

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.10 Молекулярная генетика

Направление подготовки 06.03.01 «Биология»

Профиль образовательной программы «Микробиология»

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций	
1.1 Лекция № 1 Введение в молекулярную генетику	3
1.2 Лекция № 2 Структура и свойства ДНК	7
1.3 Лекция № 3 Организация генома прокариот	10
1.4 Лекция № 4 Организация генома эукариот	15
1.5 Лекция № 5 Репликация ДНК	17
1.6 Лекция № 6 Транскрипция. Трансляция	21
1.7 Лекция № 7 Репарация ДНК	27
1.8 Лекция № 8 Полимеразная цепная реакция. История открытия и сущность метода. Применение	30
1.9 Лекция № 9 Секвенирование. Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК	37
1.10 Лекция № 10 Гибридизация ДНК	47
2. Методические указания по выполнению лабораторных работ	
2.1 Лабораторная работа № 1 (ЛР-1) Молекулярная и пространственная организация РНК. Типы РНК и их распространенность	51
2.2 Лабораторная работа № 2 (ЛР-2) Бактериальные плазмиды. IS-элементы и транспозоны бактерий	53
2.3 Лабораторная работа № 3 (ЛР-3) Мобильные диспергированные гены эукариот, их разнообразие и классификация. Ретропозоны. Псевдогены	55
2.4 Лабораторная работа № 4 (ЛР-4) Неядерные геномы. Особенности структуры ДНК митохондрий и хлоропластов	60
2.5 Лабораторная работа № 5 (ЛР-5) Структура и уровни компактизации хроматина у эукариот. Нуклеосомы	65
2.6 Лабораторная работа № 6 (ЛР-6) Итоговое занятие за 1 модуль	69
2.7 Лабораторная работа № 7 (ЛР-7) Ферменты биосинтеза ДНК прокариот	69
2.8 Лабораторная работа № 8 (ЛР-8) ДНК-полимеразы эукариот. Элонгация и терминация репликации ДНК эукариот. Репликация теломерных участков эукариотических хромосом.	71
2.9 Лабораторная работа № 9 (ЛР-9) Репликация РНК, специфическая репликаза. Репликация геномов ретровирусов.	72
2.10 Лабораторная работа № 10 (ЛР-10) Итоговое занятие за 2 модуль	76
2.11 Лабораторная работа № 11 (ЛР-11) Молекулярные механизмы транскрипции. Промоторы про- и эукариот.	77
2.12 Лабораторная работа № 12 (ЛР-12) Белковые факторы транскрипции.	81
2.13 Лабораторная работа № 13 (ЛР-13) Генетический код и его свойства	88
2.14 Лабораторная работа № 14 (ЛР-14) Биосинтез белка в митохондриях. Трансляция в хлоропластах.	91
2.15 Лабораторная работа № 15 (ЛР-15) Итоговое занятие за 3 модуль	92
2.16 Лабораторная работа № 16 (ЛР-16) Модификации полимеразной цепной реакции	93
2.17 Лабораторная работа № 17 (ЛР-17) Знакомство с методикой проведения полимеразной цепной реакции. Техника выделения ДНК. Амплификация	95
2.18 Лабораторная работа № 18 (ЛР-18) Знакомство с методикой проведения полимеразной цепной реакции. Учёт результатов	97
2.19 Лабораторная работа № 19 (ЛР-19) Технология микрочипов	97
2.20 Лабораторная работа № 20 (ЛР-20) Итоговое занятие за 4 модуль.	99

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1.1 Лекция №1 (2 часа).

Тема: «Введение в молекулярную генетику».

1.1.1 Вопросы лекции:

1. История развития молекулярной генетики.
2. Практическое применение молекулярной генетики.

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. История развития молекулярной генетики.

Молекулярная генетика, раздел генетики и молекулярной биологии, ставящий целью познание материальных основ наследственности и изменчивости живых существ путём исследования протекающих на субклеточном, молекулярном уровне процессов передачи, реализации и изменения генетической информации, а также способа её хранения.

Предметом изучения М.г. являются структурно-функциональная организация генетического аппарата клеток и механизм реализации наследственной информации.

М. г. выделилась в самостоятельное направление в 40-х гг. XX в. в связи с внедрением в биологию новых физических и химических методов (рентгеноструктурный анализ, хроматография., электрофорез, высокоскоростное центрифугирование, электронная микроскопия, использование радиоактивных изотопов и т. д.), что позволило гораздо глубже и точнее, чем раньше, изучать строение и функции отдельных компонентов клетки и всю клетку как единую систему. С новыми методами в биологию пришли новые идеи физики и химии, математики и кибернетики. Большую роль в быстром развитии М. г. сыграло перенесение центра тяжести генетических исследований с высших организмов (эукариотов) – основных объектов классической генетики, на низшие (прокариоты) – бактерии и многие другие микроорганизмы, а также вирусы. Преимущества использования более простых форм жизни для решения генетических проблем заключаются в быстрой смене поколений у этих форм и возможности изучать одновременно огромное число особей; благодаря этому сильно возрастает разрешающая способность генетического анализа и повышается его точность. Кроме того, сравнительная простота организации бактерий и особенно вирусов облегчает выяснение молекулярной природы генетических явлений.

За свою недолгую историю М. г. достигла значительных успехов, углубив и расширив представления о природе наследственности и изменчивости, и превратилась в ведущее и наиболее быстро развивающееся направление генетики.

История развития молекулярной генетики

Открытие нуклеиновых кислот связано с именем молодого врача из города Базеля (Швейцария) Фридриха Мишера. После окончания медицинского факультета Мишер был послан для работы над диссертацией в Тюбинген (Германия), где приступил к работе в биохимической лаборатории. Ему было поручено заняться изучением химического состава гноя. Для получения материала пришлось связаться с хирургическим отделением местной больницы, где собирались бинты, снятые с больных при перевязках. Мишер выделил из лейкоцитов новое вещество. Это вещество не распадалось при действии протеолитических ферментов и содержало большое количество фосфора.

Новое вещество было подвергнуто элементарному анализу. В нем оказалось 14% азота и примерно 6% фосфора. Ввиду ядерного происхождения Мишер предложил для него название «нуклеин» (лат. «нуклеус» – ядро). В 1869 г. он вернулся в Базель. Здесь Мишер решил выделить нуклеин из ядер других клеток. Он изолировал из молок рейнского лосося высокоочищенный нуклеин, который ему удалось разделить на составные части: белковоподобный компонент, обладающий щелочными свойствами, и

остаток, не содержащий белка. Этот остаток содержал высокий процент фосфора. Белковоподобный компонент нуклеина исследователь назвал протамином.

Свободный от белка остаток нуклеина был назван в 1889 г. нуклеиновой кислотой. Это название оказалось удачным и сохранилось до настоящего времени. В ядрах молотых рыб присутствовали, таким образом, и нуклеиновая кислота, и щелочной протамин. Мишер высказал предположение, что оба эти вещества находятся в ядрах в комплексе.

Ботаник Захариас в 1881 г. экспериментально показал, что нуклеин действительно содержится в хромосомах. Эти опыты были поставлены на различных клетках как растительного, так и животного происхождения.

Исследованием химического состава нуклеина, полученного Мишером, занялся Альбрехт Коссель. Коссель выделил из продуктов гидролиза нуклеиновых кислот ранее неизвестные химикам вещества — азотистые основания аденин и ксантин. Был выделен также уже известный гуанин. Его получали из гуано (экскрементов птиц). Затем Косселем и его учениками были выделены тимин и цитозин. Коссель был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине 10 декабря 1910 года за свои исследования клеточной биологии, химического состава клеточного ядра и за свою работу по выделению и описанию нуклеиновых кислот. Кроме идентификации некоторых продуктов гидролитического расщепления нуклеиновой кислоты, важная заслуга Косселя состоит в открытии белка со щелочными свойствами в ядрах клеток разных тканей. Ученый предложил для обнаруженного им белка название «гистон» (от «histos» — ткань, греч.).

Одно из главных достижений М. г. — выяснение химической природы гена. Классическая генетика установила, что все наследственные потенции организмов (их генетическая информация) определяются дискретными единицами наследственности — генами, локализованными главным образом в хромосомах клеточного ядра, а также в некоторых органеллах цитоплазмы (пластидах, митохондриях и др.). В 1928 г. Фредерик Гриффит открыл «трансформирующее начало», которым бактерии обмениваются друг с другом, что приводит к изменениям их генотипа. В 1944 г. были опубликованы результаты опытов Эвери и сотрудников (США) по трансформации бактерий. Явление трансформации было открыто в 20-х годах нашего столетия микробиологом Гриффитом (Англия). В 1928г. Гриффит обнаружил, что один штамм пневмококка, культивируемый в особых условиях *in vitro*, утратил способность к синтезу своего полисахарида и поэтому рос на твердой среде в виде так называемых складчатых колоний (R-формы), отличных от гладких, блестящих колоний клеток, имеющих капсулы (S-формы). При этом S-форма пневмококков была вирулентной, а R-форма не вызывала заболевания. Способность иметь капсулу — наследственно закрепленное свойство пневмококков. Открытие Гриффита состояло в том, что прибавление к бескапсульным формам бактерий экстракта из капсульных форм вызывало трансформацию: R-формы пневмококков превращались в S-формы. Гриффиту удалось произвести трансформацию пневмококков и *in vivo*. Он вводил мышам небольшое количество живых R-форм и большие дозы S-форм, убитых нагреванием. В результате мыши погибали, причем из погибших животных удалось выделить жизнеспособные S-формы пневмококков. Таким образом, стало ясно, что от одного штамма бактерий к другому возможна передача наследственного начала, однако химическая природа его не была обнаружена.

Эвери и сотрудники поставили перед собой задачу выяснить химическую природу трансформирующего агента. Они разрушали суспензию пневмококков и удаляли из экстракта белки, капсульный полисахарид и РНК, однако трансформирующая активность экстракта сохранялась. Активную субстанцию можно было несколько раз переосаждавать спиртом. Это вещество было идентифицировано Эвери по цветной реакции как ДНК. Трансформирующая активность препарата не терялась при его обработке кристаллическим трипсином или химотрипсином, панкреатической рибонуклеазой. Было ясно, что препарат не являлся ни белком, ни РНК. Однако трансформирующая активность препарата полностью утрачивалась при обработке его дезоксирибонуклеазой.

Новым доказательством прямой генетической роли ДНК явились опыты вирусологов Херши и Чейз. При этом ДНК фага метилась Р, а белок фага – S. Используя такой фаг с двойной меткой, они показали, что при фаговом заражении клеток *E. coli* внутрь бактериальной клетки проникает в основном только фаговая ДНК и лишь ничтожное количество белка фага. Основная масса вирусного белка остается снаружи бактериальной клетки. Эта ДНК фага затем обеспечивает синтез себя самой, а также синтез белков фага внутри клетки-хозяина. Из полученных ДНК и белков вновь собираются характерные фаговые частицы. В 1969 году Алфред Херши получил Нобелевскую премию (совместно с Максом Дельбрюком и Сальвадором Лурией) за открытия, касающиеся механизма репликации и генетической структуры вирусов.

М. г. достигла выдающегося успеха и в решении важнейшей задачи, сформулированной ещё классической генетикой, – каким образом ген определяет признак, или как происходит реализация генетической информации. Предпосылкой послужило сформулированное ещё в 1941 Дж. Бидлом и Э. Тейтемом положение "один ген – один фермент". Это положение позволило поставить вопрос в следующем виде: как гены, т. е., по сути дела, участки молекулы ДНК, определяют химическую структуру и свойства белков, специфическую для данного организма? В 1954 году Гамов неожиданно внёс существенный вклад в становление новой дисциплины — молекулярной биологии, впервые поставив проблему генетического кода. Он понял, что структура основных строительных блоков клетки — белков, состоящих из 20 основных (природных) аминокислот, — должна быть зашифрована в последовательности из четырёх возможных нуклеотидов, входящих в состав молекулы ДНК. Исходя из простых арифметических соображений, Гамов показал, что "«при сочетании 4 нуклеотидов тройками получаются 64 различные комбинации, чего вполне достаточно для „записи наследственной информации“», и выразил надежду, что «кто-нибудь из более молодых учёных доживёт до его [генетического кода] расшифровки». Таким образом, он был первым, кто предположил кодирование аминокислотных остатков триплетами нуклеотидов. Расшифровка принципов, на которых основан генетический код, была осуществлена в 1962 Ф. Криком с сотрудниками в генетических опытах с мутантами одного бактериального вируса. Оказалось, что каждая тройка нуклеотидов в цепи ДНК (триплет, кодон) определяет, какая именно из 20 аминокислот займёт данное место в полипептидной цепи синтезируемого белка, т. е. каждый триплет кодирует определённую аминокислоту. Последующие работы позволили полностью расшифровать генетический код и установить нуклеотидный состав всех триплетов, кодирующих аминокислоты, а также состав иницирующего кодона, определяющего начало синтеза данной полипептидной цепи, и трёх терминирующих кодонов, определяющих конец синтеза. Расшифровка генетического кода сыграла выдающуюся роль в выяснении механизма биосинтеза белка – процесса, включающего перенос заключённой в ДНК генетической информации на молекулы т. н. информационной, или матричной, РНК (и-РНК). Этот процесс, сущность которого составляет синтез и-РНК на матрице ДНК, получил название транскрипции. Информационная РНК связывается затем с особыми клеточными структурами – рибосомами, на которых и осуществляется синтез полипептидной цепи в соответствии с информацией, записанной в молекуле и-РНК. Этот процесс синтеза полипептидных цепей при посредстве и-РНК назван трансляцией.

РНК-зависимая ДНК-полимераза была открыта Говардом Теминым в Университете Висконсин-Мэдисон и независимо Дэвидом Балтимором в 1970 году в Массачусетском технологическом институте. Оба исследователя получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины в 1975 году.

В 1980 г. Бергу была присуждена половина Нобелевской премии по химии «за фундаментальные исследования биохимических свойств нуклеиновых кислот, в особенности рекомбинантных ДНК». Годом рождения генетической инженерии считают 1972 год, когда в лаборатории Берга была получена *in vitro* первая рекомбинантная молекула ДНК путем объединения линейных фрагментов ДНК. Это послужило толчком для бурного развития генетической инженерии. Были сконструированы первые

плазмидный (Cohen et al, 1973) и фаговый (Murray, Murray, 1974) векторы, разработаны новые методы объединения (рекомбинации) молекул ДНК in vitro, выявлены основные закономерности экспрессии генов в чужеродном окружении.

Артур Корнберг выделил и очистил фермент ДНК-полимеразу, который катализирует копирование (репликацию) ДНК при делении клетки.

Впервые экспериментально воспроизвёл ферментативный синтез ДНК и РНК (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1959, совместно с Северо Очоа).

Фредерик Сэнгер дважды лауреат Нобелевской премии, за определение последовательности инсулина (1958) и за метод секвенирования ДНК (1980)

Роджер Дэвид Корнберг — член Национальной академии наук Соединенных Штатов и американской Академии Искусств и Наук. В 1997 году Корнберг стал лауреатом премии Харви. А в 2006 году был удостоен Нобелевской премии по химии за исследование механизма копирования клетками генетической информации.

2. Практическое применение молекулярной генетики.

Практическое применение молекулярной генетики открывает большие перспективы переделки наследственной природы организмов.

Началась эпоха интегральных исследований геномов, которые образовали специфический раздел молекулярной генетики – геномику. Геномика сегодня занимается анализом структуры и функций геномов как интегрального функционального массива генов, их регуляторных элементов и других последовательностей, необходимых для функционирования генома. В круг ее интересов входит также анализ появившихся и закрепившихся в геноме паразитических эгоистических элементов, значимость которых для существования и эволюции геномов еще предстоит узнать. Начавшись с исследований генома человека, геномика значительно расширила диапазон своих интересов и включила в них множество модельных организмов бактерии и дрожжи, нематоду, дрозофилу и мышь, геномы которых исследуются и сравниваются между собой для расшифровки структурных основ их функциональной организации. Возникло единое пространство геномной информации, которое стремительно наращивает свой информационный потенциал. Сравнительный анализ структур геномов различных организмов составляет отправную точку для функциональной геномики, которая призвана определять функциональную значимость вновь определяемых последовательностей. Концепция "в гомологии структур зашифрована аналогия функций" оказывается весьма плодотворной и помогает устанавливать функции генов человека на основании известных функций генов модельных организмов. Таким образом, современная молекулярная генетика оперирует в едином геномно-информационном поле, где информация о функциях генов в различных организмах интегрируется и распространяется на другие организмы.

Анализ функций генов не ограничивается только пассивным сравнением их структур.

Важнейшую роль в структурных исследованиях генома играет изучение его полиморфизма. Этот раздел молекулярной генетики является основой для понимания принципов молекулярной эволюции, механизмов возникновения патологических мутаций, для оценки факторов риска при воздействии потенциальных токсических агентов окружающей среды на человеческий организм, наконец, для понимания основ различной индивидуальной восприимчивости лекарств.

