическая последовательность узнавания. Обычно С. у. представлен коротким палиндромом.

Самостоятельная репликация — способность ряда внехромосомных генети-

ческих элементов (плазмид) к автономной репликации.

Сателлитная ДНК – избыточная геномная ДНК, как правило, резко отличающаяся смещением соотношения А+Т/Г+Ц (в сторону А+Т – «легкая» сатДНК; в сторону Г+Ц – «тяжелая» сатДНК) от др. участков ДНК, содержащаяся в значительном (105 и более) числе повторов и, соответственно, ренатурирующая намного быстрее уникальных последовательностей; С.ДНК может быть выделена при центрифугировании в градиенте плотности хлорида цезия в виде добавочной («сателлитной») по отношению к основным фракциям; как правило, С.ДНК локализована в центромерах и реже – теломерах хромосом и входит в состав гетерохроматина.

Саузерн-блот анализ — анализ молекул ДНК и их фрагментов при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну.

Саузерн-блот гибридизация — метод, позволяющий идентифицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, денатурируются до одноцепочечных молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры. Далее мембрана помещается в гибридизационный буфер, содержащий специальный радиоактивно меченный ДНК-зонд – короткую специфическую последовательность ДНК. Зонд способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом, прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (авторадиограмме) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Метод разработан Э. Саузерном и Р. Дейвисом в 1975 г.

Светящиеся фракции ДНК — двунитчатые фракции ДНК в агарозном или полиакриламидном геле, окрашенные красителем этидий бромидом, в комплексе с которым приобретают малиновую окраску при УФ освещении.

Секвенирование ДНК (DNA sequencing) — метод определения последовательности оснований в молекуле ДНК. Существует несколько методов секвенирования: автоматическое, химическое, прямое, секвенирование по Максаму-Гилберту, Сэнгеру и др.

Секвенирование ДНК по Максаму-Гилберту, химический метод (Maxam-Gilbert sequencing or chemical s.) — один из наиболее распространенных методов определения первичной последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК. Вначале ДНК режется на фрагменты размером 0,6—2,0 кб, концы фрагментов метятся радиоактивной или нерадиоактивной меткой и плавятся для получения одонитчатых молекул. Радиоактивное мечение может осуществляться изотопами серы ^{35}S или фосфора ^{32}P , нерадиоактивное мечение — с помощью биотиновой или флуоресцентной метки. После мечения образец ДНК разделяется на 4 части, каждую из которых обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается набор 5'-меченых фрагментов, длины кото-

рых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, полученные в результате 4 типов реакции, подвергаются электрофорезу (см.) в полиакриламидном геле, и затем полосы выявляются соответствующим методом в зависимости от способа мечения. На основе результатов электрофореза определяются нуклеотиды и их последовательность в исходной ДНК.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру, ферментативный метод (*Sanger sequencing or enzymatic method s.*) — техника секвенирования (см.) однонитчатой ДНК. В основе метода — присоединение к однонитчатой ДНК-матрицы секвенирующего праймера (см.) (обычно синтетических олигонуклеотидов). Реакционная смесь переносится в 4 пробирки, куда добавляются все 4 дезоксинуклеозидтрифосфата, один из которых мечен по ^{32}P . Каждая пробирка содержит также различные дидезоксинуклеозидтрифосфаты (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ и ддТТФ). Для синтеза комплементарной цепи к однонитчатой последовательности-матрицы в пробирки добавляется фермент ДНК-полимераза (см.). В результате происходит удлинение праймера в соответствии с матричной последовательностью. Когда в растущую цепь вместо соответствующего дНТФ в матрице включается ддНТФ, 3'-конец растущей цепи теряет гидроксильную группу и не может дальше удлиняться: цепь терминируется. В итоге каждая реакционная смесь получит набор радиоактивно меченных фрагментов ДНК с общим 5'-концом (праймер), но с разными 3'-концами. После окончания реакции ДНК денатурируется, затем подвергается электрофорезу в полиакриламидном геле (см. Секвенирующий гель) и с помощью радиоавтографии (см.) выявляются радиоактивные полосы. Последовательность нуклеотидов в исходной ДНК-матрице может затем прочитываться прямо с радиоавтограммы.

Скрининг — поиск в геной библиотеке клонов конкретной колонии, содержащей нужный фрагмент чужеродной ДНК.

Секреция — транспортировка молекулы из клетки через клеточную мембрану.

σ -фактор — субъединица прокариотической РНК-полимеразы, отвечающая за инициацию транскрипции с определенных иницирующих последовательностей.

Сигнальный пептид — участок из 15-30 аминокислотных остатков на N-конце белка, который, как полагают, участвует в секреции (прохождении через клеточную мембрану) белка. После выделения белка из клетки сигнальный пептид удаляется.

SOS-ответ — синтез полного набора белков, обеспечивающих репарацию, рекомбинацию и репликацию у бактерий, получивших серьезные повреждения ДНК (например, в результате облучения УФ светом).

Спейсер — нетранскрибируемый участок молекулы ДНК, разделяющий повторяющиеся транскрибируемые элементы геного кластера; обычно С. высокоизменчивы как по размерам (в кластерах генов рРНК), так и по нуклеотидному составу в отличие от консервативных транскрибируемых участков (генов); также С. — любой нетранскрибируемый участок ДНК, разделяющий активные гены (обычно его размер 5–10 нуклеотидных пар); иногда С. может транскрибироваться.

Сплайсинг — форма процессинга предшественников мРНК у эукариот; в результате С. происходит удаление из молекулы-предшественника последовательностей интронов и ковалентное соединение последовательностей экзонов с образованием зрелых молекул мРНК.

Сплайсома — рибонуклеопротеиновая структура, ассоциированная с ядерным скелетом, способная автономно (как *in vitro*, так и *in vivo*) обеспечивать процесс сплайсинга предшественников мРНК.

Стоп-кодон, нонсенс-к., терминатор — тринуклеотид в иРНК, сигнализирую-

щий об окончании синтеза полипептида и освобождении полной полипептидной цепи от рибосомы (см.). Существует три различных типа С.-к.: УАГ (амбер), УГА (опал) и УАА (охра). Ни один из них не соответствует антикодону тРНК.

Т

Tag-полимераза, Tag-ДНК-полимераза (*Tag polymerase or Tag DNA p*) — фермент из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus*, осуществляющий полимеризацию дезоксирибонуклеотидов. Фермент исключительно термостабилен (оптимум температуры 70-75 °С) и обеспечивает выборочную амплификацию (см.) любой клонированной ДНК до 10 млн. раз с высокой точностью методом т. н. полимеразной цепной реакции (см. ПЦР).

Таблица (словарь) генетических кодов, словарь кодонов (*genetic code table (dictionary)*) — таблица, включающая генетические значения отдельных кодонов (см.), или триплетов (см.), соответственно продуктам их функционирования. Содержит 64 кодона, из которых 61 смысловой т.е. каждый из них кодирует конкретную аминокислоту и 3 стоп-кодона (см.), или нонсенс-кодона, которые сигнализируют об окончании синтеза полипептида и освобождении полипептидной цепи от рибосомы (см.).

Тандемный повтор (*tandem repeat*) — множественные копии одинаковых последовательностей ДНК, расположенных одна за другой и ориентированных в одном направлении, например, (ААТАТ)_n, (ААТАГ)_n др. Тандемные повторы встречаются в кодирующих и некодирующих участках. Они варьируют по длине кластера и размеру повторяющегося звена.

Темновая (темновая эксцизионная, эксцизионная) репарация — одна из форм пререпликативной репарации, не нуждающаяся (в отличие от фотореактивации) в энергии видимого света, осуществляется по механизму «вырезай-и-латай»; Т.Р. хорошо изучена у бактерий, но известна также у фагов с двухцепочечной ДНК и у эукариот; в частности, у *E.coli* нуклеазы *uvrA* и *uvrB* распознают участки ДНК с нарушенной структурой, обеспечивая затем начальный этап Т.Р. (вырезание поврежденного участка); впервые Т.Р. была описана у бактерий Р. Сетлоу и У. Карьером в 1964.

Теломера — концевой участок хромосомы, иногда богатый гетерохроматином, играющим роль в сохранении целостности хромосомы за счет предотвращения слияния Т.; при концевых делециях возможно спонтанное «залечивание» Т. порциями гетерохроматина, локализованными в др. участках генома.

Теломераза — фермент группы трансфераз, контролирующий размер, количество и нуклеотидный состав теломер хромосом; впервые Т. была выделена у инфузории *Tetrahymena thermophila*, у которой в макронуклеусе может содержаться несколько десятков тыс. теломер, Т. представляет собой сложный рибонуклеопротеиновый комплекс (РНК, содержащая 159 нуклеотидов, является матрицей для синтеза мотива ТТТГГГ, до 100 повторов которого содержится в каждой теломере) с молекулярной массой около 500 кД.

Теломерная последовательность (повтор) — последовательность нуклеотидов, специфичная для концевых участков ДНК (хромосом), как правило, представленная многочисленными повторами олигонуклеотидов и необходимая для завершения репликации концевых последовательностей хромосом, а также, вероятно, играющая защитную роль; в частности, у позвоночных высококонсервативной является Т.П. (ТТАГГГ)_n, выявлена в теломерах всех хромосом более чем у 100 видов из основных классов — рыбы, амфибии, рептилии, птицы, млекопитающие; впервые Т.П. были описаны у инфузории *Tetrahymena pyriformis* (по 30–70 повторов гексануклеотида

ААЦЦЦ) Э. Блэберном и Дж. Галлом в 1978.

Температура плавления – одна из основных характеристик данной молекулы ДНК (или гибридного ДНК/РНК-дуплекса) – температура, при которой происходит диссоциация 50% двойной спирали, специфична для ДНК данного вида организмов, т.к. зависит от нуклеотидного состава и ее общих размеров; T_m отражает АТ/ГЦ-соотношение в молекуле нуклеиновой кислоты, т.к. пара Г-Ц имеет 3 водородные связи (А-Т – 2) и взаимодействие между нуклеотидами этой пары более сильное, – соответственно.

Тимин [Т, thymine, лат. *thymus* – вилочковая железа и *-in(e)* – суффикс, обозначающий «подобный»] – пиримидиновое основание, 5-метилурацил. Тимин. содержится во всех живых клетках в составе ДНК и транспортных РНК; структурный компонент некоторых коферментов углеводного обмена. В ДНК тимин. комплементарен аденину, образуя с ним 2 водородные связи.

Тирозиновые протеинкиназы — ферменты, которые переносят фосфатную группу от АТФ на остаток аминокислоты тирозина в белке. Большинство тирозиновых киназ имеют сопряженные тирозинфосфатазы. Тирозиновые киназы классифицируют на две группы: цитоплазматические и трансмембранные (связанные с рецептором).

Точка начала репликации – участок репликона (реплицирующегося участка ДНК), в котором происходит инициация репликации.

Точка окончания репликации – участок реплицирующегося участка ДНК, в котором происходит терминация репликации.

Точка рекомбинации – точка соединения двух рекомбинирующих двухцепочечных молекул ДНК

Точка рестрикции (точка R) – наиболее чувствительная точка фазы G1 клеточного цикла. Дойдя до точки рестрикции, клетки обычно перестают делиться, пока не получат сигнала, побуждающего их вступить в следующую фазу. В точке рестрикции происходит торможение роста клеток при неблагоприятных условиях, например при увеличении их плотности или при голодании. В этом случае клетка может остановиться и выйти из цикла в фазу G0.

Транскрибирующийся спейсер – участок кластера рибосомной ДНК, разделяющий гены двух высокомолекулярных рРНК; Т.С. вырезается в процессе созревания собственно рРНК; у некоторых организмов (бактерии и др.) в состав Т.С. может входить кодирующая последовательность, детерминирующая низкомолекулярную рРНК (5,8S).

Транскрипция — синтез молекул РНК на ДНК- или РНК-матрице, осуществляемый ДНК-зависимой или РНК-зависимой РНК-полимеразой. Т. — первый этап реализации генетической информации, записанной в ДНК, осуществляемый с участием фермента РНК-полимеразы у прокариот и не менее 3 типов РНК-полимераз, транскрибирующих гены у эукариот.

Трансляция — синтез белка (полипептидной цепи) на рибосомах с использованием в качестве матрицы мРНК. Т. состоит из этапов инициации, реакций аминоацилирования молекул тРНК, элонгации (удлинения) полипептидных цепей и терминации синтеза. Процесс Т. начинается с того, что 5'-лидирующий конец мРНК связывается с рибосомой. Затем мРНК движется через рибосому и служит матрицей для построения полипептидной цепи. Доставку аминокислот на рибосомы к месту синтеза белка осуществляют тРНК. Каждая тРНК присоединяется своим антикодоном к соответствующему кодону мРНК, определяя последовательность аминокислот в полипеп-

тидной цепи. Синтез полипептидной цепи начинается с аминоконца (N-конец) и заканчивается карбоксильным концом (C-конец). Изменение скорости трансляции мРНК регулирует экспрессию генов.

Транспозаза – фермент, участвующий в начальных этапах транспозиции некоторых мобильных генетических элементов (МГЭ), например, бактериального Tn3 или Ac в системе активации-диссоциации; ген T., как и фермент резольваза, входит в состав самого МГЭ.

Транспозон, транспозабельный элемент, мобильный э. (*transposon, Tn or transposable element or mobile e.*) – участок ДНК, способный изменять свое положение в пределах генома. Т. фланкируются короткими инвертированными повторами и кодируют ферменты, которые обеспечивают вырезание, перенос и вставку в новое место. Т. могут быть использованы для конструирования векторов клонирования, для транспозонного мутагенеза и транспозонного мечения. Известно большое количество различных Т (Р-элемент дрозофилы, транспозабельные элементы кукурузы и др.)

Транспозиция: Процесс, при котором транспозон или инсерционная последовательность встраиваются в новый сайт той же самой или другой молекулы ДНК. Различные транспозоны могут перемещаться с помощью различных механизмов, и точный механизм транспозиции еще не полностью известен. Транспозиция у бактерий не требует наличия протяженных участков гомологии между транспозоном и ДНК-мишенью.