Стремительное накопление фундаментальной информации имеет немедленные и глубокие практические последствия для биотехнологии, медицины и сельского хозяйства и множества других жизненно важных проблем, из которых, возможно, важнейшей является экология.

В области биотехнологии молекулярная генетика создает фундаментальные основы для создания продуцентов различного рода веществ по двум направлениям. Во-первых, в ходе идентификации новых генов человека и других организмов выявляются все новые биорегуляторы и их рецепторы, которые можно использовать в качестве лекарственных

препаратов для ветеринарии и медицины. Во-вторых, совершенствуются системы экспрессии различного рода генов в разнообразных клетках и организмах, что в свою очередь создает две перспективы: создание клеток (бактериальных и эукариотических) и организмов (растений и животных), продуцирующих различного рода вещества, которые далее могут использоваться как лекарства, пищевые добавки, ферменты в заводских процессах или компонентов диагностикумов или вакцин, а также для создания организмов с улучшенными свойствами, например, трансгенных растений, устойчивых к засухам или имеющих повышенную переносимость к засоленным почвам, или животных, устойчивых к инфекциям. Можно сказать, что развитие молекулярной генетики перевело биотехнологию на уровень целых организмов, заложило предпосылки экологически чистых технологических процессов и интенсивных сельскохозяйственных технологий. Это особенно важно ввиду намечающихся демографических и экологических кризисов перенаселенной планеты.

Широкое использование на практике достижений М. г. наглядно демонстрирует справедливость того, что успехи любых сугубо теоретических наук исключительно важны для научно-технического прогресса и практической деятельности человечества.

1.2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Структура и свойства ДНК».

1.2.1 Вопросы лекции:

1. Структура ДНК. Компоненты молекулы ДНК и соединяющие их химические связи.
2. Размер молекул ДНК. Разнообразие форм ДНК.
3. Гибридные спирали ДНК-РНК.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

Первые работы Петра Левина в США и сотрудников были посвящены изучению состава и строения углеводного компонента нуклеиновой кислоты. Сначала был выделен в кристаллическом виде углеводный компонент, который оказался моносахаридом – пентозой, которую назвали D-рибозой. После идентификации рибозы и дезоксирибозы нуклеиновые кислоты получили новые названия. Те, которые содержали рибозу, стали называть рибонуклеиновыми кислотами или, сокращенно, РНК, а те, которые содержали дезоксирибозу, стали называть дезоксирибонуклеиновыми кислотами, или ДНК. Левин пришел к выводу, что нуклеиновые кислоты являются полимерами. В качестве мономеров служат нуклеотиды. Содержание каждого из четырех нуклеотидов в ДНК или РНК, по данным химического анализа того времени, представлялось Левину равным. Поэтому Левен предложил следующую теорию строения нуклеиновых кислот: они являются полимерами, мономерами которых служат блоки из четырех нуклеотидов, соединенных последовательно.

Было показано, что ДНК находится не только в ядрах животных клеток, но и широко распространена в ядрах растительных клеток. В 1936 г. молодой советский ученый, ставший впоследствии академиком, А. Н. Белозерский впервые препаративно выделил ДНК в чистом виде из растительного материала – из ростков конского каштана.

1. Структура ДНК. Компоненты молекулы ДНК и соединяющие их химические связи.

Нуклеиновые кислоты играют основную роль в хранении и реализации генетической информации. Различают два вида нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), которые обеспечивают хранение генетической информации, и рибонуклеиновые кислоты (РНК), принимающие участие в ее реализации.

Нуклеиновые кислоты являются биологическими полимерами, мономерами которых являются нуклеотиды. Нуклеотид состоит из трех компонентов: азотистого основания, сахара пентозы и остатка фосфорной кислоты. В качестве гетероциклических азотистых оснований ДНК содержит два пурина (двущиклические) – аденин (А) и гуанин (Г) и два пиримидина (моноциклические) – тимин (Т) и цитозин (Ц). В состав ДНК входит сахар 2-дезоксирибоза. Часть нуклеотида, состоящая из сахара с присоединенным к нему азотистым основанием называется **нуклеозидом**. После окончания цикла синтеза ДНК некоторые пуриновые и пиримидиновые основания могут подвергаться химической модификации (например, метилирование). Мономерные остатки в нуклеиновых кислотах связаны между собой 3'-5' фосфодиэфирными связями. Эта связь осуществляется только за счет 3'-ОН одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН другого. Цепочка нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями представляет собой первичную структуру нуклеиновых кислот. Для ДНК характерна двухцепочечная структура.

В лаборатории биохимии Колумбийского университета в Нью-Йорке Чаргафф начал с идеи о том, что если различные виды ДНК проявляют различную биологическую активность, то тогда обязательно должны существовать различия и в химическом составе нуклеиновых кислот. Чаргафф принялся искать разницу в нуклеотидном составе и расположении нуклеотидов в препаратах ДНК, полученных из различных источников. Методы, позволяющие точно дать химическую характеристику ДНК, в то время отсутствовали. Такие методы были развиты Чаргаффом, и они дали удивительные результаты. Хотя разные ДНК и различались значительно по своему нуклеотидному составу, все они подчинялись определенным общим правилам. Поразительным оказалось то, что в каждом образце ДНК число молекул аденина было равно числу молекул тимина, а гуанина – молекул цитозина.

Правила Чаргаффа

Первое правило Чаргаффа: $A/T = G/C = 1$.

Второе правило Чаргаффа: $A+G=C+T$, т. е. количество пуринов в ДНК равно количеству пиримидинов.

Третье правило Чаргаффа: $A+C=G+T$, т. е. количество оснований с аминогруппами в положении 6 равно количеству оснований с 6-кетогруппами.

В 1953 г. молодые ученые Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик создали структурную модель молекулы ДНК, которая полностью соответствовала правилам Чаргаффа.

Основания, образующие пары, получили название **комплементарных**. В АТ-паре основания соединены двумя водородными связями, в GC-паре – тремя водородными связями, поэтому GC-пары существенно более стабильны. Канонические пары энергетически наиболее выгодны. Кроме канонических, основания способны образовывать другие, неканонические пары. Однако, образование таких пар нарушает геометрию спирали, поэтому неканонические пары в составе ДНК в норме не встречаются. Т.о., последовательность оснований в одной цепи определяет их последовательность в другой. Комплементарность последовательности оснований в двух полинуклеотидных цепях – ключевое свойство ДНК.

Пуриновые и пиримидиновые основания уложены в стопку и направлены внутрь спирали, расстояние между парами оснований 0,34 нм. Плоскости колец оснований перпендикулярны главной оси спирали. Длина витка спирали (полный оборот спирали, шаг спирали) – 3,4 нм. На один виток спирали приходится 10 нуклеотидных остатков в одной цепи. Диаметр спирали – 2 нм.

В водном растворе азотистые основания (являются гидрофобными), располагаются друг над другом, уменьшая тем самым контакт с молекулами воды. При образовании таких стопок во взаимодействие вступают функциональные группы одного основания и пи-электронные системы соседнего с ним по вертикали основания. "Вертикальные" взаимодействия (стекинг-взаимодействия) обусловлены в основном ван-дер-ваальсовыми

силами. Т.о. вторичная структура ДНК поддерживается водородными связями и стекинг-взаимодействиями.

2. Размер молекул ДНК. Разнообразие форм ДНК.

Молодые и безвестные ученые встретились впервые в 1951 г. в Кембридже (Англия). В то время Морис Уилкинс и Розалинд Фрэнклин получили в Лондоне рентгенограммы ДНК. При этом оказалось, что ДНК может давать два типа структур в зависимости от содержания воды в препарате. При значительной гидратации ДНК находится в так называемой В-форме, которая переходит в кристаллическую А-форму при потере воды. По характеру рентгенограммы В-формы ДНК Уотсон и Крик поняли, что исследуемая структура находится в спиральной конформации. Они знали также, что молекула ДНК представляет собой длинную линейную полимерную цепь, состоящую из мономеров-нуклеотидов.

Правые спирали образуют два семейства: А-семейство и В-семейство (отличаются конформацией в молекуле сахара). Структуры в пределах каждого из семейств в зависимости от условий (концентрации соли, температуры) могут иметь разное число пар на виток спирали, разный наклон пар к оси спирали и т.д.

А-семейство ДНК. Еще до открытия двойной спирали Р. Франклин получила экспериментальные свидетельства существования весьма упорядоченной структуры в ориентированных вытягиванием и подсушенных (влажность 75%) волокнах ДНК. Эта структура получила название А-форма ДНК. Этой форме долго на придавали значения, т.к. она возникала при малой влажности, т.е. не при физиологических условиях.

Параметры А-формы: 11 оснований на виток; основания образуют угол 20 градусов к оси спирали; расстояние между парами оснований 0,256 нм; диаметр 2,3 нм (23 Å). Требуется присутствие ионов Na^+ , K^+ , Cs^+ . В неблагоприятных условиях некоторые бактерии превращаются в споры. Их ДНК находится в А-форме. В этом состоянии ДНК в 10 раз более устойчива к действию ультрафиолетового излучения.

В-семейство: Характерно структурное разнообразие. В-форма: 10 пар оснований на виток; шаг спирали – 3,4 нм; расстояние между парами оснований – 0,34 нм; диаметр спирали – 2 нм (20 Å).

С-форма: Образуется при 66% влажности в присутствии ионов Li^{2+} . 9,3 пар оснований на виток; шаг спирали – 3,32 нм; расстояние между парами оснований – 0,332 нм; диаметр 1,9 нм (19 Å).

D и E-формы. 8 и 7,5 пар оснований на виток, обнаружены в молекулах ДНК, не содержащих гуанина.

Z-форма ДНК: Левая спираль. Обнаружена у полинуклеотида с чередующейся последовательностью dG-dC. В растворе с низкой ионной силой этот полинуклеотид образует двойные спирали В-типа. При высокой концентрации солей (MgCl_2 , NaCl) или добавлении спирта эта двойная спираль переходит в левую Z-форму. Стекинг-взаимодействия связывают только остатки цитозина. Параметры: 12 оснований на виток; шаг спирали – 3,71 нм (3,4 нм); расстояние – 0,37 нм; диаметр – 1,8 нм (18 Å).

В-форма и Z-форма переходят друг в друга при изменении ионной силы раствора. Для осуществления перехода не требуется расхождения цепей. Он инициируется разрывом водородных связей у нескольких пар оснований.

Третичная структура ДНК. Под третичной структурой подразумевается общая форма молекул. На этом уровне структура как белков, так и нуклеиновых кислот не имеет определенных типов с жестко заданными параметрами. ДНК может иметь линейную или кольцевую форму. Третичная структура линейных и кольцевых форм ДНК характеризуется спирализацией и супер(сверх)спирализацией.

Четвертичная структура ДНК – укладка молекул в полимолекулярные ансамбли. Для нуклеиновых кислот это – ансамбли, включающие также молекулы белков (хроматин).

3. Гибридные спирали ДНК-РНК.

Гибридные спирали ДНК-РНК. Они образуются при транскрипции последовательности ДНК в комплементарную ей последовательность РНК, при этом примерно 40 н. п. в области активного центра РНК-полимеразы представляют такой гибрид. Гибридная спираль ДНК-РНК формируется и тогда, когда обратная транскриптаза осуществляет синтез ДНК на РНК-матрице, а также в ходе репликации при образовании коротких молекул РНК-праймеров. Отмечено, что обе цепи полинуклеотидного комплекса – цепь ДНК и цепь РНК – построены из нуклеотидов с 3'-эндоконформацией сахара. Структура таких гибридных спиралей (гетеродуплексов) напоминает А-ДНК, при этом В-ДНК должна перейти в А-форму до образования гибрида с РНК.

1.3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Организация генома прокариот».

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Ядерный аппарат и хромосомные гены бактерий.
2. Размеры и структура геномов. Регуляторные элементы генома прокариот.
3. Формирование и эволюция геномов
4. Генетический материал вирусов и профага.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Ядерный аппарат и хромосомные гены бактерий.

К прокариотам относятся два домена (царства) организмов – бактерии и археи, которые в отличие от эукариот (третий домен живого мира) не содержат клеточных ядер и размножаются бинарным делением.

Между собой археи и бактерии различаются по структуре клеточных стенок и мембран, структуре рибосом, ферментативным механизмам процессов реализации генетической информации (Адхья и др., 2009). В частности, археи имеют сходный с эукариотами, а не с бактериями аппарат репликации и репарации ДНК, а также компоненты транскрипционного комплекса. За 3,5 млрд лет обитания на планете бактерии и археи сформировали биогеохимические циклы, определяющие облик биосферы (Заварзин, 2010). В геномах более 108 видов прокариот содержится почти 90 % всей информации о генетическом биоразнообразии в понятиях молекулярной филогении. Геномы прокариот включают два типа генетических структур: нуклеоид (аналог хромосомы) и внехромосомные элементы (плазмиды, способные к автономной репликации). В состав хромосомы входят: структурные гены, кодирующие белки и РНК, межгенные участки (спейсеры), регуляторные элементы, определяющие работу генов, различные мобильные элементы (табл. 1).

Геном – физическая и генетическая совокупность всех генов и генетических элементов клетки или вируса.

Большую часть генома прокариот (как правило, 80–90 %) составляют последовательности, кодирующие белки и РНК. Интроны у бактерий и архей встречаются как в генах, кодирующих рибосомные и транспортные РНК, так и в белок-кодирующих генах. Однако частота встречаемости интронов в генах прокариот гораздо ниже, чем у эукариот. Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида. Полученные путем секвенирования генома одного конкретного штамма сведения не позволяют говорить о геноме всего вида из-за штаммовых различий в геномном составе и размерах геномов. Так, у разных по патогенности штаммов кишечной палочки различия по количеству генов могут достигать 30 %. Исходя из внутривидовой вариабельности геномов сложились представления о базовом (core) и гибком вспомогательном наборе генов (Шестаков, 2007). Консервативный базовый набор включает гены так называемого «домашнего хозяйства», ответственные за

информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих видовую/родовую принадлежность. В категорию вспомогательных входят операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие из таких генов локализованы в плазидах, мобильных элементах, геномных островках, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида. В процессе эволюции некоторые гены базового набора могут переходить в категорию вспомогательных, а гены вспомогательного набора становятся базовыми.

Под **видовым геномом** следует понимать совокупность всех генов (и базовых, и вспомогательных) всех штаммов данного вида. На основе сведений о базовых наборах рассматривается вопрос о том, каков же минимальный набор генов, необходимых для обеспечения жизни клетки (и для ее искусственного создания). По мнению ряда исследователей, в таком наборе должно быть не менее 200 базовых генов, без которых клетка существовать не может.

2. РАЗМЕРЫ И СТРУКТУРА ГЕНОМОВ В 1956 г. Ф. Жакоб и Э. Вольман предложили кольцевую модель организации бактериальных хромосом. Исследования структур геномов прокариот генетическими и физическими методами (электронная микроскопия, электрофорез в пульсирующем поле и др.), а позднее и посредством полногеномного секвенирования показали, что большинство геномов прокариот представляют собой кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК. У некоторых бактерий обнаружены и линейные хромосомы, однако их структура отличается от эукариотических, которые имеют специальные концевые последовательности, теломеры, и используют при репликации теломеразу. В отличие от эукариот бактерии используют иные механизмы (рис. 2): у стрептомицетов, обладающих линейными хромосомами, к 5'-концам ковалентно присоединены белки, обеспечивающие свободный 3'-ОН конец для инициации репликации. Другой тип линейных хромосом, имеющих ковалентно замкнутые «шпильчатые» концы, обнаружен у спирохет рода *Borrelia*. Некоторые бактерии помимо основной кольцевой хромосомы имеют и дополнительные. Так, две кольцевые хромосомы обнаружены у *Vibrio cholerae*, а у фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* выявлены одна кольцевая и одна линейная хромосомы. Геномы архей представляют собой одну кольцевую хромосому. Исключением является архея *Haloarcula marismortui*, содержащая две кольцевые хромосомы. Полногеномное секвенирование нуклеотидных последовательностей показало, что размеры геномов у культивируемых бактерий находятся в диапазоне от 0,58 млн п.н. у *Mycoplasma genitalium* до 9,2 млн п.н. у *Bradhyrhizobium ponicum* (Боринская, Янковский, 1999) (табл. 2). Размер архейных геномов варьирует более чем в 12 раз, от 0,49 млн п.н. у облигатного симбионта *Nanoarchaeum equitans* до 5,75 млн п.н. у метаногенной археи *Methanosarcina vorans* (Марданов, Равин, 2012). Размер генома в большинстве случаев прямо пропорционален количеству генов при соотношении в среднем один ген на одну тысячу нуклеотидов. Археи и бактерии с наименьшими геномами являются, как правило, паразитами или симбионтами (Бу, Parkhill, 2004). Среди свободноживущих видов небольшие геномы характерны для организмов, живущих в стабильных экологических нишах и обладающих специализированным метаболизмом. Например, у некоторых морских фотосинтезирующих цианобактерий геном составляет 0,6–1,8 млн п.н. Небольшие по размеру геномы имеют и многие гипертермофильные археи (Марданов, Равин, 2012). Организмы с крупными геномами обитают в сложных по структуре экосистемах с широким диапазоном условий. К ним относится большинство почвенных бактерий. Важной характеристикой геномов прокариот является G+C состав, который находится в диапазоне от 23 до 72 %, причем этот параметр не коррелирует с температурой роста: для большинства гипертермофильных архей характерен низкий G+C состав, а стабильность хромосомы обеспечивается комплексом ДНК-связывающих белков.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА ПРОКАРИОТ К числу регуляторных элементов генома относятся промоторы, терминаторы транскрипции, аттенюаторы, сайты связывания регуляторных белков (Адхья и др., 2009). Индивидуально экспрессируемый прокариотический ген помимо кодирующей структуры белка или РНК области содержит промотор и терминатор транскрипции (рис. 6). Гены, вовлеченные в одну функцию, часто располагаются один за другим и транскрибируются в одной мРНК. Такая организация генов называется **опероном**. Гены, сцепленные в составе оперона, регулируются координированно, объединение в оперон облегчает горизонтальный перенос целого кластера генов. **Промотор** – последовательность нуклеотидов в ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической транскрипции. Промоторы имеют два консервативных участка, один из которых необходим для узнавания, а другой – для прочного связывания промотора с РНК-полимеразой. У большинства бактерий это последовательности с консенсусом TTGACA и TATAAT, расположенные на расстояниях 35 и 10 нуклеотидов от точки старта транскрипции. Промоторные области генов могут содержать сайты связывания регуляторных белков – специфические нуклеотидные последовательности, способные взаимодействовать с репрессорами или активаторами транскрипции. Между точкой начала транскрипции и стартовым кодоном обычно расположен сайт связывания рибосом, последовательность которого комплементарна 3'-концу 16S рибосомной РНК. **Терминатор** – участок ДНК, содержащий сигнал (последовательность) окончания транскрипции в конце гена. Как правило, терминаторные последовательности содержат инвертированные повторы длиной несколько нуклеотидов, образующие шпильку в РНК. В остановке транскрипции могут принимать участие также аттенюаторы – ослабители транскрипции. Например, в составе триптофанового оперона *E. coli* содержится аттенюатор, который в условиях избытка триптофана обеспечивает снижение уровня синтеза мРНК, т. е. выполняет важную функцию регуляции экспрессии генов.