Транспортная РНК (т-РНК) — низкомолекулярная РНК (содержит 75-90 нуклеотидов), обеспечивающая перенос аминокислот к рибосомам (см.) для включения их в белки. т-РНК имеют специфическую вторичную структуру в виде “листа клевера”, антикодон расположен в антикодонной петле, а на 5'-конце всегда находится гуанин (G). Аминокислоты присоединяются к 3'-концу последовательности ССА в тРНК в результате реакции аминоацилирования. Модель “листа клевера” для вторичной структуры тРНК предложена Р. Холли с сотр. в 1965 г.

Транс-сплайсинг – процесс соединения в одной молекуле мРНК последовательностей экзонов разных генов; Т.-С. впервые обнаружен *in vitro* и заключается в соединении комплементарных участков интронных областей 2 процессируемых молекул РНК в Х-образную фигуру с последующим сплайсингом пар экзонов от разных исходных молекул; Т.-С., вероятно, имеет место при «перемешивании» экзонов, а также при образовании некоторых зрелых мРНК у трипанозом.

Трансферазы – класс ферментов (в классификации ферментов первая цифра – 2), катализирующих обратимые процессы переноса различных групп атомов (например, аминные, ацильные, фосфатные и др.) от одних молекул к другим; разделение на подклассы – в зависимости от структуры переносимой группы; известно около 450 Т.

Трансформация — 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки при помощи изолированной ДНК с участием или без участия плазмид (см.), но всегда без участия вирусов. 2. Направленная модификация генома клетки с помощью очищенной или рекомбинантной ДНК из клетки др. генотипа, которая включается в геном модифицируемой клетки. 3. Изменение морфологии клетки или др. ее характеристик (напр., неопластического роста и др.), происходящее после интеграции нуклеиновой кислоты от онкогенных вирусов в клеточный геном, после воздействия химическими канцерогенами или спонтанно (онкогенная Т.). 4. Изменение наследственных свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые обнаружена в 1928 г. у пневмококков Ф. Гриффитом.

Трансгенные организмы — организмы, в наследственные структуры которых

искусственно введён хотя бы один активно функционирующий ген от другого организма.

Трансформированные организмы — организмы с изменёнными наследственными свойствами в результате проникновения в них чужеродной ДНК.

Триплет — комбинация из трех последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле ДНК или РНК, кодирующих 1 аминокислоту (см. Кодон).

У

Убиквитин — небольшой белок, присутствующий во всех эукариотических клетках, роль которого состоит в маркировании тех белков, которые предназначены для протеолитического расщепления (так как они повреждены или больше не нужны клетке).

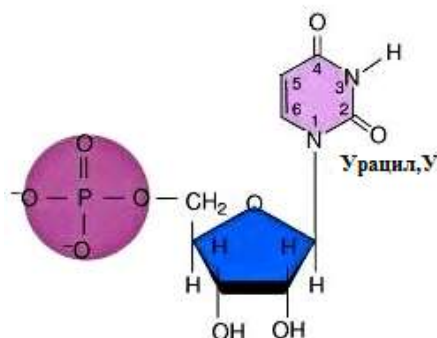
Уникальные (неповторяющиеся) последовательности ДНК (*non-repetitious DNA sequences*) — участки молекулы ДНК, присутствующие в данном геноме в одной копии (редко в нескольких, но обычно не более 10); большинство структурных генов (за исключением тех, которые составляют мультигенные семейства) представлено **У. п.**

Умеренно повторяющаяся ДНК — нуклеотидная последовательность (длиной в 100–500 нуклеотидных пар), повторяющаяся в геноме 10–100 раз; У.П. ДНК обнаруживается в составе гетерохроматина, к ней относятся гены рРНК и тРНК животных, некоторые др., мультигенные семейства, а также мобильные генетические элементы различной природы.

Упаковка ДНК — совокупность процессов спирализации и самоукладки двухцепочечной молекулы ДНК, ведущих к резкому сокращению ее абсолютной длины; эффективность У. оценивается по индексу упаковки.

Урацил (2,4-диоксопиримидин) — пиримидиновое основание, которое является компонентом рибонуклеиновых кислот и как правило отсутствует в ДНК, входит в состав нуклеотида. В составе нуклеиновых кислот может комплементарно связываться с аденином, образуя две водородные связи.

Уридин 5'-монофосфат (UMF) — нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пиримидинового азотистого основания урацила.



Участок расщепления — см. Сайт рестрикции.

Участок узнавания — см. Сайт узнавания.

Ф

Факторы роста — это соединения, способные стимулировать рост, пролифера-

цию и/или дифференцировку живых клеток. Как правило, это пептидные или стероидные гормоны. Факторы роста функционируют как сигнальные молекулы для взаимодействия между клетками. Примерами являются цитокины и гормоны, связываемые специфическими клеточными рецепторами.

Факторы транскрипции — вспомогательные белки, облегчающие РНК-полимеразам прохождение основных этапов транскрипции (инициацию, элонгацию и терминацию), а также обеспечивающие избирательный характер транскрипции (например, тканеспецифичную экспрессию генов путем взаимодействия с энхансерами).

Фактор элонгации (Ef-G – у прокариот) — крупный белок, обеспечивающий акт перемещения рибосомы во время трансляции: Ф.Э. взаимодействует с ГТФ (гуанозинтрифосфат) и с рибосомой, что сопровождается появлением ГТФазной активности, перемещением и расщеплением ГТФ, при этом гидролиз ГТФ не требуется непосредственно для осуществления перемещения рибосомы, после завершения которого Ф.Э. освобождается из комплекса с рибосомой; молекулярная масса Ф.Э. *E.coli* 77444 Д; число молекул Ф.Э., содержащихся в клетке, примерно равно числу рибосом.

Фактор IF2 — главный фактор инициации трансляции у прокариот — крупный белок кислой природы с молекулярной массой 100 кД (IF2a) или 90 кД (IF2b), в комплексе с ГТФ взаимодействует с формилметионин-тРНК и 30S-субчастицей рибосом, способствуя связыванию мРНК.

Ферменты — вещества белковой природы, присутствующие во всех живых клетках, направляющие, регулирующие и многократно ускоряющие биохимические процессы в них; играют важнейшую роль в метаболизме.

Фингерпринт ДНК (DNA fingerprint) — высокоспецифичные гибридизационные полосы на электрофореграммах (фингерпринт), образующиеся как результат полиморфизма длины рестрикционных фрагментов геномной ДНК (ПДРФ, см.). Причиной такого полиморфизма могут быть мутации в пределах сайта рестрикции (см.), повторы ДНК (мини- и микросателлиты) и др.

Фланкирующая последовательность ДНК — характеризует любую нуклеотидную последовательность, расположенную рядом («по соседству», «на фланге») с другой последовательностью; различают 5'- и 3'-фланкирующие последовательности ДНК, т.е. прилегающие к основной последовательности соответственно с 5'- и 3'-конца полинуклеотидной цепи.

Фосфорилирование — катализируемый ферментами процесс переноса остатка фосфорной кислоты от фосфорилирующего агента-донора к субстрату, ведущий к образованию сложных эфиров фосфорной кислоты. В живых клетках фосфорилирование — один из наиболее распространённых видов посттрансляционной модификации белка. Процессы фосфорилирования и дефосфорилирования различных субстратов являются одними из важнейших биохимических реакций. Они катализируются особыми ферментами, выделяемыми в особый класс киназ, или иначе фосфотрансфераз.

Фрагменты Оказаки — относительно небольшие (у *E.coli* — 1–2 тыс., а у млекопитающих — около 100 нуклеотидных пар) фрагменты синтезируемой молекулы ДНК в «отстающей цепи» репликативной вилки (в направлении 5' 3'); сшивание (лигирование) Ф.О. происходит с участием ДНК-лигазы, инициация синтеза Ф.О. происходит с использованием РНК-затравок, образующихся в результате действия праймазы; Ф.О. были описаны Р. Оказаки с сотр. в 1968.

Фракции, гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом — часть молекул ДНК, которые после электрофоретического фракционирования комплемен-

тарно связались с радиоактивным зондом в процессе Саузерн-блот гибридизации.

Фóлдинг белка (укладка белка, от англ. folding) - процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру (так называемая третичная структура).

Х

X-Gal — специальный субстрат, который расщепляется ферментом β -галактозидазой (продукт гена *lac-Z*) (см.) с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Широко используется в генной инженерии для детекции (выявления) бактериальных колоний содержащих плазмиды со встроенной чужеродной ДНК.

Химерные плазмиды — плазмиды, содержащие вставку (фрагмент) чужеродной ДНК.

Хроматиды – (от греч. chroma – цвет и eidos – подобный) – продольные половинки хромосом, состоящие, в свою очередь, из хромонем. В последних различают хромофибриллы, содержащие ДНК. Хроматиды в качестве составной части хромосом выступают в период профазы и метафазы митоза. Позднее во время анафазы после расщепления хромосом на хроматиды каждая хроматида становится самостоятельным образованием и обозначается уже как дочерняя или сестринская хромосома. Термин «хроматида» предложен Мак Клунгом (1900).

Хроматин – (от греч. chroma – цвет) – сильно окрашивающееся основными красителями вещество клеточного ядра. Термин «хроматин» введен в литературу Флеммингом (1880).

Хромосома – нуклеопротеидная структура в ядре эукариотической клетки, в которой сосредоточена бóльшая часть наследственной информации и которая предназначена для её хранения, реализации и передачи. Хромосомы чётко различимы в световом микроскопе только в период митотического или мейотического деления клетки. Набор всех хромосом клетки, называемый кариотипом, является видоспецифичным признаком. В диплоидной клетке человека 46 хромосом, что составляет 6 пг ДНК. Общая длина гаплоидного набора (23 хромосом) составляет $3,2 \times 10^9$ пар нуклеотид. Истинное количество структурных генов составляет от 30-40 тысяч. В интерфазной клетке хромосомы представлены хроматином. При световой микроскопии хромосомы наблюдаются в митозе (митотические хромосомы).

Хромосомная библиотека (chromosome specific library) — один из видов геномной библиотеки (см.), используемый для анализа геномов больших размеров, напр. человека. Х. б. создают клонированием (см.) фрагментов ДНК индивидуальных гомологичных хромосом.

Ц

Циклический аденозин монофосфат (цАМФ) – молекула-«мессенджер», регулирующая многие внутриклеточные реакции; участвует в молекулярных механизмах действия многих гормонов, передачи нервного возбуждения, мышечного сокращения и др.

Циклины – семейство белков-активаторов ферментов циклин-зависимых киназ (CDK). Без циклина CDK не активна. Прохождение клеточного цикла достигается путем последовательной активации и инактивации разных комплексов циклин-CDK. Механизм действия комплексов циклин-CDK заключается в присоединении

фосфатной группировки (фосфорилировании) к белкам-мишеням. Основным результатом каскада сигнальных событий, происходящих вследствие связывания ростового фактора с рецептором на поверхности клетки, является активация комплекса циклин D-CDK4 и/или циклин D-CDK6. Комплексы циклин D-CDK4 и/или циклин D-CDK6 работают в течение фаз G_1 , S и G_2 и в начале митоза. Этот комплекс фосфорилирует различные транскрипционные факторы белковой природы, необходимые для вступления клетки в S фазу. Также комплекс циклин D-CDK4/6 способствует синтезу циклина E.

Циклинзависимые киназы (англ. cyclin-dependent kinases, Cdk) — группа белков, регулируемых циклином и циклиноподобными молекулами. Большинство циклинзависимых киназ участвуют в смене фаз клеточного цикла; также они регулируют транскрипцию и процессинг мРНК. Циклинзависимые киназы являются серин/треониновыми киназами и фосфорилируют соответствующие аминокислотные остатки в белках.

Цинковый палец — ДНК-связывающий белок, содержащий участок с двумя близко расположенными остатками цистеина и двумя остатками гистидина, которые служат лигандами для одного иона Zn^{2+} . При связывании иона цинка структура изменяет конформацию, при этом аминокислотная цепочка выпячивается в виде пальца, что позволяет белку взаимодействовать с большой бороздкой ДНК

Цитидин 5'-монофосфат (СМФ) — нуклеотид молекулы РНК, состоящий из остатка фосфорной кислоты, углевода рибозы и пиримидинового азотистого основания цитозина.



Цитозин (Ц, cytosine) — пиримидиновое основание, 2-окси-4-амино-пиримидин. Цитозин содержится во всех живых клетках в составе ДНК и РНК, входит также в состав некоторых коферментов и антибиотиков. Метилирование цитозина в ДНК с превращением его в 5-метилцитозин является важным процессом в регуляции транскрипции генов (см. *Метилирование*).

Ч

Четвертичная структура белка — свойственная только полимерным (т.е. состоящим из двух и более полипептидных цепей) белкам форма пространственной организации, обусловленная различными вариантами взаиморасположения и взаимодействия отдельных полипептидных цепей.

Чужеродная ДНК — ДНК какого-либо организма по отношению к организму-реципиенту.

Ш

Шапероны — семейство белков, обеспечивающих *in vivo* правильную сборку и формирование трехмерной конформации полипептидов после их выхода с рибосом,

при этом шапероны не входят в состав конечной белковой структуры. Белки, выполняющие такие же функции у прокариот носят название шаперонинов. См: белки теплового шока.

Штамм — чистая культура микроорганизмов или вирусов данного вида, выделенная из определенного источника (почвы, воды, организма и т. п.) и обладающая особыми физиолого-биохимическими свойствами.

«Шпилька» — двухцепочечный участок одноцепочечной молекулы ДНК или РНК, образованный в результате комплементарных взаимодействий между соседними инвертированными последовательностями нуклеотидов.

Э

Экзоны (*exons*) — последовательности эукариотических генов, которые, как правило, сохраняются при процессинге про-иРНК и образуют зрелую матричную, или информационную РНК. Э., как правило, чередуются с нитронами (см.). Э. определяют три принципиально различные функции: а) функцию лидера: первый Э. содержит сигналы для инициации транскрипции (см.) и последовательности с функцией, управляющей присоединением матрицы к рибосомам (см.), и не транслируется (см. Трансляция) в белок; б) функции матрицы (информации); Э. содержат информацию, которая обеспечивает образование белка из отдельных аминокислот; в) терминирующие функции (см. Терминация): последний Э. включает последовательности, которые в зрелой иРНК являются сигналом для окончания трансляции, а также гомополимерное адениловое окончание (хвост) — поли(А) иРНК. Термин экзон предложен У. Гилбертом в 1978 г.