Экспрессия генов – процесс, в ходе которого наследственная информация (последовательность нуклеотидов в ДНК) реализуется в синтезе РНК или белка.

3. ФОРМИРОВАНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ

Анализ полных геномов тысяч видов/штаммов прокариот позволил переосмыслить классические постулаты молекулярной филогении, соответствующие представлениям о едином универсальном древе жизни, отражающем концепцию вертикальной эволюции на основе мутационных изменений и дивергенции. В сравнительной геномике для выяснения родственных связей и происхождения таксонов принято использовать понятия **ортологичных** и **паралогичных** генов. По степени гомологии ортологов судят о генетическом родстве видов/штаммов прокариот и на этой основе строят таксономическую классификацию. Наиболее часто молекулярно-филогенетический анализ ведут по консервативным генетическим маркерам, таким как последовательности генов 16S рибосомных РНК или белков аппарата транскрипции/трансляции. Но филогенетические деревья, построенные только по маркерам 16S рибосомной РНК, не отражают реальную историю эволюции вида, поскольку часто не совпадают с деревьями по многим ортологичным белок-кодирующим генам. Вертикальное наследование по принципу бифуркации не является единственным механизмом, определяющим биологическую эволюцию на уровне организмов и сообществ. Помимо мутационной изменчивости важную роль в формировании геномов играют и другие генетические процессы, приводящие к реорганизации геномов, утрате или приобретению генов и сегментов генома, к изменению размеров генома (рис. 10). 1. Эволюция многих таксонов шла по пути редукции геномов. Это характерно для облигатных внутриклеточных патогенов и эндосимбионтов (Смирнов, 2008). У них утеряны гены некоторых путей метаболизма и клеточных процессов, отсутствие которых компенсируется системами клетки хозяина. Экономически «выгодная» редукция геномов направлена на оптимизацию приспособленности микробов к узким специализированным эконишам. При этом могут

теряться как «ненужные» гены (поскольку их функции обеспечиваются организмом хозяина), так и гены, «мешающие» адаптации, например, ответственные за вирулентность или чувствительность к ксенобиотикам. Редукционная эволюция характерна и для свободноживущих микробов, в частности для морских одноклеточных цианобактерий *Prochlorococcus*, обладающих маленькими геномами (1,0–1,8 Мб) и обитающими в относительно гомогенной, обедненной органикой среде. Уменьшение размеров геномов может происходить путем утраты больших сегментов в составе плазмид, профагов, мобильных элементов, геномных островков и т. п., а также в результате инактивации отдельных генов, которые превращаются в псевдогены, элиминируемые посредством делеций (рис. 10). Ключевую роль в эрозии геномов выполняют системы рекомбинации, участвующие в геномных перестройках. 2. Функциональная реорганизация геномов осуществляется через процессы гомологичной и сайт-специфической рекомбинации, транспозиции, обеспечивающей перемещение внутри генома генов и генетических элементов, ответственных за регуляцию экспрессии генов. Такая нестабильность генома связана с наличием IS-элементов с функциями интеграз и транспозаз, участвующих в процессах транспозиции. Геномные перестройки лежат в основе «фазовых вариаций», проявляющихся в системной морфологической изменчивости бактерий, в адаптивном изменении многих признаков, определяющих направленность микроэволюционных процессов в популяциях. От различий в рекомбинационном потенциале зависят и сценарии эволюции геномов. У видов с активной системой транспозаз формирование геномов осуществляется преимущественно через геномные перестройки. Эволюция геномов с низкой рекомбинационной активностью идет по пути мутационных изменений, ответственных за генный полиморфизм.

3. Рекомбинационные механизмы отвечают за увеличение размеров геномов и через образование паралогичных генов, подвергающихся функциональной дивергенции. Образование паралогичных генов увеличивает белковый репертуар, адаптивный потенциал клеток и лежит в основе процессов усложнения клеточной организации. Это происходит в результате дупликации/мультипликации генов с помощью систем неравного кроссинговера, транспозиций (Hahn, 2009). Возможны несколько вариантов реализации судьбы паралогичных генов (рис. 11). 1. *Тандемно дублицированные гены*, чья активность дает безусловные преимущества, могут долго сохраняться в неизменном виде под действием мощного стабилизирующего отбора. Такая консервация увеличивает дозу гена и поддерживает высокий уровень генного продукта, ответственного за жизненно важные признаки. Наличие идентичных копий гарантирует сохранение функции, если произойдет инактивация одного из паралогов. 2. Главным же направлением в эволюционном преобразовании паралогичных генов является их трансформация с разделением функций (субфункционализация) или с образованием новой функции (неофункционализация). В первом случае у одного из паралогов сохраняются все исходные функции, тогда как у другого (а может быть, и у обоих) происходит разделение доменов (рис. 6), контролирующих разные функции: катализ, взаимодействие с лигандами и белками, связывание с ДНК и т. п. В итоге возникают два гена, кодирующих разные продукты. Структурно сходные паралоги, оказавшиеся под контролем различных промоторов, могут функционировать по-разному. Такая субфункционализация характерна для экпаралогов, которые в одной клетке экспрессируются дифференцированно в разных условиях обитания (рН, температура, соленость, наличие субстратов и т. п.). Изменение структуры паралога может привести к его неофункционализации, т. е. к приобретению совсем новой функции, отсутствующей у исходного гена, послужившего источником дупликации. В результате диверсификации паралогичных генов происходила экспансия родственных семейств генов: например, в геноме у обитающей в кишечнике человека бактерии *Bacteroides thetaiotaomicron* обнаружено более 170 паралогичных генов, кодирующих гликозил-гидролазы, расщепляющие в том числе различные олиго- и полисахариды. Вероятность дупликаций при образовании паралогичных генов зависит от их локализации

в геноме и принадлежности к определенной функциональной категории. Наиболее часто дупликациям подвергаются гены, контролирующие сенсорные системы адаптивного ответа, транспорта ионов, синтеза поверхностных полисахаридов, белков рестрикции–модификации, процессов репарации ДНК, аппарата подвижности клеток и др. 4. Увеличение размеров генома и генного репертуара может быть следствием горизонтального переноса генов (ГПГ) как между близкородственными таксонами, так и между филогенетически отдаленными видами и даже между бактериями и археями. Если в результате мутаций и внутригеномных перестроек происходят изменения (перераспределение) в существующем геноме, то ГПГ заключается в приобретении новых генов, генных кластеров и генетических элементов, что ведет к появлению новых признаков, дающих клетке селективные преимущества (Шестаков, 2007; Voto, 2010). ГПГ между генетически далекими партнерами осуществляется через процессы трансформации, конъюгации, трансдукции посредством механизмов сайт-направленной и «незаконной» рекомбинации, путем внедрения плазмид и мобильных элементов. Инновационную ценность представляют три типа ГПГ (рис. 12): 1) привнесение гена, не имеющего гомологов в геноме реципиента; 2) перенос сходного ортологичного гена от филогенетически далекого донора; 3) замещение геном-ксенологом резидентного гена, ответственного за сходную функцию. Полученные «чужеродные» гены можно обнаружить по (1) отличию в нуклеотидном составе и частоте встречаемости кодонов нового сегмента от остальной части генома; (2) по высокой степени сходства с геном из филогенетически далекого таксона; (3) по отличию в положении анализируемого гена на филогенетическом дереве от других генов в геноме. В результате ГПГ организмы получают новые метаболические возможности, системы защиты от патогенов, ксенобиотиков, стрессовых воздействий, факторы оптимизации/регуляции клеточных систем. Чаще всего мишенями ГПГ являются гены, контролирующие процессы вторичного метаболизма, транспортные и сигнальные системы, подвижность клеток, вирулентность, устойчивость к ксенобиотикам, т. е. гены, имеющие большое адаптивное значение. Реже в ГПГ участвуют гены информационных систем (репликации, транскрипции и др., составляющие базовый геном). Клетка служит проточной емкостью, в геноме которой в процессе эволюции элиминируются «ненужные» гены и приобретаются и закрепляются «полезные» гены (кластеры генов), обеспечивающие приспособленность к конкретным экологическим условиям. Приобретенные гены подвергаются амелиорации – унификации + состава и встречаемости кодонов (за счет накопления мутаций) и становятся неотличимыми от генов исходного генома. Поэтому можно надежно отслеживать сравнительно недавние события ГПГ и судить о времени приобретения генов, соотносить процессы формирования геномов с геологическими периодами и экологическими кризисами, изучать динамику региональной биоты. В принципе возможен горизонтальный перенос любых генов, но вероятность их интеграции в геном реципиента лимитируется многими факторами: структурами клеточной поверхности, системами рестрикции–модификации, активностью систем рекомбинации, совместимостью с путями метаболизма, возможностями отбора клеток в популяции. Поэтому лишь небольшая доля перенесенных генов фиксируется стабильно в геноме реципиента. Тем не менее общепринятыми стали представления о том, что ГПГ является мощным ускорителем эволюционного процесса возникновения новых видов/штаммов. Все большую поддержку получает концепция, согласно которой основной вклад в эволюцию прокариот, формирование 984 Н.В. Равин, С.В. Шестаков их геномов внесли именно события горизонтального переноса. В настоящее время успешно разрабатываются методические подходы, направленные на построение новой системы молекулярной филогении, которая соединяет принципы вертикальной эволюции (на основе бифуркации) и горизонтального переноса генов, отражающего пути сетевой эволюции.

2. Генетический материал вирусов и профага.

По определению Х. Френкель-Конрата, «вирусы – это частицы, состоящие из

одной или нескольких молекул ДНК или РНК, обычно (но не всегда) окруженных белковой оболочкой; вирусы способны передавать свои нуклеиновые кислоты от одной клетки-хозяина к другой и использовать ее ферментативный аппарат для осуществления своей внутриклеточной репликации путем наложения собственной информации на информацию клетки-хозяина; иногда вирусы могут обратимо включать свой геном в геном хозяина (интеграция), и тогда они либо ведут "скрытое существование", либо, так или иначе, трансформируют свойства клетки-хозяина». В приведенном определении отмечены характерные особенности жизненного цикла вирусов, которые находят отражение в организации их генома. Вирусы являются внутриклеточными паразитами и используют для своего размножения белоксинтезирующий аппарат клетки-хозяина. Жизненный цикл вируса начинается с проникновения внутрь клетки. Для этого он связывается со специфическими рецепторами на ее поверхности и либо вводит свою нуклеиновую кислоту внутрь клетки, оставляя белки вириона на ее поверхности, либо проникает целиком в результате эндоцитоза. В последнем случае после проникновения вируса внутрь клетки следует его раздевание – освобождение геномных нуклеиновых кислот от белков оболочки, что делает вирусный геном доступным для ферментных систем клетки, обеспечивающих экспрессию генов вируса.

После проникновения вируса в клетку может происходить его размножение, часто сопровождаемое гибелью самой клетки (вирулентный путь развития). Кроме того, вирус может длительное время существовать внутри клетки, внешне ничем себя не проявляя (латентная инфекция). В этом случае его геном встраивается в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с ним или находится во внехромосомном состоянии. После проникновения вирусной геномной нуклеиновой кислоты в клетку заключенная в ней генетическая информация должна быть расшифрована генетическими системами хозяина и использована для синтеза компонентов вирусных частиц. Поскольку для своего размножения вирусы используют главным образом ферментные системы клетки-хозяина, их геном характеризуется относительно малыми размерами и кодирует структурные белки вирионов, а также белки и ферменты, которые перестраивают метаболизм клетки для нужд размножения вируса, делая процесс репликации вирусов максимально эффективным. Геном вирусов, заключенный внутри вирионов, может быть представлен одноцепочечными или двухцепочечными ДНК или РНК. Кроме того, все гены вирусов могут быть заключены в одной хромосоме или разделены на несколько блоков (хромосом), которые все вместе и составляют геном таких вирусов. Например, у реовирусов геном представлен двухцепочечной РНК и состоит из десяти сегментов. Геномы вирусов, содержащих одноцепочечную РНК, также могут быть либо цельными (например у ретровирусов), либо сегментированными (например у ортомиксовирусов или аренавирусов). Геном РНК-содержащих вирусов представлен только линейными молекулами РНК.

Все известные ДНК-содержащие вирусы позвоночных имеют геном, заключенный в одной хромосоме, линейной или кольцевой, одно- или двухцепочечной. У некоторых вирусов, например у вируса гепатита В, геном представлен кольцевой ковалентно замкнутой молекулой двухцепочечной ДНК, в обеих цепях которой в разных местах обнаружены одноцепочечные участки. У нескольких родов, например аденоассоциированных вирусов комплементарные цепи ДНК находятся в различных вирусных частицах.

1.4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Организация генома эукариот».

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Общие особенности. Характерные отличия от прокариотического генома.

2. Последовательности нуклеотидов эукариотического генома.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Общие особенности. Характерные отличия от прокариотического генома.

Как уже упоминалось выше, в отличие от прокариот основная часть генома эукариот находится в специальном клеточном компартменте (органелле), получившем название *ядра*, а значительно меньшая часть – в митохондриях, хлоропластах и других пластидах. Так же, как и у прокариот, информационной макромолекулой генома эукариот является ДНК, которая неравномерно распределена по нескольким хромосомам в виде комплексов с многочисленными белками. Эти ДНК-белковые комплексы эукариот получили название *хроматина*. На протяжении клеточного цикла хроматин претерпевает высокоупорядоченные структурные преобразования в виде последовательных конденсаций-деконденсаций. В соматических клетках при максимальной конденсации в метафазе митоза эти преобразования сопровождаются формированием видимых в микроскопе *метафазных* хромосом. Как морфология метафазных хромосом, так и их число являются уникальными характеристиками вида. Совокупность внешних признаков хромосомного набора эукариот получила название *кариотипа*. Эти признаки широко используются в биологической систематике.

Геном эукариот существенно отличается от генома прокариот по ряду признаков, среди которых необходимо отметить его избыточность. Содержание ДНК у эукариот в расчете на одну клетку в среднем на два-три порядка выше, чем у прокариот, и у разных видов животных изменяется от 168 пг (амфибии) до 1 пг (некоторые виды рыб). У человека имеется ~6 пг ДНК на диплоидный геном, суммарная длина которой приближается к $6 \cdot 10^9$ п.о.

Повышенное содержание ДНК в геноме эукариот нельзя объяснить одним лишь увеличением потребности этих организмов в дополнительной генетической информации в связи с усложнением организации, поскольку большая часть их геномной ДНК, как правило, представлена некодирующими последовательностями нуклеотидов. Размер генома организмов, находящихся на более низких ступенях эволюционного развития, зачастую превышает размеры геномов более высокоорганизованных животных и растений. В настоящее время известно, что большая часть ДНК генома эукариот не кодирует РНК и белки, и ее генетические функции не вполне понятны. Особенности первичной структуры ДНК эукариот позволяют разделить ее на многочисленные семейства и классы, основные из которых кратко рассмотрены ниже.