Экзонуклеаза — фермент, последовательно отщепляющий нуклеотиды от конца молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).

Эксцизионные ферменты — ферменты, участвующие в процессе эксцизионной репарации и обеспечивающие «вырезание» повреждений (нуклеаза, ДНК-гликозидаза) и последующее «латание» образующихся брешей (ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы).

Эксцизионная репарация — процессы репарации двухцепочечной ДНК, включающие удаление поврежденного или неправильного участка одной цепи ДНК и его замену новым, синтезированным по матрице комплементарной цепи ДНК.

Экспрессия гена — реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции (см.) и трансляции (см.) иРНК.

Электрофорез в агарозном геле — Метод разделения заряженных биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т. д.) в электрическом поле, базирующийся на их различии по электрическому заряду, форме и размеру. Молекулы мигрируют через инертный агарозный гель под действием электрического поля. Э. открыт Ф. Ф. Рейсом в 1807 г. В биологии Э. начал использовать А. Тизелиус, сконструировавший первый прибор для электрофоретического разделения белков в 30-е гг. XX в.

Электрофоретическая камера — часть прибора для проведения электрофореза. Различают вертикальную и горизонтальную Э.к.

Элонгация (*elongation*) — удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

Энхансер — специфическая цис-действующая последовательность нуклеотидов, многократно усиливающая транскрипцию генов РНК-полимеразой II; способность

ряда Э. взаимодействовать со специфическими белками в дифференцированных клетках обеспечивает тканеспецифичный характер экспрессии соответствующих генов; считается, что Э. является одной из форм мобильных генетических элементов; один из Э. – Spm-элемент.

Этидиум бромид (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиум бромид) – флуоресцирующий краситель (канцероген), который обладает способностью интеркалировать между парами оснований в двунитчатой ДНК и РНК. Комплекс нуклеиновой кислоты с Э. б. флуоресцирует под УФ светом. Используется для визуального обнаружения двунитчатых молекул ДНК в агарозном и полиакриламидном геле (см.) при флуоресцентном излучении в 590 нм. Э. б. позволяет производить количественную оценку содержания нуклеиновых кислот в препарате.

Эухроматин (*euchromatin*) — активный хроматин, не обнаруживаемый визуально на протяжении всей интерфазы вследствие низкой плотности его упаковки, содержит подавляющее большинство активно транскрибируемых генов, способен обратимо превращаться в факультативный гетерохроматин в процессе инактивации X-хромосомы.

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) – полипептид, состоящий из 53 аминокислотных остатков, стимулирующий деление эмбриональных тканей и эпителия. Образуется из трансмембранного белка-предшественника, содержащего 1168 аминокислотных остатков. Продуцируется слюнными железами, а также другими экзо- и эндокринными железами. Содержится в крови, секретах, моче.

Я

ЈАК-STAT-путь – простой путь внутриклеточной передачи сигнала с рецепторов цитокинов у эукариот, ключевыми компонентами которого являются киназа **ЈАК** и транскрипционный фактор **STAT** (англ. signal transducers and activators of transcription - передатчики сигнала и активаторы транскрипции).

2 ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

2.1 РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ

Занятие 1. СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Цель занятия: дать представление о строении и биологических функциях нуклеиновых кислот.

1. Химический состав нуклеиновых кислот.
2. Открытие двойной спирали ДНК.
3. Строение и свойства РНК.

Тематика рефератов

1. Доказательства роли ДНК в передаче наследственной информации: трансформация, трансдукция, конъюгация.
2. Митохондриальная и хлоропластная ДНК.

Вопросы для самоконтроля

1. Химическая организация нуклеиновых кислот: строение нуклеотидов.
2. Первичная структура ДНК.
3. Правила Э. Чаргаффа.
4. Модель ДНК Дж. Уотсона и Ф. Крика.
5. Особенности молекулярной организации РНК. Виды РНК. Функции РНК в клетке.

Задание 1. Дать характеристику пуриновым и пиримидиновым основаниям. Записать их химические формулы.

Задание 2. Соединить фосфодиэфирными связями нуклеотиды: а) аденозин и тимидин; б) уридин и гуанидин.

Задание 3. Укажите в строении и свойствах РНК основные отличия от ДНК.

Задание 4. Заполнить таблицу 1.

Таблица 1 - Сравнительная характеристика ДНК и РНК

Признаки	ДНК	РНК
Строение макромолекулы		
Мономеры		
Состав нуклеотида		
Локализация в клетке		
Функции		

Задание 5. Решите следующие задачи:

1. Вычислите количество молекул дезоксирибозы и остатков фосфорной кислоты в ДНК, если количество оснований цитозина было 1000, урацила - 500, гуанина - 600, аденина - 200.

2. Определите длину фрагмента ДНК (в нм), если он содержит 300 оснований гуанина, что составляет 15% от общего количества азотистых оснований.

3. В ДНК количество тимина составляет 18% от общего количества азотистых оснований. Каково количество (%) других оснований. Каково общее количество аденина, цитозина, гуанина в ДНК, если в ней 1620 тимидиновых нуклеотидов, которые составляют 24% от общего количества нуклеотидов.

4. Нуклеиновая кислота фага имеет относительную молекулярную массу порядка 107. Сколько, примерно, белков закодировано в ней, если принять, что типичный белок состоит в среднем из 400 мономеров, а молекулярная масса нуклеотида около 300?

Тест

1. Какой связью связаны в цепи НК нуклеотиды

- а) водородной
- б) фосфодиэфирной
- в) гидрофобной
- г) ковалентной

2. Модель вторичной структуры молекулы ДНК предложили:

- а) Шлейден и Шванн
- б) Мендель и Морган
- в) Уотсон и Крик
- г) Дарвин и Уоллес

3. Если цепь ДНК содержит 28 % нуклеотидов А, то чему должно равняться количество Г?

- а) 28 %
- б) 14 %
- в) 22 %
- г) 44 %.

4. Мономерами молекул нуклеиновых кислот являются:

- а) нуклеозиды
- б) нуклеотиды
- в) полинуклеотиды
- г) азотистые основания.

5. Молекула ДНК содержит азотистые основания:

- а) аденин, гуанин, урацил, цитозин
- б) цитозин, гуанин, аденин, тимин
- в) тимин, урацил, тимин, цитозин
- г) аденин, урацил, тимин, цитозин

6. К пуриновым азотистым основаниям, входящим в состав ДНК, относятся:

- а) аденин и тимин
- б) урацил и цитозин
- в) аденин и гуанин
- г) цитозин и тимин

7. В составе ДНК постоянным является соотношение нуклеотидов:

- а) $A+G/T+C$
- б) $A+T/G+C$
- в) $A+C/T+G$
- г) $A/G, T/C$.

8. Полинуклеотидная цепь при синтезе молекул ДНК и РНК образуется за счет связей между:

- а) остатками сахаров нуклеотидов
- б) остатками фосфорных кислот и сахаров нуклеотидов
- в) азотистыми основаниями и остатками сахаров нуклеотидов
- г) азотистыми основаниями и остатками фосфорных кислот нуклеотидов.

9. Число водородных связей, возникающих в комплементарной паре оснований аденин-тимин молекулы ДНК, равно:

- а) 1
- б) 2
- в) 3
- г) 4.

10. Полный оборот двойной спирали ДНК в В-форме приходится на:

- а) 5 пар нуклеотидов
- б) 10 пар нуклеотидов
- в) 15 пар нуклеотидов
- г) 20 пар нуклеотидов

11. Соединение двух полинуклеотидовых цепей в спирали ДНК осуществляется за счет связей:

- а) только ионных

- б) только водородных
- в) гидрофобных и ионных
- г) водородных и гидрофобных

12. Назовите нуклеиновую кислоту, которая имеет небольшой размер, и вторичная структура которой имеет три большие петли, что придает ей форму листа клевера.

- а) и-РНК
- б) ДНК
- в) т-РНК
- г) и-РНК4.

13. В каком случае верно указан состав нуклеотида ДНК?

- а) рибоза, остаток фосфорной кислоты, тимин
- б) фосфорная кислота, урацил, дезоксирибоза
- в) остаток фосфорной кислоты, дезоксирибоза, аденин
- г) рибоза, гуанин, остаток фосфорной кислоты.

14. В каком году была предложена модель вторичной структуры ДНК?

- а) 1953
- б) 1965
- в) 1924
- г) 1896.

15. Чем нуклеозид отличается от нуклеотида?

- а) отсутствием в составе пентозы
- б) отсутствием в составе остатка фосфорной кислоты
- в) отсутствием в составе азотистого основания.

Занятие 2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Цель занятия: ознакомиться с физико-химическими свойствами нуклеиновых кислот, дать представление об уровнях компактизации молекулы ДНК.

1. Денатурация и ренатурация
2. Температура плавления
3. Гибридизация

Тематика рефератов

1. Использование гибридизации ДНК для идентификации видов.
2. Уровни упаковки генетического материала

Вопросы для самоконтроля

1. Химическая организация нуклеиновых кислот: строение нуклеотидов.
6. Первичная структура ДНК.
7. Правила Э. Чаргаффа.
8. Модель ДНК Дж. Уотсона и Ф. Крика.
9. Особенности молекулярной организации РНК. Виды РНК. Функции РНК в клетке.

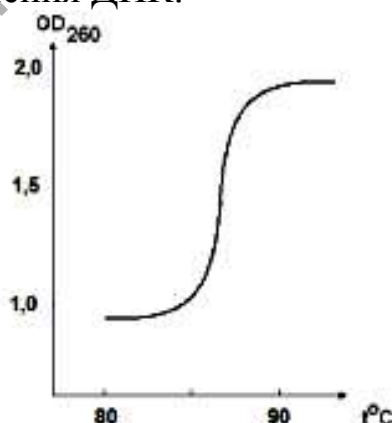
Задание 1. По схемам и таблицам изучите упаковку ДНК. Заполните в таблицу «Компактизация ДНК» по предлагаемой схеме:

Уровень упаковки	Механизм упаковки	Степень укорочения (по отношению к исходной длине)	Толщина, нм	Возможность транскрипции (+/-)

Задание 2. Расположите олигонуклеотиды по порядку возрастания температуры плавления:

AAATTGC GGG GCGCGCG AAAAAAAAAAAAAA
TTTAACG CCC CGCGCGC TTTTTTTTTTTTTTTT

Задание 3. Используя данные, отображенные на графике, определите температуру плавления ДНК.



Задание 4. Решите следующие задачи:

1. Определите число водородных связей, образованных между цепями ДНК, в составе которой содержится 349 адениловых и 430 гуаниловых нуклеотидов.
2. Молекула ДНК, молярная масса которой равна 660 000 г/моль, содержит 750 адениловых нуклеотидов. Рассчитайте число всех остальных нуклеотидов в этой ДНК. Примите молярную массу одного нуклеотида равной 330 г/моль.

Занятие 3. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

Цель занятия: ознакомиться с процессами репликации ДНК.

1 Матричные процессы синтеза биополимеров. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК. Общая характеристика репликации

2. Инициация репликации
3. Репликация кольцевых молекул ДНК
4. Репликация теломерных концов ДНК
5. Явление обратной транскрипции
6. Репликативное метилирование ДНК

Тематика рефератов

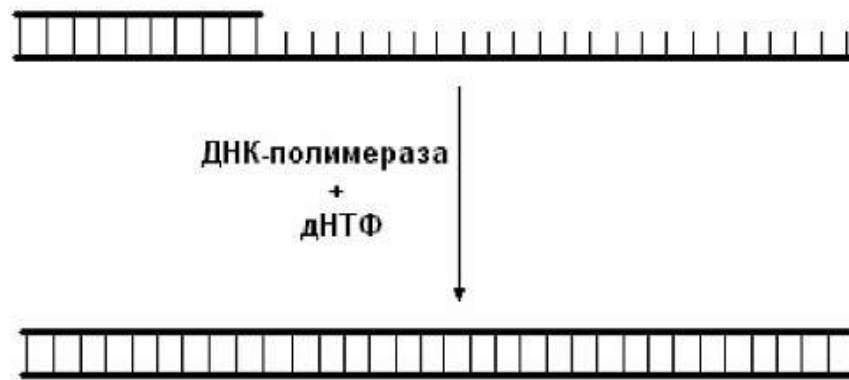
1. Эксперименты Мезельсона-Сталя
2. Строение репликационной вилки.
3. Репликация кольцевых молекул ДНК.
4. Работа фермента теломеразы и теория старения.
5. Характеристика фермента ревертазы (обратная транскриптаза).

Вопросы для самоконтроля

1. Какие эксперименты подтвердили полуконсервативный характер репликации ДНК?
2. Назовите ферменты, участвующие в репликации ДНК.
3. Что такое репликон?
4. Какая цепь называется ведущей (лидирующей) и почему?
5. Что такое фрагменты Оказаки?
6. Какие ферменты участвуют в синтезе РНК-затравок (праймеров)?
7. В чем заключается роль вспомогательных белков (SSB, хеликаз, праймаз и лигаз) в синтезе ДНК?
8. Что такое теломераза?
9. Как осуществляется репликация теломерных концов?
10. Охарактеризуйте процесс обратной транскрипции.
10. Как осуществляется репликативное метилирование ДНК.