2. Последовательности нуклеотидов эукариотического генома.

Геном эукариот составляют уникальные и повторяющиеся последовательности нуклеотидов. Содержание уникальных последовательностей в геноме, определенное на основании кинетики реассоциации фрагментированной ДНК, варьирует у разных организмов, и их доля составляет 15-98% от всей ДНК. Несмотря на то, что во фракцию уникальных последовательностей попадают многие структурные гены, большая часть уникальных последовательностей является некодирующей и обычно не включает в себе генетической информации в общепринятом значении этого термина: не кодирует функционально значимые полипептидные цепи или РНК. Хорошо известным примером таких уникальных последовательностей являются интроны, общий размер которых, как правило, на порядок и более превышает суммарный размер экзонов содержащих их генов.

Эволюционное возникновение мозаичной (интрон-экзонной) структуры генов эукариот, так же как и консервативный характер наследования размеров и взаимного расположения интронов в генах, не находит в настоящее время исчерпывающего объяснения из-за кажущегося отсутствия фактора давления естественного отбора на последовательности нуклеотидов без четких биологических функций. Наибольшее распространение получила концепция В. Гилберта (1977 г.), согласно которой появление интронов, по-видимому, совпавшее по времени с эволюционным возникновением

многоклеточных организмов, обеспечило возможность обмена экзонами между неродственными генами (exon shuffling). Такой обмен должен сопровождаться образованием новых белков мозаичного строения, составленных из готовых полипептидных функционально значимых модулей (доменов), ранее принадлежавших другим белкам. Следствием этого, по мнению сторонников данной концепции, было резкое ускорение образования белков и ферментов с новыми функциями, а также глубокие эволюционные преобразования самих организмов, реализующих такие молекулярные механизмы. Эта точка зрения получила название "гипотезы позднего возникновения интронов" (intron late). В соответствии с другой гипотезой Дж.Е. Дарнелла и В.Ф. Дулиттла (1978 г.) современные интроны представляют собой "эволюционные реликты". Когда-то интроны были частью гигантских генов.

Не менее загадочным с эволюционной точки зрения остается и феномен появления в геноме многоклеточных организмов большого количества некодирующих повторяющихся последовательностей. Такие повторы представлены в гаплоидном геноме эукариот множественными копиями. В современной классификации повторов принято различать часто повторяющиеся последовательности, число которых превышает 105 на гаплоидный геном, и умеренно повторяющиеся, представленные 10–104 копиями. Хорошо изученным представителем первых является сателлитная ДНК, которая состоит из коротких tandemных повторов длиной 1–20 п.о., организованных в длинные блоки. Одними из первых среди повторяющихся последовательностей ДНК эукариот были открыты сателлитные ДНК тимуса телят. Свое название они получили на основании того, что при анализе суммарной эукариотической ДНК центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия они сопровождали основной пик оптической плотности в виде плеча (спутника, сателлита). Именно гомогенный нуклеотидный состав фракции сателлитных ДНК, определяемый наличием в ней многочисленных коротких повторов, изменял ее плавающую плотность, что легко обнаруживалось при центрифугировании. В своем классическом определении сателлитных ДНК Р.Д. Бриттен и соавт. (1974 г.) отмечали, что сателлиты – это минорный компонент ДНК, отделяющийся от основной ДНК при равновесном ультрацентрифугировании в градиенте плотности CsCl. Для сателлитов характерен ряд свойств, среди которых наиболее важны: а) быстрая и точная реассоциация в процессе ренатурации ДНК; б) множество копий; в) простая первичная структура; г) гомогенный состав (протяженные кластеры одних и тех же повторяющихся блоков последовательны); д) пурин–пиримидиновая асимметрия в распределении нуклеотидов по цепям ДНК; е) концентрирование в прицентромерном гетерохроматине; ж) ограниченная репликация (недорепликация) при политенизации хромосом; з) нахождение в составе хромосом в виде tandemно (друг за другом) расположенных кластеров. Содержание сателлитной ДНК в геноме эукариот может достигать 5–50% от суммарного количества ДНК. Микро- (от 1 до 4 п.о. в основном повторяющемся блоке) и минисателлитные (с большим числом п.о. в индивидуальном повторе) ДНК характеризуются высокой вариабельностью по числу копий в геномах организмов даже одного вида и в ряде случаев обладают генетической нестабильностью как в норме, так и при некоторых патологических состояниях организмов. Благодаря этому свойству мини- и микросателлиты часто называют tandemными повторами с изменяющимся числом копий VNTR (variable number of tandem repeats).

1.5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Репликация ДНК».

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Полуконсервативный механизм репликации ДНК.

2. Регуляция репликации ДНК.

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Полуконсервативный механизм репликации ДНК

Полуконсервативный механизм репликации ДНК. Перед каждым делением клетки в ней должно удвоиться содержание ДНК, чтобы каждая дочерняя клетка получила полный набор хромосом. Основу каждой хромосомы образует одна двухцепочечная молекула ДНК. Предложенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком модель строения ДНК в форме регулярной двойной спирали сразу же позволила понять принцип копирования ДНК. Ее репликация происходит полуконсервативным способом: две исходные цепи материнской ДНК расходятся, и каждая из них становится матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Таким образом, каждая новая двойная спираль ДНК содержит одну старую и одну новую цепь. Такой механизм репликации ДНК, при котором от одного поколения к другому передается одна из двух материнских цепей ДНК, получил название полуконсервативного и был экспериментально доказан в 1958 году М. Мезельсоном и Ф. Сталь.

Легко представить, что удвоение ДНК происходит вследствие того, что цепи расходятся и каждая цепь служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи ДНК. Каждая дочерняя молекула состоит из одной старой материнской и одной новой синтезированной цепи ДНК.

Общие принципы репликации ДНК.

В основе процесса репликации лежит принцип копирования материнской цепи ДНК с образованием двух идентичных молекул ДНК. В основе синтеза новой цепи ДНК лежит принцип комплементарности азотистых оснований, т.е. последовательность нуклеотидов материнской цепи определяет последовательность нуклеотидов в синтезируемой цепи ДНК

Синтез новых цепей ДНК идет в направлении $5' \rightarrow 3'$.

В основе репликации ДНК лежат принципы антипараллельности и униполярности. Синтез новых цепей ДНК идет в направлении от $5'$ -конца к $3'$ -концу, при этом ДНК-полимеразы – ферменты, синтезирующие новые цепи ДНК, - добавляют нуклеотиды к $3'$ -концу нарастающей цепи ДНК. При этом матричная цепь имеет противоположную ориентацию: $3' \rightarrow 5'$, т.е. ДНК-полимеразы могут передвигаться вдоль матрицы только в направлении от $3'$ к $5'$ -концам.

Реакция синтеза полинуклеотидной цепи ДНК

Механизмы синтеза ДНК хорошо изучены в клетках бактерий, однако имеются доказательства, что в

клетках эукариот процесс протекает аналогичным образом.

Инициация репликации ДНК. Репликация начинается в специфическом участке молекулы ДНК, который называется точка начала репликации или ориджин.

Точка начала репликации (origin) – это участок молекулы ДНК со специфической последовательностью нуклеотидов с большим содержанием пар АТ (последовательность 300 п.н., богата АТ). Специальные иницирующие белки необходимы для связывания ферментов репликации с молекулой ДНК: белок DnaA – для прокариот белок RPA (replication protein A) – для эукариот.

Кольцевая хромосома прокариот имеет одну точку начала репликации, которая называется OriC. В этой точке цепи расходятся и образуются две репликативные вилки, которые движутся в противоположном направлении. Скорость синтеза ДНК в клетках прокариот составляет 500 нукл./сек. Две вилки встречаются на противоположной стороне кольца. В клетках прокариот существует специальный фермент гираза (топоизомераза II), который разделяет две образующиеся кольцевые молекулы ДНК. Антибиотик налидиксовая кислота угнетает размножение бактерий, путем инактивации гиразы. В клетках эукариот этот фермент отсутствует, поэтому налидиксовую кислоту используют в клинической практике для лечения бактериальных инфекций.

Репликация ДНК эукариот начинается одновременно во многих точках начала репликации, от каждой точки движутся две репликативные вилки в противоположных направлениях. Скорость синтеза молекул ДНК эукариот составляет 50 нукл./сек.

Репликон – фрагмент молекулы ДНК, репликация которого происходит под контролем одной точки начала репликации. Кольцевая хромосома прокариот имеет 1 репликон. Геномы эукариот содержат сотни и тысячи репликонов.

Инициация - образование репликативной вилки. Нити ДНК разделяются благодаря действию специальных ферментов и белков.

Хеликаза (от англ. *helix* – спираль) - основной фермент, расплетающий цепи ДНК. У прокариот он называется белок DnaB. Хеликаза разрывает водородные связи между комплементарными основаниями, используя энергию АТФ.

Топоизомеразы – ферменты, которые устраняют положительные сверхвитки перед репликативной вилкой. Эти ферменты временно разрывают нити материнской ДНК в двойной спирали перед репликативной вилкой, после завершения процесса нити ДНК восстанавливают целостность.

SSB - белки – это белки, которые связываются с одноцепочечной ДНК и удерживают матрицу. В результате образуется репликативная вилка, где и происходит синтез новых цепей ДНК.

Механизм действия ДНК-полимераз. Ферменты, катализирующие процесс синтеза новых цепей ДНК называются ДНК-зависимые ДНК-полимеразы. В клетках бактерий существует три типа ДНК-полимераз: ДНК-полимераза I, II, III.

Синтез ДНК в репликативной вилке катализирует ДНК-полимераза III. ДНК-полимераза I играет важную роль в синтезе отстающей цепи и репарации ДНК. ДНК-полимераза II участвует в репарации ДНК. Реакция синтеза. ДНК-полимеразы могут только удлинять (элонгировать) уже существующую полинуклеотидную нить, которую называют затравкой или праймером. В клетках роль затравки играет олигонуклеотид РНК (РНК-праймер), который комплементарен матрице и образует с ней двухспиральный комплекс матрица-затравка. Синтез РНК праймера осуществляет фермент праймаза. Затем ДНК-полимераза синтезирует цепь ДНК, используя 3'-ОН конец праймера. После окончания синтеза ДНК РНК-праймеры удаляются с помощью ферментов – экзонуклеаз.

ДНК-полимераза имеет 2 субстрата: Комплекс матрица – затравка и дезоксинуклеозидтрифосфаты (АТФ, ГТФ, ЦТФ и ТТФ). Реакция осуществляется как удлинение цепи с 3'-конца затравки. Необходимы ионы Mg^{2+} (3' – ОН) конец полинуклеотидной цепи атакует α -фосфат дНТФ, образуя фосфодиэфирную связь. Матрица копируется точно на основе принципа комплементарности.

Кроме полимеризующей активности, ДНК-полимеразы обладают корректирующей активностью: они дважды проверяют нуклеотид, который добавляют в растущую цепь ДНК. Корректирующая активность ДНК-полимераз проявляется в способности отщеплять нуклеотид, некомплементарный матрице, и замещать его комплементарным нуклеотидом.

Асимметричность репликативной вилки. Поскольку ДНК-полимераза наращивает цепь ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$, синтез дочерних цепей идет в противоположном направлении. Одна цепь синтезируется непрерывно (лидирующая), а другая синтезируется прерывисто, в виде фрагментов Оказаки (отстающая). Фрагменты Оказаки – это короткие цепочки ДНК вместе с РНК-праймерами, расположенные на отстающей цепи.

Синтез отстающей цепи. ДНК-полимераза III останавливается перед РНК-праймером предшествующего фрагмента Оказаки. Здесь подключается ДНК-полимераза I, которая удаляет РНК-праймеры предшествующего фрагмента Оказаки и одновременно наращивает 3'-ОН – конец растущей цепи ДНК, заполняя образующуюся брешь. Фермент лигаза соединяет два фрагмента Оказаки, используя АТФ. Таким образом, на отстающей цепи также синтезируется непрерывная цепь ДНК.

Функции теломераз. Проблема недорепликации 3'-концов линейных молекул ДНК заключается в том, что удаление последних РНК-праймеров с 5'-концов обеих цепей дочерней ДНК, приводит к тому, что дочерние цепи оказываются короче материнской на 10-20 нуклеотидов (у организмов разных видов размер РНК-праймеров различен). Проблема недорепликации 3'-концов линейных молекул ДНК эукариот решается с помощью специального фермента – теломеразы.

В случае репликации кольцевых молекул ДНК этой проблемы не существует, т.к. первые РНК-затравки удаляются ДНК-полимеразой I, которая одновременно наращивает 3'-ОН – конец растущей цепи ДНК и заполняет образующуюся брешь.

Ограничение числа клеточных делений. Лимит Хейфлика.

Американский ученый Л. Хейфлик в начале 60-х годов 20 века показал, что культивируемые клетки новорожденных детей могут пройти 80-90 делений, в то время как соматические клетки 70-летних людей делятся 20-30 раз. Такое явление ограничения числа клеточных делений называют “лимитом Хейфлика”.

В 1971 г. А.М. Оловников в своей теории маргинотомии (от лат. *marginalis* – краевой, *toma* - сечение) предположил, что последовательное укорочение ДНК хромосом во время репликации лежит в основе ограниченного числа делений, которое наблюдается у нормальных соматических клеток, растущих в культуре *in vitro*. Позже был обнаружен фермент теломераза, активный в стволовых, половых и раковых клетках, которые способны к бесконечному делению.

Функции теломеразы.

Фермент теломераза впервые был обнаружен в 1985 году у равноресничной инфузории *Tetrahymena thermophila*, а позже – в клетках дрожжей, растений и животных, в том числе в яйцниках человека и иммортализованных (бессмертных) линиях раковых клеток HeLa.

Согласно номенклатуре этот фермент называют теломерной терминальной трансферазой. Теломераза выполняет функции ДНК-полимеразы, которая достраивает 3'-концы линейных молекул ДНК короткими повторяющимися последовательностями нуклеотидов (у позвоночных – ТТАГГГ) в отсутствие ДНК матрицы. В качестве матрицы для синтеза цепи ДНК теломераза использует молекулу РНК, которая является составной частью этого фермента.

Механизм действия теломеразы. В результате того, что после каждой репликации дочерние цепи ДНК оказываются короче материнских на размер первого РНК-праймера (10-20 нуклеотидов), образуются выступающие одонитевые 3'-концы материнских цепей. Они узнаются теломеразой, которая последовательно наращивает материнские цепи на сотни повторов ТТАГГГ, используя 3'-конец материнской цепи ДНК в качестве праймера, а входящую в состав фермента молекулу РНК использует в качестве матрицы. Образующиеся длинные одонитевые концы материнской ДНК в свою очередь служат матрицей для синтеза дочерних цепей по традиционному механизму репликации.

2. Регуляция репликации ДНК.

Синтез ДНК тесно связан с другими процессами, подготавливающими деление клеток, так как передача необходимой генетической информации родительских клеток дочерним является для клеток-потомков жизненно важной. Наличие избыточной генетической информации отрицательно сказывается на жизнеспособности клеток, тогда как недостаток ее, возникающий вследствие недорепликации ДНК, приводит к летальному эффекту из-за отсутствия жизненно важных генов. Однако процесс передачи генетической информации от родительских клеток дочерним у эукариот не ограничивается простой редупликацией ДНК хромосом. Так, для насекомых многих видов характерно наличие гигантских политенных хромосом, которые возникают в результате множественных раундов репликации ДНК исходных хроматид, не сопровождающейся их расхождением.

Политенизация хромосом представляет обширный класс генетических явлений, связанных с избирательной избыточной репликацией (мультипликацией) или недорепликацией отдельных генетических локусов эукариот. Ярким примером такого рода является изменение числа генов рибосомных РНК у животных. Амплификация генов рРНК в ооцитах амфибий происходит путем образования их внехромосомных (экстрахромосомных) копий в виде кольцевых молекул рибосомных (р) ДНК, которые далее реплицируются по механизму "катящегося кольца". При этом в каждой клетке амплифицируется только по одному из сотен повторов рДНК, так что амплификация рДНК на одном повторе каким-то образом подавляет процесс амплификации на других, и все образовавшиеся повторы одного ооцита идентичны, но отличаются от наборов амплифицированных рДНК других ооцитов. Строгая стадие- и тканеспецифичность, а также избирательная амплификация только одного повтора рДНК указывают на наличие тонких регуляторных механизмов процесса репликации и в этом случае.

Характерными примерами возрастания числа генов вследствие их избирательной репликации являются магнификация генов рРНК и изменение числа генов, определяющих устойчивость клеток к лекарственным препаратам. В первом случае утрата части генов рРНК у дрозофилы в результате делеции сопровождается постепенным восстановлением их числа, тогда как во втором случае у клеток, находящихся в условиях селективного действия токсичного для них лекарственного препарата, возрастает число копий генов, необходимых для его нейтрализации. В частности, это характерно для гена дигидрофолатредуктазы в присутствии метотрексата. Высказывается предположение, что в основе изменения числа копий таких генов лежит механизм неравного кроссинговера.