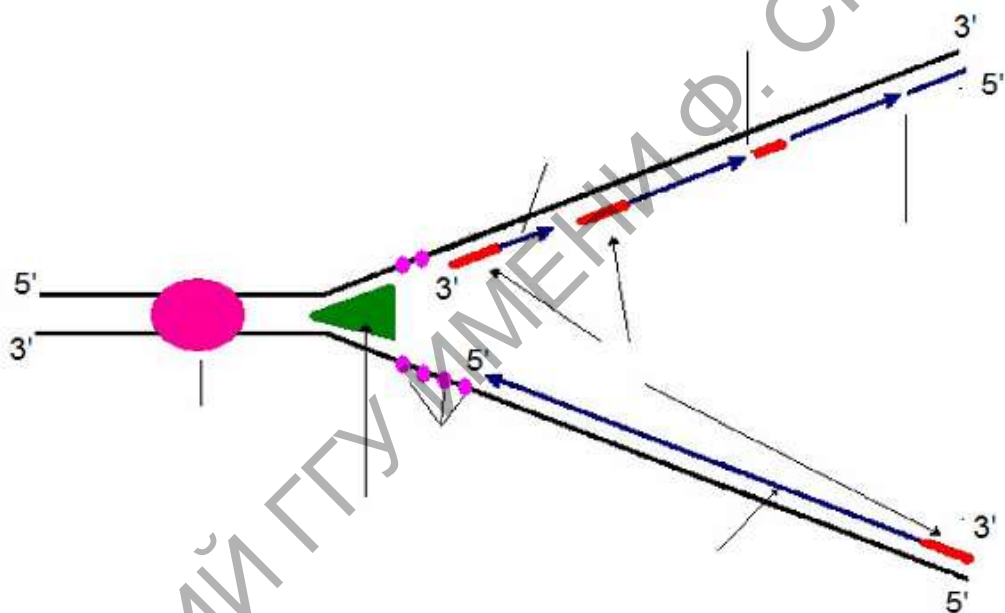
Задание 1. Зарисуйте схему полуконсервативной репликации.

Задание 2. Ниже представлена схема ДНК-полимеразной реакции:



Укажите на схеме матрицу, затравку, направление синтеза ДНК, обозначьте концы (5'- и 3'-) цепей ДНК.

Задание 3. На схеме представлена репликативная вилка.



Подпишите все компоненты репликативной вилки, указанные стрелками.

Задание 4. Решите следующие задачи:

1. Длина ДНК составляет 30мм, количество репликонов –500. Репликация ДНК осуществляется со скоростью 0,6 мкм в мин. Рассчитайте, сколько времени потребуется для репликации этой ДНК.

2. Укажите порядок нуклеотидов в цепочке ДНК, образующейся путем самокопирования цепочки: –ААТЦГЦТГАТ–.

3. Напишите последовательность нуклеотидов ДНК дополнительно к следующей: –ТАГГЦТААТАГЦ–.

4. Участок цепи молекулы ДНК имеет такую последовательность нуклеотидов: –АТЦАТАГЦЦГ–.

Какое строение будет иметь двухцепочечный участок молекулы ДНК?

Тест

1. Репликация – это:

- 1) синтез РНК на ДНК-матрице
- 2) удвоение цепи ДНК
- 3) синтез белка на матрице и-РНК
- 4) процесс возникновения мутаций

2. Этапы репликации:

- 1) инициация и элонгация
- 2) элонгация и терминация
- 3) инициация и терминация
- 4) инициация, элонгация и терминация

3. Скорость репликации у прокариот составляет (в нуклеотидах/секундах):

- 1) 25
- 2) 100
- 3) 50
- 4) 2500

4. У кишечной палочки репликоном является:

- 1) ядро
- 2) цитоплазма
- 3) хромосома
- 4) вся клетка

5. Нить ДНК, синтезируемая в виде фрагментов Оказаки называется:

- 1) Запоздывающая
- 2) ведущая
- 3) двойная
- 4) одинарная

6. Принципы репликации у эукариот:

- 1) комплементарность
- 2) полуконсервативность
- 3) антипараллельность
- 4) потребность в затравке

7. Топоизомераза выполняет функцию:

- 1) полимеризация ДНК
- 2) устранение супервитков ДНК
- 3) спирализация ДНК
- 4) соединение фрагментов Оказаки

8. Репликон – это:

- 1) мультиэнзимный комплекс, связанный с ДНК
- 2) единица репликации
- 3) белок, ответственный за процесс репликации
- 4) ведущая цепь ДНК

9. Мезельсон и Сталь показали, что репликация ДНК происходит:

- 1) Полуконсервативно
- 2) консервативно
- 3) дисперсно
- 4) полудисперсно

10. Типы репликации у эукариот:

- 1) Консервативный
- 2) полуконсервативный
- 3) дисперсный
- 4) все названные

11. Корректирующую функцию выполняет ДНК-полимераза:

- 1) 1
- 2) 1 и 3
- 3) 1 и 2
- 4) 2
- 5) 3

12. Фермент, способный наращивать концы линейных молекул ДНК:

- 1) лигаза
- 2) теломераза
- 3) полимераза 4
- 4) нет правильного ответа

13. Синтез РНК-затравки – это функция:

- 1) экзонуклеазы
- 2) топоизомеразы
- 3) хеликазы
- 4) праймазы

14. ДНК-полимераза в качестве субстрата использует:

- 1) пирофосфаты
- 2) дезоксирибонуклеотиды
- 3) рибонукдеозидтрифосфаты
- 4) молекулы АТФ

15. Раскручивание двойной спирали при репликации выполняется:

- 1) Хеликазой
- 2) SSB-белком
- 3) топоизомеразой
- 4) Праймазой

Занятие 4. ТРАНСКРИПЦИЯ ДНК

Цель занятия: ознакомиться с процессами транскрипции ДНК у про- и эукариот и особенностями организации их генов.

1. Транскрипция прокариот
2. Транскрипция эукариот
3. Нематричный синтез РНК

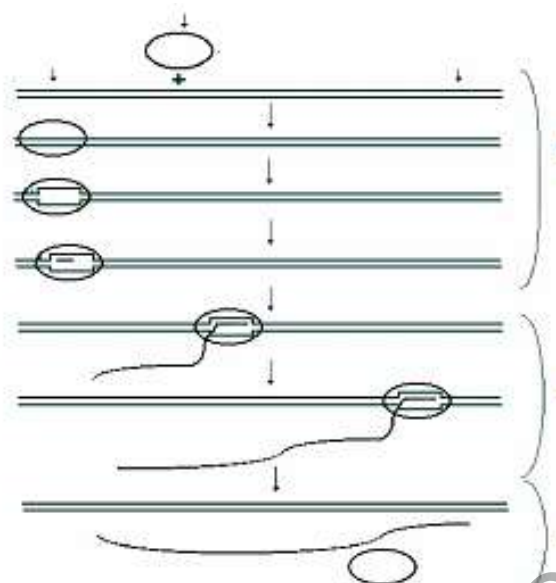
Тематика рефератов

1. Транскрипция ДНК у прокариот
2. Транскрипция у эукариот.
3. Особенности организации генов у прокариот и эукариот.

Вопросы для самоконтроля

1. Что вы понимаете под матричными процессами? Приведите примеры.
2. Дайте определение понятиям «кодирующая» и «некодирующая (матричная)» цепь.
3. Назовите стадии транскрипционного цикла.
4. Дайте характеристику РНК-полимеразе прокариот.
5. Что такое оперон?
4. Что такое инициаторный комплекс?
5. Что такое блок Хогнесса и блок Прибнова?
6. Что такое сплайсингосома?
7. Почему считывание информации с ДНК идёт в направлении 5'-3'?
8. Каковы механизмы терминации транскрипции?
9. Назовите типы РНК-полимераз у эукариот.
10. Какую функцию выполняют энхансеры и сайленсеры?

Задание 1. Ниже представлена схема, иллюстрирующая транскрипцию.



Укажите стадии транскрипции, обозначьте ДНК и РНК, 5'-и 3'-концы их цепей, РНК-полимеразу, промотор, терминатор.

Задание 2. Решите следующие задачи:

1. В составе иРНК содержится Г – 25%, У – 20%, Ц – 31%, А – 24%. Определите долю каждого из азотистых оснований в двуцепочечном участке ДНК, одна из цепей которого является матрицей при синтезе данной иРНК.

2. Белок Б – мономер. Ген, кодирующий его, включает 5 интронов по 10 тысяч пар нуклеотидов и 4 экзона по 270 пар нуклеотидов. Сколько нуклеотидов входит в состав кодирующей зоны иРНК этого белка и сколько он включает аминокислотных остатков?

3. Одна из цепей ДНК с последовательностью нуклеотидов 3'-АТТГЦТЦАА-5' используется в качестве матрицы для синтеза иРНК. Каковую последовательность нуклеотидов будет иметь иРНК?

4. Выпишите последовательность оснований в иРНК, образованной на цепи ДНК с такой последовательностью:

3'-ТТЦГАГТАЦЦАТ-5'.

5. Определите последовательность нуклеотидов участка молекулы иРНК, которая образовалась на участке гена с последовательностью нуклеотидов:

3'-ЦАЦГАТЦЦТТЦТ-5'.

6. Фрагмент одной из цепей ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов:

3'-АААГАТЦАЦТАТТЦТГТТАЦТА-5'.

Напишите строение молекулы иРНК, образующейся в процессе транскрипции на этом участке молекулы ДНК.

7. Образовавшийся участок молекулы иРНК имеет следующий состав кодонов:

5'–ГЦГ-АЦА-УУУ-УЦГ-ЦГУ-АГУ-АГА-АУУ–3'.

Определите, какие коды ДНК будут кодировать эту и-РНК и в какой последовательности они будут располагаться?

Тест

1. Роль гена-регулятора:

- а) содержит информацию о структуре белка-репрессора;
- б) содержит информацию о структуре белков-ферментов;
- в) "включает" и "выключает" структурные гены;
- г) содержит информацию о структуре и-РНК;
- д) регулирует работу функциональных генов.

2. Процесс транскрипции осуществляется в:

- а) ядре;
- б) митохондриях;
- в): цитоплазме;
- г): лизосомах.

3. ТАТА – последовательностями или последовательностями

Прибнова называют нуклеотидные последовательности входящие в состав:

- а) операторов;
- б) терминаторов;
- в) промоторов;
- г) энхансера.

4. Регуляторные белки, которые, связываясь с оператором, блокируют синтез белка называются:

- а) энхансеры;
- б) белки-репрессоры;
- в) белки-активаторы;
- г) гистоновые белки.

5. Верным является следующее утверждение:

- а) длина гена существенно больше длины мРНК;
- б) длина гена существенно меньше длины мРНК;
- в) длина гена и длина мРНК одинакова.

6. Специфическая последовательность нуклеотидов, многократно усиливающая транскрипцию генов РНК-полимеразой II, называется:

- а) оператор;
- б) терминатор;
- в) экзон;

- г) энхансер;
- д) сайленсер.

7. Место, к которому присоединяется РНК-полимераза, прежде чем начать перемещаться вдоль ДНК, транскрибируя структурные гены называется:

- а) оператор;
- б) промотор;
- в) репрессор;
- г) энхансер.

8. Зрелая молекула матричной РНК образуется в процессе:

- а) трансляции;
- б) процессинга;
- в) репликации;
- г) конъюгации.

9. Транскрипция заканчивается, когда молекула РНК-полимеразы достигает:

- а) промотора;
- б) интрона;
- в) терминатора;
- г) оперона.

10. Индуктор:

- а) связывается с репрессором и предотвращает его посадку на промотор;
- б) связывается с репрессором и предотвращает его посадку на оператор;
- в) связывается с терминаторными кодонами и индуцирует дальнейший синтез белка;
- г) связывается с промотором и предотвращает посадку репрессора на оператор.

11. Сплайсинг - это:

- а) передача информации от ДНК к мРНК;
- б) биосинтез РНК на матрице ДНК;
- в) вырезание из предшественника мРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул мРНК;
- г) синтез белка, осуществляемый на матрице РНК.

12. Некодирующая часть гена, не содержащая кодонов и удаляемая из молекулы РНК при ее процессинге называется:

- а) экзон;
- б) репликон;

- в) интрон;
- г) оперон.

13. В процессе транскрипции участвует:

- а) только одна из двух цепей материнской молекулы ДНК – смысловая;
- б) только одна из двух цепей материнской молекулы ДНК – антисмысловая;
- в) любая из двух цепей материнской молекулы ДНК.

14. В закрытом комплексе РНК-полимеразы и материнской цепи ДНК:

- а) цепь ДНК расплетена;
- б) цепь ДНК не расплетена;
- в) цепь ДНК разрушена.

15. Гены рРНК – 18S, 28S и 5,8S транскрибирует;

- а) РНК-полимераза I;
- б) РНК-полимераза II;
- в) РНК-полимераза III.

Занятие 5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Цель занятия: ознакомиться с основными этапами расшифровки и свойствами генетического кода.

1. Этапы расшифровки генетического кода.
2. Полная расшифровка генетического кода
3. Основные свойства генетического кода и кодового словаря.

Тематика рефератов

1. Эксперименты Ниренберга и Маттеи.
2. Гипотеза неоднозначного соответствия.

Вопросы для самоконтроля

1. Этапы расшифровки генетического кода.
2. Полная расшифровка генетического кода в лабораториях Ниренберга, Очоа и др.
3. Основные свойства генетического кода и кодового словаря.

Задание 1. Заполните таблицу:

Аминокис- лота	Триплеты		Антикодо- ны тРНК
	иРНК	ДНК	
Глутамин			
Аланин			
Треанин			
Лизин			
Гистидин			
Аспарагин			

Задание 2. Решите следующие задачи:

1. Фрагмент транскрибируемой цепи ДНК имеет последовательность нуклеотидов:

5'-ЦЦТААГЦГТЦТА-3'.

а) Запишите последовательность нуклеотидов иРНК, закодированных в этом фрагменте;

б) Запишите антикодоны молекул тРНК, распознающие кодоны, представленные в иРНК;

2. Участок гена, кодирующего белок, состоит из последовательно расположенных нуклеотидов:

3'-ААЦГАЦТАТЦАЦТАТАЦЦААЦГАА-5'.

Определите состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи, закодированной в этом участке гена.

3. Участок гена, кодирующего одну из полипептидных цепей гемоглобина, состоит из кодов следующего состава:

3'-ГАЦЦАТГАА-5'.

Определите состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи.

4. Участок гена имеет следующее строение:

3'-ЦГЦТЦААААТЦГ-5'.

Укажите строение соответствующего участка того белка, информация о котором содержится в данном гене. Как отразится на строении белка удаление из гена первого нуклеотида?

Занятие 6. ПРОЦЕСС ТРАНСЛЯЦИИ

Цель занятия: ознакомиться с основными процессами трансляции.