Репликация хромосом бактерий тесно сопряжена с метаболизмом клеток. Например, частота инициаций новых раундов репликации зависит от скорости роста бактериальных клеток, и в клетках быстро растущих бактерий могут содержаться хромосомы с несколькими работающими репликативными вилками, хотя для репликации одной бактериальной хромосомы их требуется только две, инициированные в единственной области начала репликации (*ori*) и расходящиеся в противоположных направлениях. Это позволяет бактериям при благоприятных условиях затратить для генерации меньше времени, чем для полной репликации бактериальной хромосомы. Очевидно, что для поддержания строго упорядоченного характера репликации должны существовать тонкие механизмы регуляции репликации на уровне инициации новых раундов. Такие механизмы, действительно, существуют.

1.6 Лекция №6 (2 часа).

Тема: «Транскрипция ДНК. Трансляция».

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Стадии транскрипции: инициация, элонгация, терминация
2. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции у про- и эукариот

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Стадии транскрипции: инициация, элонгация, терминация

Транскрипция (от лат. *transcriptio* – переписывание) – процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК.

Транскрипция катализируется ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, то есть по матричной цепи ДНК РНК-полимераза движется в направлении 3'→5'

Транскрипция состоит из стадий инициации, элонгации и терминации.

Инициация транскрипции. Инициация транскрипции – сложный процесс, зависящий от последовательности ДНК вблизи транскрибируемой последовательности (а у эукариот также и от более далеких участков генома – энхансеров и сайленсеров) и от наличия или отсутствия различных белковых факторов.

Элонгация транскрипции. Момент перехода РНК-полимеразы от инициации транскрипции к элонгации точно не определен. Три основных биохимических события характеризуют этот переход в случае РНК-полимеразы кишечной палочки: отделение сигма-фактора, первая транслокация молекулы фермента вдоль матрицы и сильная стабилизация транскрипционного комплекса, который кроме РНК-полимеразы включает растущую цепь РНК и транскрибируемую ДНК. Эти же явления характерны и для РНК-полимераз эукариот. Переход от инициации к элонгации сопровождается разрывом связей между ферментом, промотором, факторами инициации транскрипции, а в ряде случаев – переходом РНК-полимеразы в состояние компетентности в отношении элонгации (например, фосфорилирование СТД-домена у РНК-полимеразы II). Фаза элонгации заканчивается после освобождения растущего транскрипта и диссоциации фермента от матрицы (терминация).

На стадии элонгации в ДНК расплетено примерно 18 пар нуклеотидов. Примерно 12 нуклеотидов матричной нити ДНК образует гибридную спираль с растущим концом цепи РНК. По мере движения РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расплетание, а позади – восстановление двойной спирали ДНК. Одновременно освобождается очередное звено растущей цепи РНК из комплекса с матрицей и РНК-полимеразой. Эти перемещения должны сопровождаться относительным вращением РНК-полимеразы и ДНК. Трудно себе представить, как это может происходить в клетке, особенно при транскрипции хроматина. Поэтому не исключено, что для предотвращения такого вращениядвигающуюся по ДНК РНК-полимеразу сопровождают топоизомеразы.

Элонгация осуществляется с помощью основных элонгирующих факторов, необходимых, чтобы процесс не останавливался преждевременно.

Терминация. У бактерий есть два механизма терминации транскрипции:

1. ро-зависимый механизм, при котором белок Rho (ρ) дестабилизирует водородные связи между матрицей ДНК и мРНК, высвобождая молекулу РНК.
2. ро-независимый, при котором транскрипция останавливается, когда только что синтезированная молекула РНК формирует стебель-петлю, за которой расположено несколько урацилов (...УУУУ), что приводит к отсоединению молекулы РНК от матрицы ДНК.

Терминация транскрипции у эукариот менее изучена. Она завершается разрезанием РНК, после чего к её 3' концу фермент добавляет несколько аденинов (...АААА), от числа которых зависит стабильность данного транскрипта.

Трансляцией (от лат. translatio – перевод) называют осуществляемый рибосомой синтез белка из аминокислот на матрице информационной (или матричной) РНК (иРНК или мРНК). Синтез белка является основой жизнедеятельности клетки. Для осуществления этого процесса в клетках всех без исключения организмов имеются специальные органеллы – рибосомы. Рибосомы представляют собой рибонуклеопротеидные комплексы, построенные из 2 субъединиц: большой и малой. Функция рибосом заключается в узнавании трёхбуквенных (трихнуклеотидных) кодонов мРНК, сопоставлении им соответствующих антикодонов тРНК, несущих аминокислоты, и присоединении этих аминокислот к растущей белковой цепи. Двигаясь вдоль молекулы мРНК, рибосома синтезирует белок в соответствии с информацией, заложенной в молекуле мРНК.

Для узнавания аминокислот в клетке имеются специальные «адаптеры», молекулы транспортной РНК (тРНК). Эти молекулы, имеющие форму клеверного листа, имеют участок (антикодон), комплементарный кодону мРНК, а также другой участок, к которому присоединяется аминокислота, соответствующая этому кодону. Присоединение

аминокислот к тРНК осуществляется в энергозависимой реакции ферментами аминоацил-тРНК-синтетазами, а получившаяся молекула называется аминоацил-тРНК. Таким образом, специфичность трансляции определяется взаимодействием между кодоном мРНК и антикодоном тРНК, а также специфичностью аминоацил-тРНК-синтетаз, присоединяющих аминокислоты строго к соответствующим им тРНК (например, кодону GGU будет соответствовать тРНК, содержащая антикодон CCA, а к этой тРНК будет присоединяться только аминокислота глицин).

Поскольку каждый кодон содержит три нуклеотида, один и тот же генетический текст можно прочитать тремя разными способами (начиная с первого, второго и третьего нуклеотидов), то есть в трех разных рамках считывания. За некоторыми интересными исключениями, значимой является информация, закодированная только в одной рамке считывания. По этой причине крайне важным для синтеза белка рибосомой является её правильное позиционирование на стартовом AUG-кодоне – инициация трансляции.

Механизмы трансляции прокариот и эукариот существенно отличаются, поэтому многие вещества, подавляющие прокариотическую трансляцию, в значительно меньшей степени действуют на трансляцию высших организмов, что позволяет использовать их в медицинской практике как антибактериальные средства безопасные для организма млекопитающих.

Процесс трансляции разделяют на

1. инициацию – узнавание рибосомой стартового кодона и начало синтеза.
2. элонгацию – собственно синтез белка.
3. терминацию – узнавание терминирующего кодона (стоп-кодона) и отделение продукта.

Инициация. Механизмы инициации трансляции у про- и эукариот существенно отличаются: прокариотические рибосомы потенциально способны находить стартовый AUG и иницировать синтез на любых участках мРНК, в то время как эукариотические рибосомы обычно присоединяются к мРНК в области кэпа и сканируют её в поисках стартового кодона.

Начальная стадия предусматривает связывание малой рибосомной субъединицы (30S) с мРНК. Это может происходить двумя способами: либо сначала к мРНК присоединяется комплекс, содержащий рибосомную субчастицу (1), а затем к нему привлекается тРНК в комплексе с IF2 и ГТФ (2), либо 30S субъединица изначально связывается с тРНК, а уже потом садится на мРНК (3). К образовавшемуся комплексу приходит большая (50S) рибосомная субъединица (4), инициаторные факторы отсоединяются от 30S субчастицы, что сопровождается гидролизом ГТФ белком IF2 (5), и собранная рибосома начинает элонгировать цепь (6). В правом нижнем углу дана схема инициаторного участка прокариотической мРНК. Отмечены 5' и 3' концы молекулы. RBS – сайт связывания рибосомы, SD – последовательность Шайн-Дальгарно, AUG – инициаторный кодон.

У эукариот существуют два механизма нахождения рибосомой стартового AUG: кэп-зависимый (сканирующий) и кэп-независимый (внутренняя инициация).

Элонгация. В процессе наращивания полипептидной цепи принимают участие два белковых фактора элонгации. Первый (EF1a у эукариот, EF-Tu – у прокариот) переносит аминоацилированную (заряженную аминокислотой) тРНК в А (аминоацил)-сайт рибосомы. Рибосома катализирует образование пептидной связи, происходит перенос растущей цепи пептида с Р-сайтовой тРНК на находящуюся в А-сайте, пептид удлиняется на один аминокислотный остаток. Затем второй белок (EF2 у эукариот, EF-G - у прокариот) катализирует так называемую транслокацию. Транслокация – перемещение рибосомы по мРНК на один триплет, в результате которого пептидил-тРНК оказывается вновь в Р-сайте, а «пустая» тРНК из Р-сайта переходит в Е-сайт (от слова exit). Цикл элонгации завершается, когда новая тРНК с нужным антикодоном приходит в А-сайт.

Терминация. Терминация – окончание синтеза белка, осуществляется, когда в А-сайте рибосомы оказывается один из стоп- кодонов - UAG, UAA, UGA. Из-за отсутствия тРНК, соответствующих этим кодоном, пептидил-тРНК остаётся связанной с Р-сайтом рибосомы. Здесь в действие вступают специфические белки RF1 или RF2, которые катализируют отсоединение полипептидной цепи от мРНК, а также RF3, который вызывает диссоциацию мРНК из рибосомы. RF1 узнаёт в А-участке UAA или UAG; RF-2 - UAA или UGA. С UAA терминация эффективнее, чем с другими стоп-кодонами.

2. Регуляция на уровне инициации транскрипции.

Активность многих генов прокариот регулируется с помощью белковых факторов, взаимодействующих с регуляторными участками промоторов генов. При этом происходят как активация транскрипции генов, так и подавление считывания генетической информации РНК-полимеразами. В первом случае регуляторные белковые факторы называют активаторами, осуществляющими позитивную регуляцию транскрипции, а во втором – репрессорами. Регуляцию, связанную с подавлением транскрипции, называют негативной.

Механизмы, при помощи которых активаторы стимулируют инициацию транскрипции, могут быть рассмотрены с двух точек зрения – кинетической и структурной. Поскольку активация промоторов путем образования открытых комплексов является лимитирующей стадией на пути активации транскрипции в целом, действие различных активаторов может быть охарактеризовано по изменению (увеличению) значений кинетических параметров реакций, происходящих на разных этапах активации. Так, при действии активирующего комплекса Cpr–сАМР на lac-промотор происходит десятикратное увеличение равновесной константы ассоциации K_B РНК-полимеразы с промотором с образованием закрытого комплекса. Активация промотора P_{RM} фага λ , опосредованная cI-белком (см. ниже), характеризуется пяти–десятикратным увеличением константы скорости k_f перехода закрытых комплексов в открытые. Активирующее действие белка λ -сII на промотор P_{RE} сопровождается изменением обоих вышеупомянутых кинетических параметров. Активация транскрипции может быть также опосредована увеличением скорости освобождения промотора РНК-полимеразой после инициации синтеза РНК.

Многие активаторы транскрипции, в том числе и Cpr–сАМР, сгибают молекулу ДНК после взаимодействия с ней, причем центр такого изгиба находится в сайте связывания активатора. Однако с использованием мутантных белков было установлено, что изгибание ДНК и связывание активаторов с ДНК как таковое еще не обеспечивают активацию транскрипции. В большинстве случаев абсолютно необходимым условием активации является наличие контакта между специфическими областями поверхностей молекул активатора и РНК-полимеразы, часто с ее α -субъединицами. Важным следствием образования контактов между активаторами и холоферментом РНК-полимеразы является часто наблюдаемый синергизм в связывании обоих белков с соответствующими промоторами. При этом мутации в сайтах связывания активаторов или промоторе как таковом могут предотвращать активацию транскрипции путем изменения конформации молекулы связанного активатора или контактного участка на РНК-полимеразе.

Последовательности нуклеотидов промоторных участков генов, с которыми взаимодействуют молекулы репрессора, получили название **операторов**. Во многих случаях репрессор связывается с оператором только в присутствии низкомолекулярного лиганда, специфически взаимодействующего с репрессором. Такие низкомолекулярные эффекторы получили название **корепрессоров**. Они часто требуются и для функционирования белков-активаторов транскрипции. Простейший механизм репрессии заключается в стерическом блокировании связывания РНК-полимеразы с промотором. Это происходит в том случае, если последовательности нуклеотидов мест посадки РНК-полимеразы на промотор и репрессора на оператор перекрываются.

Выше было отмечено, что РНК-полимераза в процессе элонгации цепей РНК перемещается неравномерно вдоль матричной ДНК и во время ее движения имеют место остановки (паузы). Время задержки молекул РНК-полимеразы в определенных участках транскрибируемых генов меняется под действием различных белковых факторов. При этом эффективность транскрипции соответствующих фрагментов ДНК зависит от последовательностей нуклеотидов, окружающих транскрибируемые участки генов.

Основная регуляторная роль терминаторов транскрипции заключается в прекращении синтеза РНК на границе гена и освобождении полученной РНК из транскрипционного комплекса. Механизмы функционирования терминаторов уже были кратко рассмотрены в разделе, посвященном транскрипции. Однако терминаторы встречаются не только на границах одиночных генов, но и в конце генов, входящих в состав оперонов. Эффективность терминации транскрипции на таких внутренних терминаторах может регулироваться, что сопровождается изменением скорости синтеза РНК на последовательностях нуклеотидов оперонов, расположенных за терминаторами.

Функционирование аттенуаторов – регулируемых терминаторов транскрипции бактерий, сопряжено с синтезом лидерного пептида рибосомами. Этот тип регуляции используется грамотрицательными бактериями для изменения уровня транскрипции многих оперонов, контролирующих биосинтез аминокислот. Как уже упоминалось, отличительной чертой такого типа регуляции является образование альтернативных вторичных структур РНК, которые формируются под влиянием рибосом, прекращающих трансляцию на кодонах аминокислот, которые клеткам необходимо синтезировать. В дополнение к этому, как прокариоты, так и эукариоты обладают способностью реагировать на многие внеклеточные и внутриклеточные процессы изменением скорости элонгации транскриптов.

Сопряжения транскрипции и репарации ДНК. Многие повреждения ДНК вызывают прекращение элонгации транскриптов у бактерий и эукариот, вызывая переход элонгирующего транскрипционного комплекса в неактивное состояние. При этом преимущественно репарируются транскрибируемые цепи ДНК. Обнаружены белковые факторы, осуществляющие сопряжение транскрипции с репаративным синтезом ДНК. В частности, бактериальный белковый комплекс UvrAB, участвующий в репаративной эксцизии (вырезании) нуклеотидов, может непосредственно взаимодействовать с β -субъединицей РНК-полимеразы, а также с одноцепочечными участками ДНК в составе открытых промоторных и тройных элонгирующих комплексов. У *E. coli* некоторые из этих воздействий обеспечивают контакты между молекулами РНК-полимеразы, прекратившей элонгацию цепей РНК, и репарирующим комплексом, который с помощью фактора, сопрягающего транскрипцию и репарацию, выводит элонгирующий комплекс из состояния прекращения транскрипции. Не все повреждения ДНК оказывают влияние на элонгацию транскриптов РНК-полимеразой. Например, РНК-полимеразы как фага SP6, так и *E. coli* эффективно преодолевают в ДНК брешы, не содержащие азотистых оснований. При прохождении таких участков ДНК молекулы РНК-полимераз обычно включают остатки АМР в элонгируемую РНК независимо от матрицы.

Контроль элонгации РНК у бактериофагов. Во время вирусной инфекции размножающиеся вирусы овладевают контролем над экспрессией генов клетки-хозяина и используют ее для своих собственных нужд, что является общим свойством всех внутриклеточных паразитов и симбионтов. Многие из бактериофагов осуществляют контроль транскрипции на уровне элонгации.

Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции у эукариот

При обсуждении механизмов внутриклеточной передачи сигнала были упомянуты регуляторные белки, взаимодействующие со специфическими последовательностями нуклеотидов генов и получившие название **факторов транскрипции**. Именно эти белки вносят основной вклад в тонко регулируемую экспрессию генов на уровне транскрипции. Больше тысячи таких белков разных организмов уже идентифицированы, а общее их

число, по некоторым оценкам, составляет не менее нескольких тысяч. Эта классификация основана на гомологии первичных и вторичных структур факторов транскрипции. Каждому фактору соответствует пятизначный цифровой код, первая цифра которого относится к суперклассу, вторая – к классу, третья – к семейству, четвертая – к подсемейству и, наконец, пятая является видовой характеристикой фактора.

Все известные факторы транскрипции на основании гомологии первичных структур их полипептидных цепей разделяют на **четыре больших суперкласса**: 1) факторы с доменами, обогащенными основными аминокислотами (284 фактора); 2) факторы с ДНК-связывающими доменами, координирующими ионы Zn^{2+} (148 факторов); 3) факторы, содержащие домены типа "спираль–поворот–спираль" (369 факторов); 4) факторы, содержащие домены типа β -scaffold, образующие контакты с малой бороздкой ДНК (156 факторов). Кроме того, 39 факторов, не попадающих по своим структурным особенностям ни в один из вышеперечисленных суперклассов, отнесены к суперклассу 0. Внутри суперклассов факторы разделяются на классы структурно родственных белков, которые, в свою очередь, подразделяются на семейства и подсемейства. Такое разнообразие регуляторных белков у эукариот обусловлено наличием у них большого количества генов и необходимостью тонкой регуляции их экспрессии на протяжении жизненного цикла.