1. Общая схема процесса трансляции и характеристика его отдельных элементов

2. Строение тРНК, рибосом, рРНК
3. Посттрансляционная модификация полипептидных цепей

Тематика рефератов

1. Общая схема процесса трансляции и характеристика его отдельных элементов.
2. Строение тРНК.
3. Строение рибосом у про- и эукариот.
4. Белковые факторы инициации, элонгации и терминации трансляции.
5. Различия процесса трансляции в клетках прокариотических и эукариотических организмов.
6. Посттрансляционная модификация полипептидных цепей.

Вопросы для самоконтроля

1. Что называют трансляцией?
2. Каково строение тРНК?
3. Какую функцию выполняют аминоацил-тРНК-синтетазы?
4. Каково строение рибосом у про- и эукариот?
5. Что называют полисомой?
6. Назовите этапы трансляции и дайте их характеристику.
7. Каковы различия процесса трансляции в клетках прокариотических и эукариотических организмов?
8. Назовите ингибиторы трансляции у эукариот и механизмы их действия.

Задание 1. Зарисуйте схему аминоацилирования тРНК.

Задание 2. Охарактеризуйте структуру про- и эукариотических рибосом

Задание 3. Решите следующие задачи:

1. Молекулярная масса полипептида составляет 33 000. Определите число нуклеотидов в составе кодирующего этот полипептид гена и его размер (нм), если на долю кодирующих последовательностей приходится 42%. Среднюю молярную массу аминокислотного остатка примите равной 110 г/моль.

2. Анализ первичной структуры гена показал, что в нем произошла точечная мутация (произошла замена одного нуклеотида на другой). В то же время было установлено, что первичная структура белка, образовавшегося в результате экспрессии мутантного гена, осталась прежней. В чем причина?

3. Вычислите количество молекул рибозы и остатков фосфорной

кислоты в эукариотической и-РНК, если количество задействованных т-РНК составило 1500.

4. В процессе трансляции участвовало 53 молекулы аминоацил-тРНК. Определите число аминокислотных остатков в составе синтезированного полипептида, число триплетов и нуклеотидов в составе кодирующих последовательностей иРНК.

5. Белок Б – мономер. Ген, кодирующий его, включает 5 интронов по 10 тысяч пар нуклеотидов и 4 экзона по 270 пар нуклеотидов. Сколько нуклеотидов входит в состав кодирующей зоны иРНК этого белка и сколько он включает аминокислотных остатков?

6. В систему для искусственного синтеза белка ввели т-РНК, имеющие антикодоны: ЦГА, УУА, АЦА, ЦЦА. Определите, какие аминокислоты смогут участвовать в биосинтезе белка?

7. Фрагмент молекулы адренокортикотропного гормона человека, вырабатываемого передней долей гипофиза, имеет структуру: – серин – тирозин – серин – метионин –. Определите перечень антикодонов в т-РНК, участвующих в биосинтезе фрагмента АКТГ.

8. Часть молекулы белка имеет такую последовательность аминокислот: – лизин – треонин – глицин – валин – аргинин –. Какие т-РНК (с какими антикодонами) участвуют в синтезе этого белка?

9. Участок гена имеет следующее строение:

3'–ЦГЦТЦААААТЦГ–5'.

Укажите строение соответствующего участка того белка, информация о котором содержится в данном гене. Как отразится на строении белка удаление из гена первого нуклеотида?

10. Определите порядок следования друг за другом аминокислот в участке молекулы белка, если известно, что он кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК:

3'–ТГЦГТТТАТГЦГ–5'.

Как изменится ответ, если химическим путем из молекулы ДНК будет удален шестой нуклеотид?

Тест

1. Информация о последовательности расположения аминокислот в молекуле белка переписывается в ядре с молекулы ДНК на молекулу:

- а) АТФ
- б) рРНК
- в) тРНК
- г) иРНК

2. Участок ДНК, содержащий информацию об одной полипептидной цепи, называют:

- а) хромосомой
- б) триплетом
- в) геном
- г) кодом

3. Молекулы иРНК, в отличие от тРНК

- а) служат матрицей для синтеза белка
- б) служат матрицей для синтеза тРНК
- в) доставляют аминокислоты к рибосоме
- г) переносят ферменты к рибосоме

4. Активацию аминокислот для синтеза белка осуществляет фермент:

- 1) ацил-КоА-синтетаза
- 2) ацетил-КоА-ацетилтрансфераза
- 3) моноаминоксидаза
- 4) аминоксил-тРНК-синтетаза

5. Какая последовательность правильно отражает путь реализации генетической информации?

- а) ген --> иРНК --> белок --> признак
- б) признак --> белок --> иРНК --> ген --> ДНК
- в) иРНК --> ген --> белок --> признак
- г) ген --> ДНК --> признак --> белок

6. Однозначность генетического кода проявляется в кодировании триплетом одной молекулы

- а) аминокислоты
- б) полипептида
- в) АТФ
- г) нуклеотида

7. Иницирующий триплет АУГ в молекуле ДНК соответствует аминокислоте:

- а) метионину
- б) глицину
- в) аланину
- г) триптофану

8. Последовательность нуклеотидов в фрагменте молекулы ДНК следующая: АТТ-ГЦА-ТГЦ. Какова последовательность

нуклеотидов иРНК, синтезируемой на данном фрагменте ДНК?

- а) ТАА-ЦУТ-АЦГ
- б) УАА-ЦГУ-АЦГ
- в) УЦЦ-ЦАТ-ЦЦГ
- г) ТУУ-ЦГУ-АЦТ

9. Трансляция - это процесс, при котором

- а) на матрице ДНК в ядре синтезируются белки
- б) на матрице ДНК синтезируется иРНК
- в) на матрице иРНК в рибосоме синтезируются белки
- г) разрываются водородные связи между молекулами ДНК

10. Молекулы какого вещества являются посредниками в передаче информации о первичной структуре белка из ядра к рибосоме?

- а) иРНК
- б) АТФ
- в) тРНК
- г) ДНК

11. Одной и той же аминокислоте соответствует антикодон УЦА на транспортной РНК и триплет в гене на ДНК

- а) ГТА
- б) АЦА
- в) ТГТ
- г) ТЦА

12. Последовательность триплетов в иРНК определяет

- а) образование вторичной структуры молекулы белка
- б) порядок соединения аминокислот в белке
- в) синтез тРНК на ДНК
- г) скорость синтеза полипептидной цепи

13. Ген кодирует информацию о последовательности мономеров в молекуле:

- а) т-РНК
- б) белка
- в) гликогена
- г) ДНК

14. Сборка белковых молекул в клетке происходит на

- а) мембранах эндоплазматической сети

- б) мембранах аппарат Гольджи
- в) митохондриях
- г) рибосомах

15. Антикодону ААУ на транспортной РНК соответствует триплет на ДНК

- а) ТТА
- б) ААТ
- в) ААА
- г) ТТТ

16. иРНК является копией

- а) одного гена или группы генов
- б) цепи молекулы белка
- в) одной молекулы белка
- г) части плазматической мембраны

17. Матрицей для трансляции служит молекула:

- а) тРНК
- б) ДНК
- в) рРНК
- г) иРНК

18. Генетический код определяет принцип записи информации о:

- а) последовательности аминокислот в молекуле белка
- б) транспорте иРНК в клетке
- в) расположении глюкозы в молекуле крахмала
- г) числе рибосом на эндоплазматической сети

19. Генетический код является вырожденным, так как

- а) каждая аминокислота кодируется тройкой нуклеотидов
- б) место аминокислоты в молекуле белка определяют разные триплеты
- в) он един для всех живущих на Земле существ
- г) несколько триплетов кодируют одну аминокислоту

20. Единство генетического кода всех живых существ на Земле проявляется в его

- а) триплетности
- б) однозначности
- в) специфичности
- г) универсальности

Занятие 7. СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДНК

Цель занятия: ознакомиться с основными молекулярно-биологическими методами анализа ДНК.

1. Определение нуклеотидной последовательности ДНК.
2. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции.
3. Скрининг ампликонов.

Тематика рефератов

1. Саузерн-блот гибридизация, общая характеристика, примеры использования.
2. Полимеразная цепная реакция.
3. Метод секвенирования.

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляет собой амплификация?
2. Что такое полимеразная цепная реакция?
3. Какой процесс лежит в основе ПЦР?
4. Дайте характеристику фермента, осуществляющего ПЦР.
5. Какие виды детекции продуктов ПЦР вы знаете?
6. Что такое полиморфизм длин рестрикционных фрагментов?
7. Перечислите основные этапы ПДРФ-анализа.
8. Дайте определение понятию секвенирование.
9. Опишите методику автоматического секвенирования.

Задание 1. Запишите основные стадии полимеразной цепной реакции.

Задание 2. Объясните, на чем основывается метод электрофореза.

Задание 3. Решите задачи:

1. Фрагмент человеческой ДНК длиной 4 тысячи нуклеотидных пар имеет два сайта рестрикции для фермента *EcoRI*. Как будет выглядеть электрофореграмма, окрашенная этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца данной ДНК, разрезанной этой рестриктазой на неровные части?

2. Молекула ДНК величиной 17 кб была разрезана на фрагменты двумя рестриктазами. Результаты электрофоретического анализа в агарозном геле, полученных фрагментов ДНК после окраски этидиум

бромидом представлены на фореграмме рисунок 80. При разрезании рестриктазой № 1 ДНК разрезается на три фракции величиной 8, 6 и 3 кб, а при разрезании рестриктазой № 2 на две фракции – 10 и 7 кб. ДНК, разрезанная сразу двумя рестриктазами № 1 и № 2, состоит из четырёх фракций величиной 8, 6, 2 и 1 кб.

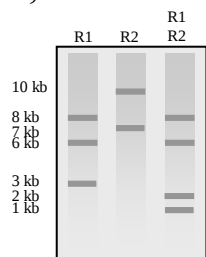


Рисунок. Электрофореграмма ДНК-фрагментов (R1 и R2 - рестриктазы)

В каком порядке полученные рестрикционные фрагменты расположены в исходной молекуле ДНК величиной 17 кб? Иными словами, необходимо построить рестрикционную карту ДНК 17кб.

3. Анализ ДНК был проведен в большой семье, среди членов которой наблюдалось доминантное аутосомное заболевание, проявляющееся в 40 лет и позже. Образцы ДНК каждого члена семьи обрабатывали рестрикционным ферментом TagI и полученные фрагменты ДНК разделили при помощи электрофореза в агарозном геле. Затем провели Саузерн-блот гибридизацию с использованием радиоактивной пробы, состоящей из фрагмента клонированной ДНК человека. Родословная исследованной семьи и полученная автордиограмма электрофорезированной ДНК представлены на рисунке 81 ниже. Черным отмечены члены семьи, имеющие заболевание.

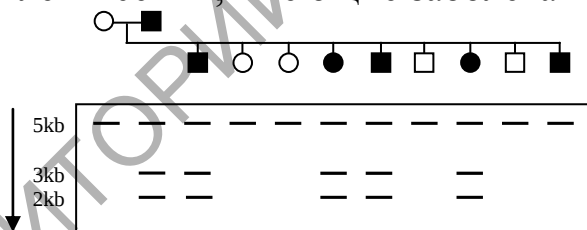
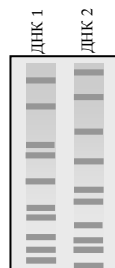


Рисунок. Родословная семьи в которой распространено доминантное аутосомное заболевание и электрофореграмма образцов ДНК каждого члена семьи, обработанных рестрикционным ферментом TagI.

Проанализируйте полные взаимоотношения между полученными с помощью радиоактивной пробы спектрами ДНК членов семьи и геном болезни. Нарисуйте соответствующие хромосомные участки родителей.

4. Образцы человеческой ДНК обработанные рестриктазами были проанализированы методом фингерпринта с использованием радиоактивно меченого зонда комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК. Схематическое изображение радиогаммы проведённо-

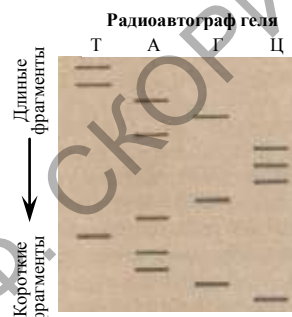
го фингерпринта ДНК представлены на рисунке справа.



Исходя из характера спектра укажите у одного или двух человек была взята ДНК для анализа?

5. Нуклеотидная последовательность короткого рестрикционного фрагмента ДНК длиной в 15 нуклеотидов была секвенирована методом Максама-Гилберта.

На основе спектра представленного на радиограмме справа определите (прочитайте) нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК.



6. В ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружена капля крови принадлежащая убийце. Спектры ДНК данной капли крови, а также семи подозреваемых, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 83. Спектр ДНК образцов капли крови, оставленный преступником на радиограмме отмечен звёздочкой, а спектры семи подозреваемых - цифрами.

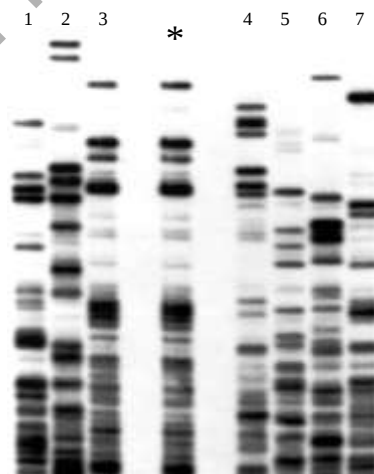


Рисунок. Фингерпринт спектров минисателлитной ДНК образца капли крови убийцы и семи подозреваемых в преступлении.

Исходя из представленных спектров ДНК образцов крови на радиограмме после фингерпринта, укажите, кто из семи подозреваемых является предполагаемым преступником?

7. Для идентификации членов семьи, захороненных в начале XX в., из костных останков ученым удалось получить лишь около 10 ко-

пий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если исследователю удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

8. В лаборатории возникла задача не только размножить, но и клонировать в плазмиде pUC18 структурный ген мыши из предыдущей задачи. Как нужно модифицировать праймеры использованные в предыдущей задаче, для того, что бы после амплификации встроить ген мыши в плазмиду по сайтам *Bam*I и *Eco*RI.

Тест

1. Какие стадии включает ПЦР?

- 1) денатурация;
- 2) гибридизация;
- 3) полимеризация;
- 4) ренатурация.

2. Как называется термостабильный фермент, осуществляющий ПЦР?

- 1) синтетаза;
- 2) праймаза;
- 3) Tag-полимераза;
- 4) ревертаза.

3. Секвенирование – это:

- 1) размножение отдельных участков ДНК;
- 2) определение нуклеотидных последовательностей ДНК;
- 3) разделение фрагментов ДНК.

4. Какой из методов секвенирования основан на химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца?

- 1) метод Сенгера;
- 2) метод Максама-Гилберта;
- 3) автоматическое секвенирование.

5. Скорость продвижения фрагментов ДНК в агарозном геле зависит :

- 1) от длины фрагмента ДНК;

- 2) от нуклеотидного состава фрагмента ДНК;
- 3) от внешних условий.

6. Рестрикционные карты – это:

- 1) расположение участков ДНК для различных видов;
- 2) светящиеся фракции ДНК;
- 3) фракции ДНК, гибридизировавшиеся с радиоактивно-меченным зондом.

7. Какой краситель используется для окрашивания фракций ДНК после электрофореза?

- 1) этидиумбромид;
- 2) метиленовый синий;
- 3) жидкость Реес-Эккера.

8. При какой температуре протекает стадия гибридизации в ПЦР?

- 1) 90° ;
- 2) 60° ;
- 3) 40° ;

9. Какой ученый получил Нобелевскую премию за разработку ПЦР?

- 1) Л. Худ;
- 2) К. Мюллис;
- 3) Э. Чаргафф.

10. Назовите матричный процесс, лежащий в основе полимеразной цепной реакции:

- 1) транскрипция
- 2) трансляция;
- 3) репликация.

11. Праймеры – это:

- 1) короткие (10-30 н.п.) одноцепочечные фрагменты ДНК или РНК, комплементарные 3'-концевым последовательностям ДНК;
- 2) рестрикционные фрагменты;
- 3) фрагменты полипептидной цепи.

12. Стадия ПЦР, на которой при нагревании до 90° происходит разрушение водородных связей между нитями ДНК, называется:

- 1) полимеризация;
- 2) гибридизация;
- 3) денатурация;
- 4) ренатурация.

13. ПЦР используется для анализа:

- 1) ДНК;
- 2) белка;
- 3) аминокислот.

14. Фермент Tag-полимераза был выделен из:

- 1) термофильных бактерий;
- 2) мезофильных бактерий;
- 3) дрожжей.

15. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины:

- 1) 10^6 ;
- 2) 10^9 ;
- 3) 10^3 .

Занятие 8. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Цель занятия: дать представление о структурной организации белковой молекулы, важнейших функциях, выполняемых белками; изучить свойства и функции белков шаперонов и прионов.

- 2 Белки, их строение и функции.
2. Фолдинг. Белки шапероны.
3. Транспорт белков.
4. Деградация белков. Убиквитины.

Тематика рефератов

1. Доменная организация некоторых белков.
2. Шапероны и их функции в клетке.

Вопросы для самоконтроля

1. Сколько различных аминокислот входит в состав белковых молекул?
2. Назовите уровни организации белковых молекул.
3. Объясните образование первичной и вторичной структуры белка.
4. Чем характеризуются третичная и четвертичная структуры белка?
5. Охарактеризуйте гистоновые и негистоновые белки.

6. Чем обусловлено многообразие белков?
7. На каком этапе формирования белковой молекулы необходимы шапероны?
8. Что может произойти с молекулой белка при отсутствии шаперонов в клетке?
9. Что такое прионы и какова их роль?
10. Назовите заболевания, вызываемые прионами.
11. Где происходит деградация белков?
12. Опишите механизмы деградации.

Задание 1. Напишите химическую формулу аминокислот: цистеина, лизина. Чем похожи и отличаются эти аминокислоты, что это определяет?

Задание 2. Запишите реакцию образования трипептида из аминокислот: валин, аргенин и аланин.

Задание 3. Определите функции нижеприведенных белков:

1. Коллаген; мукопротеин; гемоглобин; эластин; кератин; тубулин; актин; миозин; альбумин; интерферон; тромбин; инсулин; самотропин; миоглобин; амилаза; пепсин.

Задание 4. Заполните таблицу.

Таблица: Уровни организации белковой молекулы

Уровень организации	Типы связей	Функциональные группы, участвующие в образовании связей
Первичный		
Вторичный		
Третичный		
Четвертичный		

Задание 5. Решите следующие задачи:

1. Участок цепи ДНК вируса гриппа В имеет следующую последовательность нуклеотидов:

3'-ЦЦТАГЦТАГЦТГ-5'

Под влиянием ионизирующего излучения тимин ДНК превращается в аденин. Определите изменения в строении белка вируса.

2. Определите число нуклеотидов в молекуле иРНК, кодирующей полипептид из 110 аминокислот.

3. Фрагмент молекулы ДНК, кодирующий часть полипептида, имеет строение:

5'-ЦЦЦАААААГАТАЦГЦТЦАТЦГ-3'.

Определите последовательность аминокислот в полипептиде.

Тест

1. Окончание полипептида, содержащее аминогруппу, называется:

- а) С – конец;
- б) N – конец;
- в) пептидная связь.

2. В белке, имеющем четвертичную структуру, отдельная полипептидная цепь имеет название:

- а) протомер;
- б) протромбин;
- в) домен;
- г) глобулин.

3. Незаменимыми аминокислотами являются:

- а) лиз, три, фен;
- б) сер, гли, гис;
- в) асп, ала, тре;
- г) про, оксипро, арг;
- д) глу, цис, тир.

4. Следствием нарушения первичной структуры гемоглобина является:

- а) диспротеинемия;
- б) гипопропротеинемия;
- в) серповидно-клеточная анемия;
- г) железодефицитная анемия.

5. Спиралевидное состояние полипептидной цепи является структурой белка:

- а) первичной;
- б) вторичной;
- в) третичной;
- г) четвертичной.

6. Типы связей, характерные для первичной структуры:

- а) водородная;
- б) дисульфидная;
- в) гидрофобные взаимодействия;
- г) пептидная.

7. Денатурацией называется:

- а) связывание белками молекул воды;
- б) частичное или полное разрушение пространственной структуры белков при сохранении первичной структуры;
- в) потеря белковой молекулой электрического заряда при определенной кислотности среды.

8. Фолдинг белка – это:

- а) процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру;
- б) связывание белками молекул воды;
- в) расщепление полипептидной цепи под действием ферментов.

9. Молекулы, обеспечивающие фолдинг белка, называются:

- а) оперонами;
- б) шаперонами;
- в) прионами;
- г) гистонами.

10. Конечные продукты гидролиза простого белка:

- а) нуклеотиды;
- б) азотистые основания;
- в) аминокислоты;
- г) глюкоза.

11. Связи, стабилизирующие третичную структуру в глобулярных белках:

- а) водородные;
- б) пептидные;
- в) гидрофобные взаимодействия;
- г) фосфодиэфирные.

12. Что является движущей силой в возникновении вторичной структуры белка?

- а) электростатическое отталкивание;
- б) способность остатков аминокислот к образованию водородных связей;
- в) гидрофобное взаимодействие;
- г) термостабильность.

13. Белки актин и миозин выполняют функцию:

- а) транспортную;
- б) защитную;
- г) сократительную..

14. Аминокислоты могут проявлять свойства:

- а) кислот;

- б) оснований;
- в) верны оба варианта ответа.

15. Микрокомпартменты, которые служат для ликвидации белков путем протеолиза, называются:

- а) протеосома;
- б) лизосома;
- в) прион;
- г) протеин.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

3 КОНТРОЛЬ ЗНАНИЙ

3.1 ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ

1. Предмет, задачи и цели молекулярной биологии.
2. Химический состав нуклеиновых кислот.
3. Первичная структура нуклеиновых кислот
4. Открытие двойной спирали ДНК. Вторичная структура ДНК
5. Физико-химические свойства ДНК
6. Строение и свойства РНК
7. Матричные процессы синтеза биополимеров. Общая характеристика репликации
8. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК.
9. Инициация репликации
10. Репликация кольцевых молекул ДНК
11. Репликация теломерных концов ДНК
12. Явление обратной транскрипции
13. Репликативное метилирование ДНК
14. Репарация повреждений ДНК
15. Рекомбинация ДНК
16. Транспозиция ДНК
17. Транскрипция прокариот
18. Транскрипция эукариот
19. Строение оперонов
20. Особенности организации генов у прокариот и эукариот
21. Нематричный синтез РНК
22. Строение м РНК
23. Процессинг РНК
24. Сплайсинг
25. Модификация 5'- и 3'-концов транскриптов
26. Этапы расшифровки генетического кода
27. Основные свойства генетического кода и кодового словаря
28. Общая схема процесса трансляции и характеристика его отдельных элементов
29. тРНК: строение и свойства
30. Строение рибосом. рРНК
31. Этапы трансляции и их характеристика
32. Посттрансляционная модификация полипептидных цепей
33. Структура белков
34. Фолдинг белков
35. Секреция белков у прокариот
36. Транспорт белков
37. Деграция белков
38. Передача информации через клеточную мембрану
39. Белковые домены, узнающие специфические последовательности ДНК
40. Сенсорные механизмы бактерий
41. Сенсорные механизмы эукариот
42. Определение нуклеотидной последовательности ДНК
43. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции

- 44. Размеры, структура и особенности организации геномов различных групп организмов
- 45. Организация хромосом различных организмов
- 46. Механизмы геномных перестроек
- 47. Структура прерывистых генов у различных эукариот

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

3.2 КРИТЕРИИ ОЦЕНОК ПО ДИСЦИПЛИНЕ

10 баллов (десять):

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы, а также по основным вопросам, выходящим за ее пределы;
- точное использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы;
- безупречное владение инструментарием учебной дисциплины, умение его эффективно использовать в решении научных и профессиональных задач;
- выраженная способность самостоятельно и творчески решать сложные проблемы в нестандартной ситуации;
- полное и глубокое усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку, использовать научные достижения других дисциплин;
- творческая самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, активное участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

9 баллов (девять):

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы;
- точное использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его эффективно использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач;
- способность самостоятельно и творчески решать сложные проблемы в нестандартной ситуации в рамках учебной программы;
- полное усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку;
- самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях;
- творческое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

8 баллов (восемь):

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем поставленным вопросам в объеме учебной программы;
- использование научной терминологии, стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины (методами комплексного анализа, техникой информационных технологий), умение его использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач;
- усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;

- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку с позиций государственной идеологии (по дисциплинам социально-гуманитарного цикла);
- активная самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, систематическое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

7 баллов (семь):

- систематизированные, глубокие и полные знания по всем разделам учебной программы;
- использование научной терминологии (в том числе на иностранном языке), лингвистически и логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в постановке и решении научных и профессиональных задач;
- усвоение основной и дополнительной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им критическую оценку;
- самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

6 баллов (шесть):

- достаточно полные и систематизированные знания в объеме учебной программы;
- использование необходимой научной терминологии, стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать обоснованные выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении учебных и профессиональных задач;
- способность самостоятельно применять типовые решения в рамках учебной программы;
- усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- умение ориентироваться в базовых теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им сравнительную оценку;
- активная самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, периодическое участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

5 баллов (пять):

- достаточные знания в объеме учебной программы;
- использование научной терминологии, стилистически грамотное, логически правильное изложение ответа на вопросы, умение делать выводы;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении учебных и профессиональных задач;
- способность самостоятельно применять типовые решения в рамках учебной программы;
- усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;

- умение ориентироваться в базовых теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им сравнительную оценку;
- самостоятельная работа на практических, лабораторных занятиях, участие в групповых обсуждениях, высокий уровень культуры исполнения заданий.

4 балла (четыре), ЗАЧТЕНО:

- достаточный объем знаний в рамках образовательного стандарта;
- усвоение основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- использование научной терминологии, стилистическое и логическое изложение ответа на вопросы, умение делать выводы без существенных ошибок;
- владение инструментарием учебной дисциплины, умение его использовать в решении стандартных (типовых) задач;
- умение под руководством преподавателя решать типовые задачи;
- умение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях по изучаемой дисциплине и давать им оценку;
- работа под руководством преподавателя на практических, лабораторных занятиях, допустимый уровень культуры исполнения заданий.

3 балла (три), НЕЗАЧТЕНО:

- недостаточно полный объем знаний в рамках образовательного стандарта;
- знание части основной литературы, рекомендованной учебной программой дисциплины;
- использование научной терминологии, изложение ответа на вопросы с существенными лингвистическими и логическими ошибками;
- слабое владение инструментарием учебной дисциплины некомпетентность в решении стандартных (типовых) задач;
- неумение ориентироваться в основных теориях, концепциях и направлениях изучаемой дисциплины;
- пассивность на практических и лабораторных занятиях, низкий уровень культуры исполнения заданий.

2 балла (два), НЕЗАЧТЕНО:

- фрагментарные знания в рамках образовательного стандарта;
- знания отдельных литературных источников, рекомендованных учебной программой дисциплины;
- неумение использовать научную терминологию дисциплины, наличие в ответе грубых стилистических и логических ошибок;
- пассивность на практических и лабораторных занятиях, низкий уровень культуры исполнения заданий.