Факторы транскрипции в роли позитивных регуляторов (активаторов) синтеза РНК. Изучение механизмов функционирования белковых факторов транскрипции – задача непростая. Прежде всего, это связано с их малой концентрацией в клетках и большими сложностями получения факторов в очищенном состоянии для дальнейших биохимических исследований. Развитие генно-инженерных методов позволило получать факторы транскрипции в неограниченных количествах, что не замедлило принести плоды в виде новой информации.

Для того чтобы фактор транскрипции оказал специфическое действие на синтез РНК определенным геном, он, прежде всего, должен распознать этот ген и связаться с определенной последовательностью ДНК. Затем фактор транскрипции должен взаимодействовать с другими факторами или непосредственно с самой РНК-полимеразой для стимуляции или подавления транскрипции на этом гене. Кроме того, необходимость включения и выключения транскрипции в строго определенных месте и времени (тканеспецифический характер экспрессии генов на разных стадиях онтогенеза организма) предполагает наличие механизмов контроля биосинтеза или активации самих факторов транскрипции для упорядочивания их функционирования. Ниже будут рассмотрены механизмы, обеспечивающие эти три этапа функционирования факторов транскрипции – связывание с ДНК, влияние на процесс транскрипции и регуляция их собственной активности.

Механизмы взаимодействия факторов транскрипции с ДНК. Клонирование генов факторов транскрипции (и их фрагментов), а также выделение соответствующих рекомбинантных белков позволили идентифицировать участки их полипептидных цепей, обеспечивающие специфическое взаимодействие факторов с ДНК. Очищенные фрагменты белков были исследованы на способность взаимодействовать с определенными последовательностями ДНК. Это позволило обнаружить несколько структурных элементов (доменов) полипептидных цепей, общих для факторов транскрипции разных типов, которые легли в основу их современной классификации.

Домены типа "цинковые пальцы". Одним из первых факторов транскрипции, полученных в виде очищенного рекомбинантного белка, был фактор TFIIIA, который играет ключевую роль в транскрипции генов 5S рРНК РНК-полимеразой III. Домены типа "цинковые пальцы" обнаружены у многих факторов транскрипции, обеспечивающих функционирование РНК-полимеразы II, в том числе у фактора Sp1, Kruppel-белка *Drosophila*, белков ADRI и GAL4 дрожжей и белка аденовируса E1A. Интересно, что точечная мутация в гене Kruppel-белка, приводящая к замене лишь одного из остатков Cys

на Ser, что, в свою очередь, предотвращает связывание иона Zn^{2+} , фенотипически проявляется как делеция целого гена этого фактора. На данном основании был сделан вывод о том, что способность связывать ионы Zn^{2+} является критической для проявления ДНК-связывающей активности факторов такого типа.

Позитивный контроль транскрипции у эукариот, в котором участвуют многочисленные активаторы транскрипции, играет ключевую роль в регуляции экспрессии их генов на уровне транскрипции. Однако негативная регуляция активности генов у эукариот является столь же жизненно важным регуляторным механизмом, как и у бактерий. Подавление транскрипции необходимо при установлении разделенных во времени и пространстве паттернов транскрипции в клетках различных тканей в онтогенезе, а также при изменении уровней синтеза РНК в ответ на регуляторные изменения в микроокружении клеток. Механизмы негативной регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции у эукариот разнообразны. Некоторые наиболее важные из них будут рассмотрены ниже.

Задержка транспорта факторов транскрипции из цитоплазмы в ядра. Подавление определенных генов может достигаться за счет задержки в цитоплазме соответствующих факторов транскрипции. В хорошо изученном случае белки-активаторы семейства Rel задерживаются в цитоплазме и не переносятся в ядра вследствие их взаимодействия с белковыми факторами IκB. Диссоциация комплексов Rel-IκB, сопровождаемая транспортом Rel-факторов в ядра, контролируется фосфорилированием белков IκB. Rel-семейство факторов транскрипции включает в себя продукт онкогена v-Rel и клеточный гомолог c-Rel, а также морфоген дрозофилы dorsal и ядерный фактор NFκB, взаимодействующий с энхансером В гена иммуноглобулина κ. Последний представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц с молекулярными массами 50 и 65 кДа, и обеспечивает тканеспецифическую экспрессию генов в зрелых В-лимфоцитах. Фактор NFκB участвует в активации транскрипции некоторых генов в ответ на внешние сигналы (например под действием цитокинов) в нелимфоидных клетках.

Предотвращение взаимодействия факторов транскрипции с регуляторными последовательностями на ДНК. Внутрядерное предотвращение связывания активаторов транскрипции с соответствующими регуляторными последовательностями на ДНК является еще одним широко распространенным механизмом негативной регуляции транскрипции у эукариот. В некоторых случаях негативно действующий фактор связывается с регуляторной последовательностью нуклеотидов, которая располагается по соседству с позитивным регуляторным элементом или перекрывается с ним. Это создает стерические препятствия для связывания последним активатора транскрипции, что предотвращает индукцию синтеза РНК. Функционирование такого в основном пассивного механизма зависит от взаимного расположения негативных и позитивных регуляторных последовательностей в промоторе. В данном случае для проявления активности негативного регулятора транскрипции необходимо его связывание с соответствующей последовательностью ДНК, и его действие не распространяется на другие регуляторные последовательности.

1.7 Лекция №7 (2 часа).

Тема: «Репарация ДНК».

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Репарации.
2. Виды репарации.
3. Значение репарации ДНК.

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Репарации.

ДНК – это единственная макромолекула клетки, способная устранять (репарировать) повреждения, возникающие в ее структуре. Более того, в ней закодирована информация о механизмах самых разнообразных репарационных процессов.

Репарация (от лат. *reparatio* – восстановление), свойственный клеткам всех организмов процесс восстановления природной (нативной) структуры ДНК, поврежденной при нормальном биосинтезе ДНК в клетке, а также физич. или химич. агентами. Одновременное повреждение обеих цепей в одном месте и двухцепочечные разрывы часто оказываются летальными для ДНК, поскольку такие дефекты репарируются лишь в редких случаях.

Наиболее часто происходит разрыв гликозидных связей между пурином и дезоксирибозой N (депуринизация) при повышении температуры. За сутки в клетке человека совершается от 5000 до 10000 актов депуринизации. Если не принимать никаких мер, то это приведет к нарушению репликации и экспрессии генов. Кроме того, остатки цитозина и аденина могут подвергаться спонтанному дезаминированию с образованием соответственно остатков урацила и гипоксантина; частота таких событий составляет примерно 100 на геном в сутки. Если подобные нарушения в ДНК не будут устранены до следующего раунда репликации, то они могут послужить источником мутаций.

Многие изменения в структуре ДНК происходят под действием химических веществ, присутствующих в окружающей среде. К таким веществам относятся алкилирующие агенты (например, азотистые соединения, алкилсульфонаты и нитрозомочевина), которые модифицируют предпочтительно гуаниновые остатки; соединения, встраивающиеся между соседними парами оснований и приводящие к появлению вставок и делеций во время репликации; бифункциональные агенты, способные образовывать ковалентные сшивки между двумя цепями ДНК и блокировать их расхождение при репликации. Не менее разрушительными могут быть и физические воздействия. Поглощение тиминovým или цитозиновым основанием ультрафиолетового света может приводить к образованию цикlobутановых димеров между соседними пиримидинами; под действием ионизирующей радиации, например космических лучей, могут образовываться высокореакционноспособные свободные радикалы, оказывающие на ДНК самые разнообразные воздействия; при облучении рентгеновскими лучами в медицинских целях в ДНК могут возникать одно- и двухцепочечные разрывы, а также другие повреждения, характерные для воздействия на ДНК свободных радикалов.

Осуществляется спец. ферментными системами клетки. Наиболее изучена Р. ДНК бактерий, поврежденной ультрафиолетовыми или ионизирующими излучениями. Обычно рассматривают 3 осн. механизма Р.: фоторепарацию (фотореактивацию), эксцизионную Р. и пострепликативную Р.

2. Виды репарации.

Фоторепарация заключается в расщеплении ферментом дезоксирибопиримидинфототиазой, активируемой видимым светом, цикlobутановых димеров, возникающих в ДНК под действием ультрафиолетового излучения.

Эксцизионная Р. заключается в узнавании повреждения ДНК, вырезании (эксцизии) поврежденного участка, ресинтезе ДНК по матрице интактной цепочки и восстановлении непрерывности цепи ДНК.

Пострепликативная Р. включается в тех случаях, когда эксцизионная Р. не справляется с устранением всех повреждений, возникших в ДНК до её репликации. В этом случае воспроизведение поврежденных молекул приводит к появлению молекул с односторонними пробелами, а нативная структура восстанавливается с использованием этапа рекомбинации.

Ферменты Р. принимают участие в редупликации и рекомбинации, а также в мутационном процессе. В последнем случае в клетке работает особый тип индуцибельной

Р., склонной к ошибкам. В результате происходит восстановление нативной структуры ДНК, однако с искажением заключённой в ней генетич. информации. Мутации, блокирующие процессы Р., часто приводят к повышению или понижению частоты мутационного процесса. Ряд наследств, заболеваний (напр., пигментная ксеродерма, атаксия-телеангиэктазия, прогерия) связан с дефектами систем Р. Штаммы бактерий и дрожжей, дефектные по Р. и обладающие повышенной чувствительностью к повреждающим агентам, используются в качестве индикаторов в генетич. токсикологии.

Известны четыре основных типа повреждений в ДНК:

1. повреждение одиночных нуклеотидов;
2. повреждение пары нуклеотидов
3. разрыв цепей ДНК;
4. образование поперечных сшивок между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК.

Несомненно, что система репарации способна противостоять всем типам повреждений в ДНК, однако механизмы репарации наиболее изучены только в отношении первых двух типов, в основе которых лежат изменения структуры гетероциклических азотистых оснований. Устранение разрывов в цепях ДНК, вероятно, достигается прямым лигированием с участием ДНК-лигаз либо в процессе рекомбинации молекул ДНК, а механизмы устранения поперечных сшивок пока не изучены.

SOS-репарация. Все описанные выше типы репарации катализируются конститутивными ферментами, присутствующими в клетках в постоянных количествах. Кроме того, существует репарация, осуществляемая индуцибельными ферментами, так называемая SOS-репарация. Этот механизм включается для спасения клетки в условиях, когда нарушения ДНК реально угрожают ее жизнеспособности. Во-первых, при этом снижается скорость репликации, что делает процесс репарации более эффективным; во-вторых, блокируется деление клеток; и в-третьих, индуцирует синтез ряда белков, участвующих в образовании олигонуклеотидов в частности белков теплового шока. Действие SOS-репарации носит кратковременный характер, и примерно через 40-60 мин она переключается на конститутивную репарацию. Существование этой системы впервые постулировал М. Радман в 1974 г. Он же дал название этому механизму, включив в него международный сигнал бедствия «SOS» (спасите наши души). В этом случае SOS-репарация происходит индукция активности разнообразной группы генов, задействованных в различных клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК.

3. Значение репарации ДНК.

У клеток в процессе эволюции выработался сложный механизм устранения повреждений, возникающих в ДНК под действием самых разнообразных химических и физических факторов, а также вследствие ошибок при репликации или рекомбинации. И это вполне понятно: большая часть повреждений блокирует передачу генетической информации последующему поколению, а остальные, если их не устранить, сохраняются в геномах потомков и приведут к драматическим изменениям в молекулах белков, а том числе и ферментов, необходимых для поддержания жизнедеятельности клетки. При повреждении определенных звеньев системы репарации клетки становятся особенно уязвимыми для некоторых химических и физических агентов. Например, клетки *E. coli*, у которых нарушена система внесения разрывов в ДНК при выщеплении тиминовых димеров, очень чувствительны к УФ-свету. Клетки, неспособные осуществить ту или иную N-гликозилазную реакцию, гораздо больше, чем нормальные, подвержены мутагенному или летальному эффекту алкилирующих агентов или ионизирующей радиации. У клеток *E. coli*, дефектных по Pol I, существенно снижена выживаемость при облучении низкими дозами УФ-света.

У представителя низших эукариот *Saccharomyces cerevisiae* имеется, по крайней мере, пять генов, кодирующих белки, которые участвуют во внесении разрывов в УФ-облученную ДНК. Нарушение только в одном из этих пяти RAD-генов приводит к тому,

что клетки утрачивают способность к внесению разрывов в ДНК и, следовательно, к удалению пиримидиновых димеров. У дрожжей существуют также мутанты с нарушенной способностью к удалению сшивок между цепями, хотя элиминация УФ-индуцированных повреждений проходит нормально. Это предполагает, что у дрожжей, как и у человека, для удаления поперечных сшивок, а возможно, и для исправления множества других химических модификаций в ДНК существуют специфические, весьма сложные механизмы репарации.

Люди, страдающие пигментной ксеродермой, очень чувствительны к ультрафиолетовому свету, и у них развиваются разные формы рака кожи даже при очень слабом воздействии солнечного света. Клетки таких людей несут мутацию, сходную с RAD-мутацией дрожжей и проявляющуюся в том, что у них нарушена способность к выщеплению пиримидиновых димеров из УФ-облученной ДНК. Как ставило, заболевание бывает связано с неспособностью к выщеплению тиминовых димеров. Если к облученным клеткам в культуре добавить фермент, обладающий тиминдимергликозилазной и AP-эндонуклеазной активностями, то УФ-повреждения могут быть устранены.

1.8 Лекция №8 (2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция. История открытия и сущность метода. Применение».

1.8.1 Вопросы лекции:

1. История метода.
2. Принцип метода.
3. Применение ПЦР

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR) — метод молекулярной биологии, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков.

Изобретение ПЦР полностью и безвозвратно изменило медицину, науку и нашу жизнь в целом. Появилась возможность быстро и эффективно диагностировать наследственные заболевания и инфекции, определять личность преступников по одному волоску и свободно манипулировать генами. Не будь этого уникального метода, человечество вряд ли оказалось бы на пороге эпохи геномной терапии.

1957 г. Американец Артур Корнберг впервые выделил из бактерий *Escherichia coli* фермент, который назвал ДНК-полимеразой [1]. Статьи с описанием работы он отправил в *Journal of Biological Chemistry*, где их отвергли... из-за названия фермента: рецензенты считали, что нужно использовать более точный термин «полидезоксирибонуклеотидполимераза» и что вообще «ДНК» в названии указывает на «генетическую активность» (сущность, составляющую?) фермента, а раз ее нет, то и называть фермент так нельзя [2]. Однако в 1958 году в журнале сменился главный редактор, и статьи наконец увидели свет [3]. А уже в 1959 году Артура Корнберга удостоили Нобелевской премии по физиологии и медицине.

1971 г. Норвежский биохимик Хьелль Клеппе (рис. 2) опубликовал в *Journal of Molecular Biology* статью, в которой описал метод, очень похожий на ПЦР [4]. С 1968 по 1970 годы Клеппе работал постдоком в Университете Висконсина, в лаборатории Хара Гобинда Кораны — нобелевского лауреата 1968 года за расшифровку генетического кода. Именно в лаборатории знаменитого индийца чуть раньше разработали методики синтеза

олигонуклеотидных праймеров — «затравок», необходимых для работы ДНК-полимеразы.

Статья, написанная Клеппе в соавторстве с Кораной и посвященная репарационной репликации с помощью ДНК-полимеразы, содержала такие строки: *«Можно ожидать, что после охлаждения получатся две структуры, каждая из которых содержит полноразмерную матричную цепь, подобающим образом связанную с праймером. Для завершения процесса репаративной репликации нужно будет добавить ДНК-полимеразу. В результате получатся уже две молекулы исходного дуплекса. Цикл можно повторять, каждый раз добавляя свежую порцию фермента».*

К сожалению, эта гипотеза так гипотезой и осталась. Может, Клеппе даже и проводил какие-то эксперименты, но результаты не публиковал.

1976 г. Ученые из США, Эллис Чиен, Дэвид Эдгар и Джон Трела, выделили термостабильную ДНК-полимеразу из бактерии *Thermus aquaticus* и назвали ее [Taq-полимеразой](#) [5]. Этот фермент сохранял активность даже при температурах выше 75 °С.

1977 г. [Фредерик Сенгер](#), английский биохимик и лауреат Нобелевской премии 1958 года за работы по структуре белков [6], предложил метод секвенирования ДНК, сейчас известный как [метод Сенгера](#) [7], [8]. Этим он заработал еще одну нобелевскую медаль, в 1980-м, и стал единственным ученым в истории, получившим две «химических» премии [9].

1983 г. Руководитель лаборатории синтеза ДНК в Cetus Corporation (США) [Кэри Мюллис](#) (рис. 3) апрельской ночью ехал вдоль побережья из Сан-Франциско в Мендосино, в свой загородный дом. Долгой трехчасовой дорогой он обдумывал отнюдь не проведение выходных, а предстоящий эксперимент по секвенированию ДНК. И тут (по словам Мюллиса) его озарило: он ясно представил процесс амплификации (преумножения) генов, который позже получит название полимеразной цепной реакции.