1 балл - один, НЕЗАЧТЕНО:

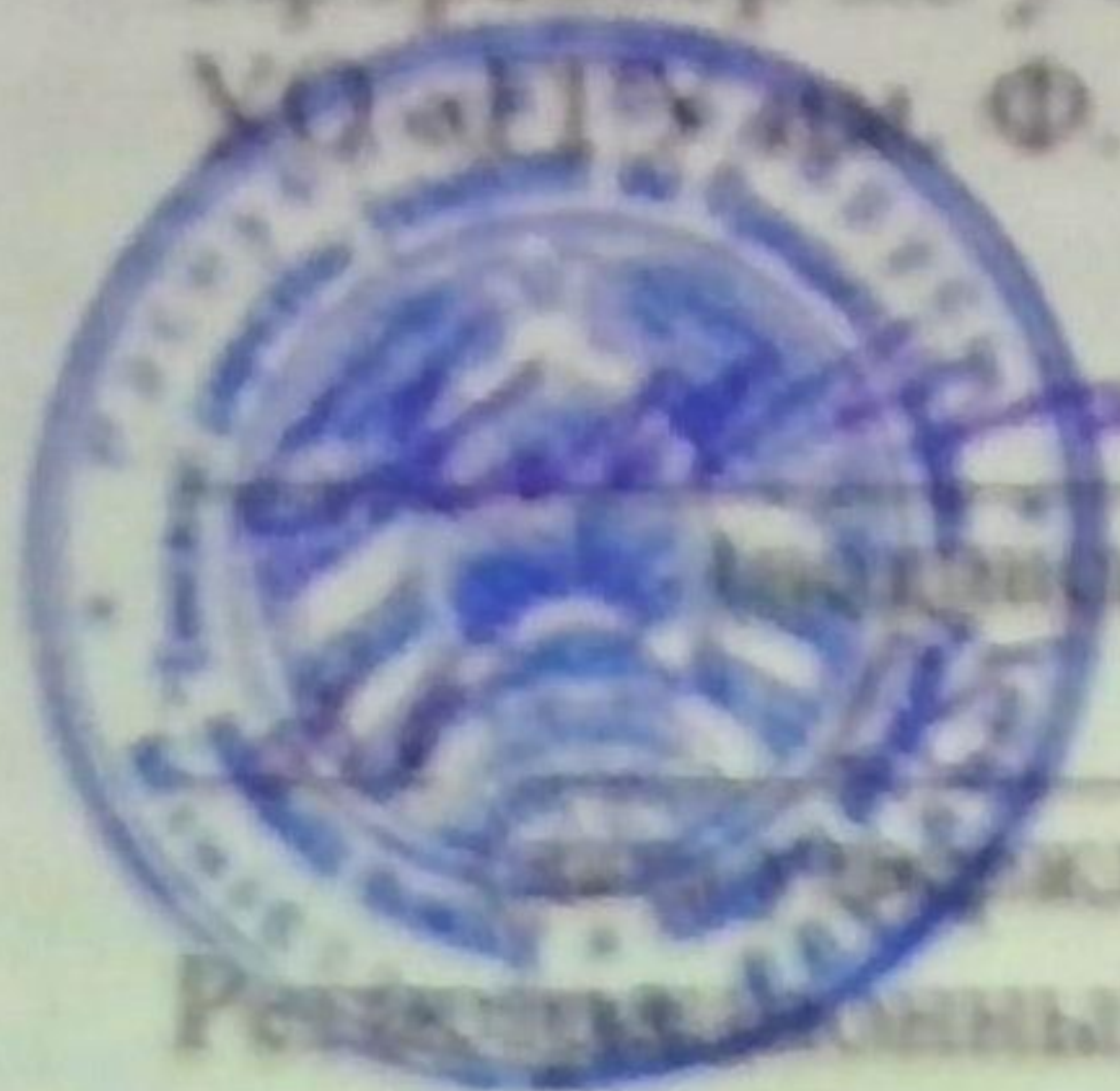
- отсутствие знаний и компетенций в рамках образовательного стандарта или отказ от ответа.

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

УО «ГГУ им. Ф. Скорины», профессор



И.В. Семченко

20 15 г.

Регистрационный № УД В-2015-446/уч.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности

1-31 01 01 - 02 Биология (научно-педагогическая деятельность)

Учебная программа составлена на основе образовательного стандарта Республики Беларусь ОСРБ ОСВО 1-31 01 01-2013 и типовой программы «Молекулярная биология» по специальности 1-31 01 01 Биология, утвержденной Министерством образования Республики Беларусь 30 мая 2012 года, регистрационный ТД-Г. 419/тип.

СОСТАВИТЕЛИ:

Г.Г. Гончаренко, чл.-корр. НАН Б, д.б.н., профессор кафедры зоологии, физиологии и генетики;

А.В. Крук, к.б.н., доцент кафедры зоологии, физиологии и генетики;

А.А. Сурков, старший преподаватель кафедры зоологии, физиологии и генетики;

С.А. Зятков, ассистент кафедры зоологии, физиологии и генетики;

Е.М. Курак, ассистент кафедры зоологии, физиологии и генетики

РЕКОМЕНДОВАНА К УТВЕРЖДЕНИЮ:

Кафедрой зоологии, физиологии и генетики
(протокол № 11 от 04.05. 2015 г.);

Научно-методическим советом УО «Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»
(протокол № 7 от 27.05. 2015 г.)

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Подготовка высококвалифицированных специалистов-биологов требует овладения ими знаний в различных областях современной биологии. Наиболее развивающейся областью биологической науки в настоящее время является молекулярная биология, занимающаяся расшифровкой молекулярных основ жизнедеятельности прокариотических и эукариотических организмов. Изучение данной дисциплины – важный этап в подготовке современных специалистов в области молекулярной биологии.

Целью дисциплины «Молекулярная биология» является формирование у студентов представлений об основных процессах, протекающих в живой клетке, на молекулярном уровне.

В задачи дисциплины «Молекулярная биология» курса входит изучение молекулярных основ жизнедеятельности, включая механизмы таких процессов как репликация, транскрипция, трансляция, репарация и рекомбинация ДНК и др. Полученная студентами информация позволит им более глубоко понимать современные проблемы и достижения биологии, а также подготовит к восприятию новых сведений по различным аспектам регуляции метаболизма в прокариотических и эукариотических клетках и осуществлению направленного генно-инженерного конструирования организмов.

В результате изучения учебной дисциплины студент должен

знать:

- основные характеристики строения и функционирования нуклеиновых кислот;
- основные закономерности протекания матричных процессов в клетке;
- особенности процесса реализации генетической информации у прокариот и эукариот;
- структурные уровни организации белковых молекул;
- закономерности процесса синтеза белка, модификации, фолдинга и транспорта белковых молекул;

уметь:

- использовать терминологию молекулярной биологии и легко оперировать ее терминами;
- использовать знания молекулярной биологии для объяснения процессов, протекающих в живых организмах;
- применять знания о закономерностях молекулярно-биологических процессов при изучении научной литературы по тематике курсовых и дипломных работ, а также при изучении смежных биологических дисциплин.

Материал курса основывается на ранее полученных студентами знаниях по таким дисциплинам, как «Генетика», «Генная инженерия», «Биохимия» и «Микробиология».

Лабораторные занятия предусматриваются в виде семинаров, на которых студенты закрепляют теоретический материал, полученный при чтении лекций, а также углубляют знания по отдельным вопросам молекулярной биоло-

гии на практических занятиях, используя современное молекулярно-генетическое оборудование.

Изучение дисциплины «Молекулярная биология» предусмотрено студентами специальности 1 – 31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность).

Общее количество часов для **студентов 3 курса дневной формы обучения** – 136 (5 семестр), аудиторных – 60: лекционных – 32 часа (из них управляемая самостоятельная работа – 4), лабораторных занятий – 20 часов. Форма отчетности – экзамен.

Общее количество часов для **студентов 4 курса заочной формы обучения** – 136 (8 семестр), аудиторных – 18 (из них лекционных – 10 часов, лабораторных занятий – 8 часов). Форма отчетности – экзамен.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРНИНОВА

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

Тема 1 Введение в предмет. Строение и физико-химические свойства нуклеиновых кислот.

Предмет и задачи молекулярной биологии. История ее развития и основные достижения.

Химический состав нуклеиновых кислот: пуриновые и пиримидиновые основания, рибозы и дезоксирибозы. Строение нуклеозидов и нуклеотидов. Фосфодиэфирные связи. Характеристика первичной структуры ДНК.

Открытие двойной спирали ДНК. Правила Чаргаффа. Принцип комплементарности. Данные Уилкинса и Франклина по рентгеноструктурному анализу ДНК. Комплементарные пары. Характеристика В-формы ДНК. Разнообразные формы двойной спирали ДНК: Z-форма ДНК.

Типы химических связей, участвующие в стабилизации спиральной структуры молекулы ДНК (ковалентные, гидрофобные, водородные). Стэкинг-взаимодействие.

Плавление ДНК. Гибридизация нуклеиновых кислот и ее использование в молекулярной биологии.

Одно- и двуцепочечные, кольцевые и линейные молекулы ДНК. Митохондриальная и хлоропластная ДНК.

Строение и свойства РНК. Различные типы РНК. Особенности структуры мРНК, рРНК, тРНК, их функции и локализация в клетке.

Тема 2 Репликация ДНК

Матричные процессы синтеза биополимеров. Механизм реакции полимеризации ДНК. Ферменты, участвующие в репликации ДНК: ДНК-полимеразы, топоизомеразы, ДНК-гираза *E. coli*, геликазы, РНК-полимераза (праймаза), ДНК-лигазы и др.

Инициация репликации. Структура участка начала репликации (OriC). Понятие о репликоне. Строение вилки репликации (репликационная вилка Корнберга). Ведущая и отстающая нити, особенности их репликации. Полунепрерывный синтез и фрагменты Оказаки. Синтез РНК-затравок (праймеров). Роль вспомогательных белков (SSB, хеликаз, праймаз и лигаз) в синтезе ДНК. Модель работы димерной полимеразы; координация синтеза ДНК на комплементарных нитях.

Репликация кольцевых молекул ДНК: образование θ -структуры, D-петли и репликация по типу катящегося кольца.

Репликация теломерных концов ДНК. Теломераза. Характеристика фермента ревертаза (обратная транскриптаза), осуществляющего обратную транскрипцию. Репликативное метилирование ДНК.

Тема 3 Репарация, рекомбинация и транспозиция ДНК

Репарация повреждений ДНК. Различные типы повреждений структуры ДНК и способы их устранения. Репаративный синтез ДНК. Эксцизионная репарация. Прямая репарация тиминовых димеров и метилированного гуанина. Репарация неспаренных нуклеотидов (Mismatch). Пострепликативная репара-

ция, включающая рекомбинацию. SOS-репарация. Роль метилирования в репарации. Процессы рестрикции-модификации у прокариот. Эффективность репарационных систем.

Рекомбинация. Молекулярные механизмы общей (гомологичной) рекомбинации. Ферменты, участвующие в общей рекомбинации. Модель рекомбинации с перекрещиванием цепей. Структуры Холлидея и их разрешение с помощью ферментов. Сайтспецифическая рекомбинация и ее участие в хромосомных перестройках, экспрессии генов у фагов, интеграции фага лямбда, образовании генов иммуноглобулинов и рецепторов Т-клеток.

Транспозиция. Основные типы мобильных генетических элементов про- и эукариот: структура, гены и их продукты. Молекулярный механизм транспозиции. Мини-транспозоны. Транспозоны бактерий и механизм их транслокации. LINE и SINE-элементы: молекулярная организация и механизм перемещения.

Тема 4 Транскрипция ДНК

Понятие о кодирующей и не кодирующей (матричной) цепях. Транскрипция ДНК у прокариот. Стадии транскрипционного цикла, составляющие элементы процесса. Особенности структуры РНК-полимеразы, σ – факторы, направление транскрипции.

Строение оперонов у прокариот. Области промотора, оператора, терминатора.

Негативная и позитивная регуляция транскрипции у прокариот на примере лактозного и триптофанового оперонов. Катаболитная репрессия, CAP-белок.

Транскрипция у эукариот. Структура эукариотического промотора. Типы РНК-полимераз у эукариот и синтезируемые ими РНК. Факторы транскрипции. Медиаторный комплекс транскрипции. Энхансеры и сайленсеры. Терминация транскриптов эукариотических РНК-полимераз.

Особенности организации генов у прокариот и эукариот. Механизмы регуляции экспрессии генов.

Тема 5 Процессинг РНК

Строение мРНК у прокариот и эукариот. Процессинг и сплайсинг молекул РНК. Особенности процессинга тРНК и рРНК у бактерий. Типы интронов и особенности механизмов их сплайсинга. Аутосплайсинг. Сплайсинг пре-мРНК в ядре. Принципы определения границ интронов у разных организмов. Альтернативный сплайсинг. Роль малых ядерных РНК и белковых факторов в сплайсинге. Сплайсосома.

Модификация 5'- и 3'-концов транскриптов. Ферменты и катализируемые ими реакции. Значение модификации концов транскриптов. Различный эффект полиаденилирования у прокариот и эукариот и его причины.

Тема 6 Генетический код

Этапы расшифровки генетического кода. Эксперименты Ниренберга и Маттеи. Полная расшифровка генетического кода в лабораториях Ниренберга,

Очоа и др. Основные свойства генетического кода и кодового словаря.

Тема 7 Процесс трансляции

Общая схема процесса трансляции и характеристика его отдельных элементов.

Строение тРНК: первичная, вторичная и третичная структура, роль модифицированных нуклеотидов. Значимые для трансляции области. Аминоацилирование тРНК, его специфичность, аминоацил-тРНК-синтетазы.

Строение рибосом у про- и эукариот, их локализация в клетке. Рибосомные РНК, их виды. Субъединицы рибосом, их объединение в целую рибосому. А- и П- участки рибосом, их функции. Полисомы.

Этапы трансляции и их характеристика. Белковые факторы инициации, элонгации и терминации трансляции. Химические реакции и общий энергетический баланс биосинтеза белка.

Различия процесса трансляции в клетках прокариотических и эукариотических организмов.

Ингибиторы трансляции у про- и эукариот и механизмы их действия.

Посттрансляционная модификация полипептидных цепей. Транспорт эукариотических белков в клеточные органеллы и через клеточную мембрану.

Тема 8 Структура, фолдинг, транспорт и деградация белков

Первичная, вторичная, третичная и четвертичная структура белков. Понятие о доменах и их функциональной роли.

Фолдинг белков – образование определенной третичной структуры. Факторы фолдинга: ферменты и шапероны. Рефолдинг белков. Прионы.

Секреция белков у прокариот: Сек-аппарат и сигнальный пептид.

Распределение белков по компартментам клетки эукариот. Котрансляционная транслокация белков в полость эндоплазматического ретикулума. SRP-частица и ее рецептор. Модификации белков в полости ЭР. Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты, контроль локализации белков внутри этих органелл. Транспорт белков через ядерные поры.

Деградация белков: АТФ-зависимые протеазы прокариот и 26S-протеасома эукариот. Механизм распознавания аномальных белков. Система убиквитинилирования белков эукариот.

Тема 9 Сенсорные процессы и внутриклеточная регуляция

Передача информации через клеточную мембрану. Белковые каналы, транспортеры и рецепторы. Роль киназ и G-белков в регуляции.

Белковые домены, узнающие специфические последовательности ДНК (гомеодомен, "лейциновая молния", "цинковые пальцы").

Сенсорные механизмы бактерий. Двухкомпонентные регуляторные системы: принцип действия и примеры. Сигнальные каскады у бактерий.

Сенсорные механизмы эукариот. Компоненты сигнальных путей (рецепторы, G-белки, эффекторы, вторичные мессенджеры). Структура и принцип действия G-белков. Типы протеинкиназ. Сигнальные пути JAK-STAT и Ras/MAPK.

Тема 10 Современные молекулярно-биологические методы анализа ДНК

Разделение фрагментов ДНК методом электрофореза в геле. Определение нуклеотидной последовательности ДНК: метод Максома и Гилберта (химический метод), метод Сэнгера (энзиматический метод), определение последовательности ДНК с помощью секвенаторов (флюоресцентный анализ). Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции. Скрининг ампликонов.

Тема 11 Организация геномов про- и эукариот. Геномика

Размеры, структура и особенности организации геномов различных групп организмов (бактерий, архей, одноклеточных эукариот, беспозвоночных и позвоночных животных, растений). Корреляция сложности организации организма с размером генома, числом содержащихся в нем генов и количеством кодируемых уникальных белковых модулей.

Организация хромосом различных организмов. Структура центромерных и теломерных областей. Теломераза, механизм репликации концов линейных хромосом. Искусственные хромосомы. Закономерности распределения генов по хромосомам. Количество некодирующей белки ДНК у различных организмов.

Механизмы геномных перестроек, увеличения и уменьшения размеров геномов, роль мобильных генетических элементов в этих процессах. Семейства гомологичных генов. Ортологи и паралоги. Псевдогены. Типы повторяющихся последовательностей и их встречаемость в геномах различных организмов. Различия в механизмах эволюции геномов про- и эукариот.

Структура прерывистых генов у различных эукариот: размеры и число интронов и экзонов, взаимосвязь организации генов с различиями в механизме их экспрессии у растений и животных.

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ КАРТА ДИСЦИПЛИНЫ

Дневная форма обучения

Номер раздела, темы, занятия	Название раздела, темы, занятия, перечень изучаемых вопросов	Количество аудиторных часов				Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	практические (семинарские) занятия	лабораторные занятия	количество часов УРС			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Введение в предмет. Строение и физико-химические свойства нуклеиновых кислот 1 Предмет, задачи и цели молекулярной биологии. 2 Химический состав нуклеиновых кислот. Первичная структура нуклеиновых кислот 3. Открытие двойной спирали ДНК. Вторичная структура ДНК 4 Физико-химические свойства ДНК 5 Строение и свойства РНК	4	6			Таблицы, схемы	[1] [2] [3] [4] [9] [10] [12]	Тестирование, коллоквиум
2	Репликация ДНК 1 Матричные процессы синтеза биополимеров. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК. Общая характеристика репликации 2 Инициация репликации 3 Репликация кольцевых молекул ДНК	4	2			Таблицы, схемы	[1] [2] [4] [9] [10] [12]	Тестирование

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	4 Репликация теломерных концов ДНК 5 Явление обратной транскрипции 6 Репликативное метилирование ДНК							
3	Репарация, рекомбинация и транспозиция ДНК 1 Репарация повреждений ДНК 2 Рекомбинация ДНК 3 Транспозиция ДНК				2	Таблицы, схемы	[1] [2] [10]	
4	Транскрипция ДНК 1 Транскрипция прокариот 2 Транскрипция эукариот 3 Нематричный синтез РНК	4	2			Таблицы, схемы	[1] [2] [6] [11]	Тестирование
5	Процессинг РНК 1 Сплайсинг молекул РНК 2 Процессинг иРНК 3 Процессинг тРНК 4 Процессинг рРНК	2				Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [11] [12]	
6	Генетический код 1 Этапы расшифровки генетического кода 2 Основные свойства генетического кода и кодового словаря	2	2			Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	Тестирование
7	Процесс трансляции 1 Общая схема процесса трансляции и характеристика его отдельных элементов 2 тРНК 3 Строение рибосом. рРНК 4 Этапы трансляции и их характеристика 5 Посттрансляционная модификация полипептидных цепей	4	4			Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	Тестирование, коллоквиум

8	Структура, фолдинг, транспорт и деградация белков 1 Структура белков 2 Фолдинг белков 3 Секреция белков у прокариот 4 Транспорт белков 5 Деградация белков	2					[1] [2] [9] [12]	
9	Сенсорные процессы и внутриклеточная регуляция 1 Передача информации через клеточную мембрану 2 Белковые домены, узнающие специфические последовательности ДНК 3 Сенсорные механизмы бактерий 4 Сенсорные механизмы эукариот				2		[1] [2] [9] [12]	
10	Современные молекулярно-биологические методы анализа ДНК 1 Определение нуклеотидной последовательности ДНК 2. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции 3 Скрининг ампликонов.	4	4			Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	Тестирование
11	Организация геномов про- и эукариот. Геномика 1 Определение нуклеотидных последовательностей в геномах. Аннотация расшифрованной последовательности 2 Характеристика геномов прокариот 3 Характеристика геномов эукариот 4 Минимальный геном необходимый для жизни	2				Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	
Итого часов		28	20		4			Экзамен

Заочная форма обучения

Номер раздела, темы, занятия	Название раздела, темы, занятия, перечень изучаемых вопросов	Количество аудиторных часов				Материальное обеспечение занятия (наглядные, методические пособия и др.)	Литература	Формы контроля знаний
		лекции	практические (семинарские) занятия	лабораторные занятия	количество часов УРС			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Введение в предмет. Строение и физико-химические свойства нуклеиновых кислот 1 Предмет, задачи и цели молекулярной биологии. 2 Химический состав нуклеиновых кислот. Первичная структура нуклеиновых кислот 3 Открытие двойной спирали ДНК. Вторичная структура ДНК 4 Физико-химические свойства ДНК 5 Строение и свойства РНК	1	2			Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	Тестирование, коллоквиум
2	Репликация ДНК 1 Матричные процессы синтеза биополимеров. Белки и ферменты, участвующие в репликации ДНК. Общая характеристика репликации 2 Инициация репликации 3 Репликация кольцевых молекул ДНК 4 Репликация теломерных концов ДНК 5 Явление обратной транскрипции 6 Репликативное метилирование ДНК	2				Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]]	Тестирование

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	Транскрипция ДНК 1 Транскрипция прокариот 2 Транскрипция эукариот 3 Нематричный синтез РНК	1	2			Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	Тестирование
5	Процессинг РНК 1 Сплайсинг молекул РНК 2 Процессинг иРНК 3 Процессинг тРНК 4 Процессинг рРНК	1				Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [11] [12]	
6	Генетический код 1 Этапы расшифровки генетического кода 2 Основные свойства генетического кода и кодового словаря	1				Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	Тестирование
7	Процесс трансляции 1 Общая схема процесса трансляции и характеристика его отдельных элементов 2 тРНК 3 Строение рибосом. рРНК 4 Этапы трансляции и их характеристика 5 Посттрансляционная модификация полипептидных цепей	1	2			Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	Тестирование
8	Структура, фолдинг, транспорт и деградация белков 1 Структура белков 2 Фолдинг белков 3 Секреция белков у прокариот 4 Транспорт белков 5 Деградация белков	1					[1] [2] [9] [12]	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	Современные молекулярно-биологические методы анализа ДНК 1 Определение нуклеотидной последовательности ДНК 2 Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции 3 Скрининг ампликонов	1	2			Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	
11	Организация геномов про- и эукариот. Геномика 1 Определение нуклеотидных последовательностей в геномах. Аннотация расшифрованной последовательности 2 Характеристика геномов прокариот 3 Характеристика геномов эукариот 4 Минимальный геном необходимый для жизни	1				Таблицы, схемы	[1] [2] [9] [12]	
Итого часов		10	8					Экзамен

Чл.-корр. НАН Б, д.б.н., профессор

Доцент, к.б.н.

Старший преподаватель

Ассистент

Ассистент

Гончаренко Г.Г.

Крук А.В.

Сурков А.А.

Зятков С.А.

Степанова Е.М.

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Рекомендуемый перечень практических работ

- Строение нуклеиновых кислот
- Физико-химические свойства нуклеиновых кислот
- Репликация ДНК
- Транскрипция ДНК
- Генетический код
- Процесс трансляции
- Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции
- Скрининг ампликонов методом электрофореза

Рекомендуемые формы контроля знаний

- 1 Реферативные работы
- 2 Тестовые задания
3. Коллоквиум

Рекомендуемые темы реферативных работ

1. Открытие двойной спирали ДНК.
2. Митохондриальная и хлоропластная ДНК.
3. Работа фермента теломераза и теория старения.
4. Характеристика фермента ревертаза (обратная транскриптаза).
5. SOS-репарация.
6. Эффективность репарационных систем.
7. Ферменты, участвующие в общей рекомбинации.
8. Транспозоны бактерий и механизм их транслокации.
9. Строение оперонов у прокариот.
10. Типы РНК-полимераз у эукариот и синтезируемые ими РНК.
11. Механизмы регуляции экспрессии генов.
12. Роль малых ядерных РНК и белковых факторов в сплайсинге.
13. Эксперименты Ниренберга и Матеи по расшифровке кода.
14. Строение рибосом у про- и эукариот, их локализация в клетке.
15. Ингибиторы трансляции у про- и эукариот и механизмы их действия.
16. Понятие о доменах и их функциональной роли.
17. Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты, контроль локализации белков внутри этих органелл.
18. Белковые домены, узнающие специфические последовательности ДНК (гомеодомен, "лейциновая молния", "цинковые пальцы").
19. Геном человека и его значение.
20. Геном хлоропластов.
21. Организация генома вирусов

Рекомендуемые темы тестовых проверочных работ

1. Молекулярная биология
2. Основы генетической инженерии.

Рекомендуемые темы коллоквиумов

1. Строение и физико-химические свойства нуклеиновых кислот
2. Транскрипция и трансляция ДНК

Рекомендуемая литература

Основная

1. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рефф, К.Робертс, Дж. Уотсон. М.: Мир, 1994. Т. 1-3.
2. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б.Бокуть, Н.В.Герасимович, А.А.Милютин. Мн.:Высшая школа, 2005.
3. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / под ред. А.С. Спирина. М.: Высшая школа. 1990.
4. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Кольман Я., Рём К.-Г.. М.: Мир, 2000.

Дополнительная

1. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия/ Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. М.: Высшая школа, 1998.
2. Lewin, B. Genes VIII / Lewin B. Prentice Hall, 2004.
3. Lodish, H. Molecular Cell Biology (5th Edition) / Lodish H. et. al. W.H.Freeman & Company, 2003.
4. Сингер, М. Гены и геномы / М.Сингер, П.Берг. М.: Мир, 1998. Т. 1-2.
5. Коничев, А.С. Молекулярная биология / А.С.Коничев, Г.А.Севастьянова. М.: Изд. центр «Академия», 2003.
6. Льюин, Б. Гены / Б.Льюин. М.: Мир, 1987.
7. Патрушев, Л.И. Экспрессия генов / Л.И. Патрушев. М.: Наука, 2000.
8. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н.Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003.

ПРОТОКОЛ СОГЛАСОВАНИЯ УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЫ
ПО ИЗУЧАЕМОЙ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ
С ДРУГИМИ ДИСЦИПЛИНАМИ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

Название дисциплины, с которой требуется согласование	Название кафедры	Предложения об изменениях в содержании учебной программы по изучаемой учебной дисциплине	Решение, принятое кафедрой, разработавшей учебную программу (с указанием даты и номера протокола)
Генетика	Кафедра зоологии, физиологии и генетики		Рекомендовать к утверждению учебную программу в представленном варианте протокол № ____ от _____.201__

ДОПОЛНЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ К УЧЕБНОЙ ПРОГРАММЕ
ПО ИЗУЧАЕМОЙ УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ
на ____/____ учебный год

№ № ПП	Дополнения и изменения	Основание

Учебная программа пересмотрена и одобрена на заседании, физиологии и генетики
(протокол № ____ от _____ 201_г.)

Заведующий кафедрой

УТВЕРЖДАЮ

Декан биологического факультета УО «ГГУ им. Ф. Скорины»

4.2 ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин. Мн.: Высшая школа, 2005.
2. Гончаренко, Г.Г. Основы генетической инженерии / Г.Г. Гончаренко. Мн.: Высшая школа, 2005.
3. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот / под ред. А.С. Спирина. М.: Высшая школа. 1990.
4. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.Г. Рём. М.: Мир, 2000.
5. Резяпкин, В.И. Основы молекулярной биологии / В.И. Резяпкин. Гродно: ГрГУ., 2009
6. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рефф, К. Робертс, Дж. Уотсон. М.: Мир, 1994. Т. 1-3.

Дополнительная

1. Коничев, А.С. Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. М.: Изд. центр «Академия», 2003.
2. Lewin, B. Genes VIII / B. Lewin. Prentice Hall, 2004.
3. Lodish, H. Molecular Cell Biology (5th Edition) / H. Lodish et. al. W.H.Freeman & Company, 2003.
4. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг. М.: Мир, 1998. Т. 1-2.
5. Кухта, В.К. Биологическая химия / В.К. Кухта, Т.С. Морозкина, Э.И. Олецкий, А.Д. Таганович. М.: Минск: Бином. 2008.
6. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. М.: Мир, 1987.
7. Патрушев, Л.И. Экспрессия генов / Л.И. Патрушев. М.: Наука, 2000.
8. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003.
9. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. Новосибирск, 2003.
10. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия/ Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. М.: Высшая школа, 1998.