В 1983 году Мюллис участвовал в проекте по изучению [серповидноклеточной анемии](#). Чтобы проанализировать мутации, биологи проводили секвенирование по Сэнгеру, где используется один праймер для синтеза по одной из цепей ДНК. На серпантине по пути в Мендосино Мюллис предположил, что данные будут точнее, если использовать два праймера — для синтеза одновременно по двум цепям. Тогда можно будет сравнить получившиеся фрагменты и исключить неточности. И вот тут-то неожиданное прозрение заставило его вздрогнуть: если повторить цикл несколько раз, то можно получить множество копий нужного фрагмента строго определенной длины — она будет ограничена праймерами, от концов которых навстречу друг другу и будут строиться новые цепи ДНК [11]!

Вернувшись в понедельник в Cetus, Кэри Мюллис сразу направился в библиотеку, где попросил одного из сотрудников найти всю литературу о ДНК-полимеразе. В результате он не обнаружил ничего, касающегося амплификации. Это утверждение — самое слабое место во всей истории, так как в собранной библиотекарем стопке статей просто не могло не быть работы Хелли Клеппе.

За следующие полгода Мюллис провел два эксперимента для проверки своей гипотезы, но безуспешно. Тогда он предположил, что отрицательный результат связан с большим размером ДНК-матрицы, используемой в опытах, и решил продолжить работу с маленьким вектором [pBR322](#), в который вставил размножаемый ген. И 16 декабря 1983 года Мюллис впервые увидел вожделенные, хоть и слабые, полосы в геле для детекции. Однако другие сотрудники и руководство Cetus не разделили радости Мюллиса: их всё это попросту не интересовало [10].

1984 г. На ежегодной конференции корпорации Cetus в калифорнийском Монтерее Кэри Мюллис представил плакат, рассказывающий об амплификации гена β-глобина. К удивлению автора, и на этот раз его работу обошли вниманием [10].

Чуть позже Мюллису удалось кое-как убедить корпоративных боссов в важности его экспериментов: Cetus, как и многие начинающие компании, вкладывала ресурсы только

в те проекты, что сулили прибыль в краткосрочной перспективе. Его освободили от обязанностей главы лаборатории и дали год на исследования ПЦР. И эти эксперименты завершились успешно [10].

1985 г. Мюллис и его группа разработчиков подали заявку на патент, который утвердили 28 июля 1987 года. В том же 1985-м в Cetus начали использовать для ПЦР термостабильную *Taq*-полимеразу, что значительно упростило работу: раньше перед каждым новым синтетическим циклом в смесь надо было добавлять новую порцию фермента, потому что он быстро выходил из строя от высоких температур. В декабре 1985 года журнал *Science* опубликовал первую статью Кэри Мюллиса о ПЦР [12].

Тогда же открылось совместное предприятие PerkinElmer Cetus Instruments (PECI), которое выпустило первый прототип ПЦР-циклера — Mr. Cycle (рис. 4). И только в 1987 году в продажу поступил первый общедоступный прибор, PCR-1000 Thermal Cycler.

1986 г. Корпорация Cetus выплатила Кэри Мюллису премию \$10 000. Остальные члены его группы получили по символическому доллару. Это обострило и так напряженные отношения в коллективе. Осенью Мюллис покинул компанию [13].

После ухода из Cetus он два года возглавлял молекулярно-биологический отдел в Hytronyx, а в 1992-м открыл компанию по продаже ювелирных изделий с амплифицированной ДНК знаменитостей — Элвиса Пресли, Мэрилин Монро и т.п. [14].

В 1993 году Кэри Мюллис стал лауреатом Нобелевской премии по химии за изобретение ПЦР. Его награждение — до сих пор больной вопрос для норвежского научного сообщества, где первооткрывателем метода считают Хьелля Клеппе.

Сейчас Мюллису 72 года, он работает научным сотрудником Научно-исследовательского института детской больницы Окленда и с 2011 года возглавляет предприятие Altermune LLC, занимающееся изучением иммунитета [14].

Кэри Мюллис нередко выступает на конференциях, рассказывает о своей жизни, работе и, конечно, своем открытии. Он — прекрасный рассказчик, его всегда интересно слушать.

Время от времени Мюллис принимает ЛСД. Однажды он рассказал о ночной встрече со светящимся зеленым енотом в лесу рядом со своим загородным домом. А Альберт Хоффман («отец» ЛСД) утверждал, что, по словам Мюллиса, ЛСД помог ему развить идею ПЦР [14].

В 1998 году вышла книга Кэри Мюллиса «Танец обнаженного разума» (*Dancing naked in the mind field*), где в обрамлении автобиографических историй ученый высказывает своё мнение о глобальном потеплении, СПИДе и других волнующих общество вопросах. Мюллис верит в астрологию и считает, что значительного изменения климата не происходит, между ВИЧ и СПИДом нет никакой связи, а все исследования, говорящие об обратном, — плоды заговора ученых-карьеристов с правительствами их стран.

1987 г. Компания Cetus подала патентную заявку на метод ПЦР с *Taq*-полимеразой, и ее одобрили в октябре 1990 года.

1989 г. Журнал *Science* объявил *Taq*-полимеразу молекулой года, а статья сотрудников Cetus о ПЦР с ее использованием [15] несколько лет поддерживала статус самой цитируемой биологической публикации [16].

В августе химический гигант DuPont подал против Cetus иск, в котором утверждал, что патенты на ПЦР получены неправомерно, поскольку этот процесс еще в 1970-х описал Хьелль Клеппе. В ответ на иск Ведомство по патентам и товарным знакам США (USPTO) решило переосвидетельствовать патенты. Но через год объявило, что они останутся действительными: комиссия нашла метод, описанный в работе Клеппе, слишком «неопределенным и сомнительным». К тому же там не упоминалась возможность экспоненциальной репликации — отличительной черты ПЦР. В суде представители DuPont так и не смогли доказать вторичность изобретения Мюллиса. 28 февраля 1991 года, после двух дней работы, суд вынес решение в пользу Cetus [10].

1991 г. Выигранный суд не помог корпорации Cetus: к '91-му году ее убытки превысили \$60 млн, и в июле было объявлено о слиянии с биотехнологической компанией Chiron.

А права на метод ПЦР и использование *Taq*-полимеразы в декабре продали компании Hoffman-La Roche за \$300 млн [10]. С этой сделки Cetus выплатила Кэри Мюллису неоправданно малую сумму, фактически ограбив его.

С тех пор Hoffman-La Roche и ее «дочка» Roche Molecular Systems развивают метод полимеразной цепной реакции: у них уже более 1000 связанных с ПЦР патентов и заявок.

2. Принцип метода

Все мы знаем, что ДНК — это двухцепочечная молекула, где каждая цепочка состоит из звеньев-нуклеотидов. Нуклеотиды составлены из трех молекул: остатка фосфорной кислоты, сахара и азотистого основания. Если сахар и фосфат одинаковы у всех нуклеотидов в ДНК (в РНК сахар другой), то азотистых оснований четыре (если не считать редкие модификации): аденин, тимин, цитозин и гуанин, обозначаемые А, Т, Ц и Г соответственно. В молекулах РНК тимин заменен урацилом. Нуклеотиды соединяются в цепочку, образуя связи между фосфатной группой одного нуклеотида и гидроксильной — другого. В результате на одном конце каждой цепи ДНК «висит» фосфатная группа (5'-конец), а на другом — гидроксильная (3'-конец). Две цепи нуклеотидов расположены в молекуле ДНК антипараллельно, то есть напротив 3'-конца одной находится 5'-конец другой. Чтобы молекула была стабильной, цепочки должны как-то взаимодействовать друг с другом. Это обеспечивают **водородные связи**, образующиеся между азотистыми основаниями противоположных цепей по принципу **комплементарности**: А соединяется только с Т (или У в РНК), а Г — с Ц (рис. 5, видео 2). И поэтому, имея одну цепь ДНК, в соответствии с этим правилом легко построить ее пару. Собственно, на этом и основана ПЦР.

Типичная реакционная смесь

1. **Анализируемая ДНК.** Это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плазида, хромосома или геном клетки полностью. Для грубой оценки сойдет даже суспензия клеток. ДНК служит матрицей для многократного копирования нужного участка.
2. **Праймеры.** Праймер — это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов (15–30 штук), комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи. У праймеров, как и у любого олиго- или полинуклеотида, есть 3'- и 5'-концы.
3. **Нуклеотиды.** А точнее, дезоксинуклеотидтрифосфаты — четыре вида «кирпичиков» для строительства цепей ДНК: дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ.
4. **ДНК-полимераза.** Фермент, строящий комплементарную матричную цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3'-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий и архей: *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-полимераза) и *Pyrococcus woesei* (*Pwo*-полимераза). Первая — самая производительная, а две другие — более точные.
5. **Буфер.** Раствор, содержащий различные ионы для поддержания нужного pH, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и неионный детергент Tween-20 в сочетании с BSA (бычьим сывороточным альбумином) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки. В случае ГЦ-богатых матриц в смесь часто добавляют энхансер — ДМСО (диметилсульфоксид), предотвращающий нежелательные взаимодействия между комплементарными участками матрицы.

Этапы реакции

Цель ПЦР — получить множество одинаковых двухцепочечных кусочков ДНК строго определенной длины (обычно не более 2–3 тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.). Для этого проводят 20–30 циклов реакции. Каждый цикл состоит из трех этапов.

1. Денатурация

Чтобы полимераза могла работать, две цепи ДНК-матрицы нужно разъединить. Для этого реакционную смесь нагревают до 94–98 °С. В таких условиях разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями параллельных цепей.

2. Отжиг праймеров

На этом этапе праймеры специфично присоединяются к освободившимся цепям ДНК-матрицы с разных сторон копируемого участка 3'-концами друг к другу (рис. 8, видео 4). Чтобы праймеры могли комплементарно связаться (отжечься) только с нужными участками, при их конструировании необходимо учитывать такую важную характеристику, как температура плавления (T_m). Это расчетная температура, при которой половина праймеров присоединяется к целевому участку ДНК. Отжиг проводят при температуре на 1–5 °С ниже T_m , но не выше оптимальной температуры работы полимеразы, то есть в пределах 40–72 °С [17].

В идеале праймеры должны соответствовать следующим критериям:

- температуры плавления двух праймеров не должны различаться более чем на 5 °С;
- [ГЦ-состав](#) их должен уложиться в интервал 40–60%;
- в структуре олигонуклеотидов не должно быть [шпилек](#) (участков, комплементарных друг другу);
- праймеры не должны образовывать дуплексы (спариваться) друг с другом.

Еще лучше, если на 3'-конце праймера будет гуанин или цитозин: они образуют с комплементарными основаниями три водородные связи (между А и Т образуются две), что делает комплекс праймер—матрица более стабильным.

В реальности редко получается соблюсти все условия из-за множества причин. Однако чем больше критериев соблюдено при создании праймеров, тем выше вероятность правильной их работы.

Чтобы разработать эффективные праймеры, необходимо знать последовательность ДНК у концов целевого участка, и, руководствуясь упомянутыми критериями, выбрать подходящие фрагменты, которым будут комплементарны будущие праймеры. Всё это удобно делать в специальных компьютерных программах — например, [PrimerSelect](#): они и T_m рассчитают, и всякие спаривания изобразят, и вообще вынесут вердикт, удачная это пара праймеров или нет.

3. Элонгация, или синтез ДНК

Однажды ведущий ПЦР-специалист одного ветеринарного диагностического центра, показывая студентам постановку реакции, объяснила, что она потому называется полимеразной, потому что ее результаты наблюдают в полимерном геле. Возможно, есть и другие приверженцы этой гипотезы, однако сразу отметим, что она не верна. Полимеразная эта реакция от того, что в ее ходе фермент ДНК-полимераза последовательно выстраивает цепь ДНК (полимер) из нуклеотидов (мономеров), то есть полимеризует их. И делает она это на третьем этапе ПЦР.

Этот этап чаще проводят при температуре 72 °С — оптимальной для работы *Taq*-полимеразы. Фермент присоединяется к комплексам праймер—матрица и, выхватывая из раствора нуклеотиды, начинает по принципу комплементарности прилаживать их к 3'-концу праймера (рис. 7). Удлинение, или элонгация, новой цепи ДНК идет с максимальной скоростью 50–60 нуклеотидов в секунду (то есть около 3000 в минуту). Однако при программировании ПЦР-циклера задают время с запасом: по минуте на каждую тысячу пар нуклеотидов.

Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле. Таким образом, количество нужного продукта в процессе реакции возрастает экспоненциально. После прохождения всех циклов в реакционной смеси образуется столько специфических двухцепочечных продуктов, что их «массив»

можно увидеть невооруженным глазом — проведя гель-электрофорез, о котором расскажем ниже.

К сожалению, экспоненциальная амплификация не может длиться вечно. Через 25–30 циклов количество функциональных молекул полимеразы в реакционной смеси истощается. Но чтобы добиться еще большего выхода продукта, содержимое пробирки можно разбавить, например, в 1000 раз и снова использовать для амплификации с уже новыми рабочими компонентами [18].

Визуализация продуктов ПЦР

Чтобы увидеть, размножились ли нужные участки ДНК, после окончания ПЦР содержимое пробирок подвергают [электрофорезу](#) в агарозном или полиакриламидном геле с последующим окрашиванием — так молекулы ДНК разной длины разделяются пространственно и становятся видны невооруженным глазом [19]. Полиакриламидный гель намного плотнее, поэтому больше подходит для разделения очень коротких фрагментов (несколько десятков пар нуклеотидов), при этом можно увидеть разницу даже в один нуклеотид!

Расплавленный при 65 °С гель заливают в специальную форму (плашку) с установленной в ней гребенкой, формирующей лунки (рис. 9). Когда гель застывает, гребенку вынимают, ставят форму в камеру для электрофореза и заливают специальным буфером. Затем в лунки микропипеткой вносят раствор из ПЦР-пробирок, смешанный с краской — чаще [бромфеноловым синим](#). Чтобы потом определять размеры амплифицированных фрагментов, в отдельную лунку вносят маркер молекулярных масс ([ladder](#)), содержащий набор кусочков ДНК известных размеров. Камеру подключают к источнику питания и наблюдают за бегущими от электродов волшебными пузырьками. Десятки минут или несколько часов, зависит от размера фрагментов ДНК, плотности геля и приложенного напряжения. Благодаря отрицательно заряженному сахарофосфатному остову ДНК, фрагменты движутся в геле под действием электрического поля от отрицательного катода к положительному аноду. Более короткие молекулы делают это быстрее, чем длинные. Бромфеноловый синий нужен для того, чтобы следить за продвижением фронта проб в геле и не допустить их выхода за его пределы.

После окончания электрофореза гель вынимают из плашки и, чтобы увидеть расположение фрагментов, вымачивают в растворе флюоресцентного красителя, прочно связывающегося с ДНК. Иногда его вводят в гель еще до заливки плашки. Если красителем служит [бромистый этидий](#), внедряющийся между нуклеотидами ДНК, визуализацию проводят под ультрафиолетом (рис. 10).

Если экспериментатор преследовал цель просто понять, есть ли нужная последовательность нуклеотидов в ДНК-матрице, то после визуализации гель выбрасывают. Но нужные фрагменты несложно из геля выделить для дальнейшей работы: чтобы резать их на кусочки для сравнения с другими фрагментами, вставлять в плазмиды для дальнейшего изучения, секвенировать и т.д.

3. Применение ПЦР

1. Клиническая медицина

- Анализ клинических образцов на наличие инфекционных агентов бактериальной и вирусной природы: ВИЧ, вирусов гепатита и герпеса, хламидий, хеликобактера, туберкулезных микобактерий и т.д.
- Диагностика лейкемии, лимфомы и других видов неоплазий, которые можно определить по мутациям в определенных генах. Мониторинг опухолевых заболеваний после терапии.
- Диагностика наследственных заболеваний, причина которых — мутации отдельных генов: серповидноклеточной анемии, бокового амиотрофического склероза, фенилкетонурии, муковисцидоза, мышечной дистрофии и т.п.

- Персонализированная медицина. Далеко не все лекарства одинаково действуют на всех людей. Одно и то же вещество может помочь одному пациенту и быть токсичным или аллергенным для другого из-за особенностей метаболических процессов у разных людей. Поэтому наиболее эффективны индивидуально подобранные дозировки индивидуально подобранных препаратов. Различия метаболизма обычно обусловлены генетически. Сделав пациенту своеобразный «генетический паспорт» таких особенностей, можно на его основе подбирать правильное лечение [49].
- Тканевая типизация перед трансплантацией органов.
- Обнаружение хромосомных кроссинговеров, делеций, инсерций, транслокаций и инверсий в отдельных сперматозоидах до оплодотворения.

2. Криминалистика и судебная медицина

- Установление личности преступников и жертв по ДНК из капель крови, волос и спермы с места преступления.
- Установление отцовства и иного родства.
- Расследование причин необъяснимой смерти («молекулярная аутопсия») — в комплексе с морфологическими и физиологическими данными [24].

3. Генная инженерия

- Клонирование ДНК для исследования функций генов, их взаимодействия, создания синтетических ДНК, генетически модифицированных организмов и пр. [50].
- Секвенирование ДНК [8], основанное на ПЦР, в ходе которой в синтезируемую цепь включается меченный флуоресцентной меткой или радиоактивным изотопом дидезоксинуклеотид, что приводит к терминации синтеза и позволяет определить положение конкретных нуклеотидов после разделения в геле (то есть пошагово прочитать их последовательность).
- Мутагенез, основанный на внесении изменений в ДНК посредством ПЦР.
- Создание гибридизационных зондов для различных видов блоттинга.
- Анализ экспрессии генов в тканях и отдельных клетках в разных условиях.

4. Антропология, палеонтология

- Изучение взаимосвязей между видами в эволюционной биологии.
- Исследование миграции людей и связи различных этносов, национальностей и рас.
- Изучение вымерших животных и предков человека.
- Исследование ДНК исторических личностей, например, Николая II [51], английского короля Ричарда III [52], египетских фараонов [53] и т.д.

5. Сельское хозяйство

- Обнаружение патогенов (бактерий, грибов, вирусов) у растений и животных.
- Диагностика наследственных заболеваний домашних и сельскохозяйственных животных.
- Анализ пищевых продуктов на содержание генетических модификаций.
- Обнаружение X-хромосомы у животных, пол которых трудно определить невооруженным глазом: например, рыб, рептилий, попугаев.

Полимеразная цепная реакция — один из самых мощных и дешевых лабораторных методов. Его появление привело к воистину революционным изменениям в науке и медицине. И если сейчас для генетических экспресс-анализов появляются альтернативные техники, не требующие сложной аппаратуры, то в генетической инженерии ПЦР по-прежнему просто незаменима. Пожалуй, самые ценные свойства этого метода — совместимость с другими техниками и невероятная пластичность: они позволяют биологам и врачам с минимальными усилиями решать совершенно разные задачи. А главное, метод пока не исчерпал свой потенциал: до сих пор появляются всё

новые его варианты, и, возможно, нас еще не раз удивят остроумные и неожиданные п. Даже в США, где поля ГМ-культур — давно привычный элемент пейзажа, прекрасные проекты проигрывают общественным страхам. Во Флориде бактериальная пятнистость томатов — чуть ли не самое опасное для этой культуры заболевание. Поиск «обычных» способов борьбы с ним обходится в десятки миллионов долларов, а пока фермеры до 44 раз в год опрыскивают растения медь-содержащими пестицидами, которые, накапливаясь в земле, могут вредить почвенной микробиоте и поступать в грунтовые воды. Ученые решили проблему бактериальной пятнистости и удвоили урожайность с помощью внедрения в томаты гена устойчивости [Bs2](#) из сладкого перца. Тем не менее участники многолетнего проекта — [2Blades Foundation](#), Калифорнийский университет в Беркли и Университет Флориды — не могут найти инвесторов для вывода своей разработки на рынок: осилить оплату всех проверок ГМО для получения одобрения Минсельхоза, как правило, могут лишь агрогиганты. Инвестировать в ГМ-томаты первым никто не хочет. И дело не в том, что фермеры настолько глупы, чтобы не осознать все плюсы разработки. Нет, просто рестораны и сетевые магазины, закупающие у них продукцию, требуют в контрактах заверения, что она генетически не модифицирована. И не то чтобы они сами питали какие-то иллюзии на этот счет — просто так хочет массовый потребитель, воспитанный в анти-ГМО-атмосфере [\[57\]](#). Тот самый потребитель, который не знает, что в «обычной» пище тоже содержатся гены. [Недавний опрос](#), организованный [Мичиганским государственным университетом](#), выявил, что из тысячи американцев этого не знают почти 40%, причем таких больше среди молодых, обеспеченных и считающих себя компетентными в продовольственной теме. Лишь 59% доверяют в вопросах пищевой безопасности академическим ученым, 49% — правительственным, 33% — промышленным. Мнение всех этих ученых часто проигрывает в конкурентной борьбе со словом друзей, родственников, рекламодателей и звезд шоу-бизнеса.

1.9 Лекция №9 (2 часа).

Тема: «Секвенирование. Расшифровка нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК».

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Появление и развитие технологий секвенирования
2. Секвенирование «нового поколения».
3. Использование секвенирования «нового поколения».

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Появление и развитие технологий секвенирования

С момента открытия нуклеиновых кислот прошло уже почти полторы сотни лет. В далеком 1869 году Иоганн Фридрих Мишер выделил из находившихся в гное клеток неизвестное доселе вещество, содержащее азот и фосфор, которое назвал нуклеином, а затем (из-за его свойств) — [нуклеиновой кислотой](#). Первоначально считалось, что молекулы нуклеиновых кислот — резерв фосфора в клетках, однако уже в первой половине XX века ученые доказали их наследственную природу. Тогда же появилось понятие [гена](#) — наименьшей структурной и функциональной единицы наследственности, — и сформировалась новая наука — генетика.

Вплоть до середины прошлого века структура носителей генетической информации и способы ее передачи оставались неясными. Модель [двойной спирали ДНК](#), которая входит во все современные учебники генетики и молекулярной биологии, предложили в 1953 году [Френсис Крик](#) и [Джеймс Уотсон](#) (за это в 1962 ученые [получили Нобелевскую премию](#)). Последовавшие следом открытие [генетического кода](#) и разработка [центральной](#)

догмы молекулярной биологии дали мощный толчок к развитию естественных наук, в первую очередь — генетики. Основные исторические вехи этого процесса показаны на рисунке 1.

История геномных исследований и секвенирования нуклеиновых кислот. 8 марта **1865** г. — Грегор Мендель доложил результаты своих опытов, объясняющие механизм наследования. **1869** г. — Иоганн Фридрих Мишер выделил из клеток в гное неизвестное доселе вещество, содержащее азот и фосфор, которое назвал нуклеином. **1905–1909** гг. — появление терминов «ген» и «генетика». **1953** г. — Френсис Крик и Джеймс Уотсон предложили структуру двойной спирали ДНК. **1958** г. — Френсис Крик сформулировал центральную догму молекулярной биологии. **1975** г. — Сэнгер с коллегами разработал «плюс-минус» метод секвенирования ДНК. **1977** г. — группа Сэнгера разработала метод «терминаторов». **1977** г. — Максам и Гилберт предложили метод секвенирования ДНК путем химической дегградации. **2001** г. — опубликован первый полный геном человека. **2005** г. — коммерциализация технологии пиросеквенирования. **2006** г. — коммерциализация технологии Solexa (Illumina). **2006** г. — коммерциализация технологии лигазного секвенирования. **2010** г. — коммерциализация технологии ионного полупроводникового секвенирования (технология PostLight™). **2011** г. — первый коммерческий релиз секвенаторов PacBio, основанных на технологии одномолекулярного SMRT-секвенирования. **2015** г. — начало продаж первых приборов, основанных на секвенировании через нанопору.

Осознав основные принципы функционирования нуклеиновых кислот (НК), научное сообщество предприняло грандиозные усилия для того чтобы разработать быстрые и эффективные методы определения их первичной последовательности (рис. 2) — как это принято говорить сегодня, *секвенирования*. Спустя десятилетия после открытия Уотсона и Крика в биологической науке наступила новая эпоха — эра секвенирования нуклеиновых кислот и геномики...

Секвенирование нуклеиновых кислот (другими словами, определение их нуклеотидной последовательности) — это расшифровка первичной структуры линейных молекул ДНК или РНК, состоящих из последовательности «букв» — нуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ и УТФ. Эти «буквы» зачастую именуют просто по азотистому основанию, входящему в их состав — аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц), тимин (Т), а также урацил (У) в случае РНК.

Словарик

АННОТАЦИЯ ГЕНОМА маркировка генов и других объектов внутри них.

ГЕНОМ наследственный материал, заключенный в клетке организма и необходимый для построения и поддержания его жизнедеятельности. Раздел молекулярной генетики, занимающийся геномом и генами организмов, принято называть геномикой.

ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота, макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы у многих организмов.

ДНК-БИБЛИОТЕКА (ГЕНОМНАЯ БИБЛИОТЕКА) набор ДНК-фрагментов всего генома организма. Эти ДНК-фрагменты фланкированы идентичными ДНК-адаптерами и содержат различные вставки генома.

ДНК-АДАПТЕРЫ небольшие фрагменты ДНК известной последовательности, фланкирующие ДНК-библиотеку. Используются как участки, с которых начинается амплификация или секвенирование ДНК-библиотеки.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК своеобразная модификация молекулы ДНК путем присоединении метильной группы (-CH₃) к цитозину в составе CpG-динуклеотида. Один из способов регуляции работы генома без изменения нуклеотидной последовательности ДНК.

НУКЛЕОТИДЫ (НУКЛЕОЗИДФОСФАТЫ) низкомолекулярные вещества (мономеры), составляющие сложные биологические полимеры: соответственно РНК или ДНК. Нуклеотиды, составляющие ДНК: аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С). В РНК вместо тимина присутствует урацил (U).

ПЦР (ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ) молекулярно-биологический метод, позволяющий добиться колоссального (до 10^{12} раз) увеличения или амплификации числа копий определенного фрагмента ДНК *in vitro*.

РНК рибонуклеиновая кислота, макромолекула, образующаяся у многих организмов в результате считывания с ДНК (транскрипции), необходима в процессе синтеза белков, а также многочисленных регуляторных процессов в клетке. Также ответственна за хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы у некоторых вирусов.

РЕСЕКВЕНИРОВАНИЕ повторное определение последовательности ДНК организма с уже расшифрованным геномом (применяется, например, при поиске вариантов, связанных с наследственными заболеваниями у человека).

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК ИЛИ РНК определение первичной последовательности нуклеотидов в составе макромолекул, несущих наследственную информацию.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ DE NOVO секвенирование нового для науки (ранее не прочитанного) генома.

ЧТЕНИЯ (РИДЫ, READS) фрагменты ДНК (длиной от 25 до 20 000 нуклеотидов), считываемые с генома при помощи специальной машины — секвенатора.

ЭМУЛЬСИОННАЯ ПЦР (ЭПЦР) ПЦР, проводимая в эмульсии, где в каждой капельке масла амплифицируется единичная молекула ДНК (фрагмент ДНК).

ЭПИГЕНОМИКА один из разделов геномики, посвященный изучению изменения экспрессии генов, вызванного механизмами, не затрагивающими последовательности ДНК, например, через метилирование ДНК

Почти четверть века назад в Соединенных Штатах стартовал грандиозный по своему масштабу научный проект, посвященный определению последовательности генома человека [1]. Основной его целью стала расшифровка генетической информации, заключенной в хромосомах (компактизованная ДНК), которые мы наследуем от своих родителей. В течение тринадцати лет многочисленные исследовательские группы по всему миру работали над определением полной последовательности генома человека. Почти три миллиарда долларов, потраченные на этот проект, открыли перед исследователями замечательные перспективы. Используя полученные данные, появилась возможность искать и находить участки ДНК, связанные с генетически обусловленными заболеваниями. И если природа многих моногенных болезней (вызываемых отказом единственного гена нашего генома) стала понятна уже давно, то некоторые заболевания — сердечно-сосудистые, онкологические, болезни Альцгеймера [2] и Паркинсона — являются многофакторными: вызвать их может широкий спектр изменений генома, многие из которых до сих пор неизвестны. Информация о генетических вариантах, связанных с человеческими недугами, позволяет формировать научно-обоснованный подход при их диагностике и лечении.

Расшифровка и аннотация (маркировка генов и других объектов в последовательности ДНК) генома человека поставили вопрос об использовании генетической информации как для диагностики заболеваний и их долгосрочного прогнозирования у человека, так и для исследования популяционной структуры сообществ, этногенеза и эволюционных процессов. Применение современных технологий секвенирования и генотипирования предлагает перспективные способы решения задач современной медицинской геномики и эпигеномики.

Такие результаты могут быть использованы при создании систем для проведения дифференциальной диагностики и выявления генетической природы заболеваний, для проведения персональной терапии и подбора методик лечения на основе анализа

индивидуальных генетических характеристик. Решение таких задач тесно связано с разработкой эффективных алгоритмов и математических моделей для биоинформатической обработки данных геномного секвенирования и их использованием на базе суперкомпьютерных кластеров.

Геномные исследования позволяют решать массу задач как прикладного, так и фундаментального плана. Благодаря им разрабатываются новые лекарства и продукты, они же позволяют проникнуть в глубокую историю человечества [3] или понять причину массового вымирания видов.

Сейчас разработано несколько способов секвенирования НК. Самый популярный и надежный из них — секвенирование по Сэнгеру — позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар оснований (п.о.) и используется для небольших фрагментов генома/генов или для валидации результатов более современного секвенирования нового поколения (*next-generation sequencing*, NGS), где размер одного прочитанного фрагмента варьирует от 25 до 500 п.о. В отличие от секвенирования по Сэнгеру, методы NGS используют для глубокого (многократного) прочтения генетического материала, которое необходимо, например, для *ресеквенирования* и сборки новых геномов (*de novo*), транскриптомных и эпигеномных исследований [4]. Помимо этого, NGS-секвенирование значительно производительнее, позволяя одновременно считывать миллионы и даже миллиарды коротких фрагментов. Такой рост производительности привел к возможности определения последовательности сразу десятков геномов (в зависимости от их размера) за один запуск прибора (рис. 3).

Стремительно развивающиеся новые технологии секвенирования ДНК позволяют быстро и эффективно определять особенности организмов на уровне их геномов. Главным итогом развития геномных и постгеномных технологий стало существенное расширение возможностей изучения генетической природы целого спектра заболеваний человека. Масштабные ассоциативные исследования на больших клинических выборках позволяют получать данные о генетических характеристиках, присущих конкретным группам людей (семьям, популяциям), развивая методы персонализированной медицины. В связи с этим, изучение механизмов генетической предрасположенности к многофакторным заболеваниям и выявление специфических генетических маркеров сегодня имеет особую актуальность. Подобные методы широко применяются за рубежом и в России, где технологии современного секвенирования также постепенно внедряют в медицинские исследования и медицинскую практику с целью персонификации стратегии лечения [1].

Технологической основой для подобных исследовательских и сугубо прикладных проектов служат геномные секвенаторы (приборы, на которых проводят секвенирование), поставляемые различными коммерческими компаниями, такими как Illumina, Thermo Fisher Scientific, Oxford Nanopore Technologies, Pacific Biosciences и другие.

В 2017 году на рынке представлены сразу несколько перспективных разработок в области секвенирования НК. Эти подходы применены в секвенаторах нового поколения:

- Ion Proton и Ion Personal Genome Machine (Thermo Fisher Scientific) — технология ионного полупроводникового секвенирования;
 - MiSeq и NovaSeq (Illumina) — технология секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов;
 - MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION (Oxford Nanopore Technologies) — нанопоровое секвенирование;
- и некоторых других.

Современные технологии делают процесс секвенирования ДНК рутинной процедурой, особенно в том случае, когда речь идет об организмах с уже известной последовательностью генома — их последующая биоинформатическая обработка не представляет значительного труда, поскольку исследователь уже имеет референсный (ранее отсеквенированный) геном, который позволяет избежать ошибок при анализе

полученных данных. При анализе нового, неопубликованного ранее, генома (*de novo* секвенирование и сборка) перед исследователем стоит ряд более сложных задач, в ходе решения которых он пытается сложить единичные фрагменты в цельную последовательность, задействуя многочисленные математические алгоритмы и суперкомпьютерные мощности [5], [6].

Однако наибольший интерес представляет не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует: какие гены обеспечивают жизнедеятельность клетки, как происходит регуляция (включение или выключение генов) или какие генные пути начинают работать в ответ на стрессовые факторы.

Все современные секвенирующие платформы отличаются от метода секвенирования по Сэнгеру тем, что не требуют этапа клонирования фрагментов ДНК. Это экономит рабочее время и позволяет избежать ряда проблем с клонированием АТ-богатых участков. Общий принцип пробоподготовки для большинства современных (NGS) секвенаторов включает фрагментирование ДНК, привязку к субстрату, амплификацию фрагментов с помощью ПЦР (в одномолекулярном секвенировании от ПЦР удалось отказаться) и последующее считывание последовательности НК. В отличие от метода секвенирования по Сэнгеру, современные платформы обеспечивают параллельное проведение миллиардов реакций в малых объемах, что позволяет получить намного больший объем информации на выходе.

Рассмотрим основные технологии секвенирования нуклеиновых кислот подробнее.

Секвенирование по Сэнгеру

«Плюс-минус» метод секвенирования ДНК

Один из наиболее популярных методов секвенирования обязан своим появлением английскому биофизику [Фредерику Сэнгеру](#) (1918–2013) — единственному ученому в истории мировой науки, получившему сразу две Нобелевские премии по химии (в 1958 и 1980 годах). [Первую премию](#) присудили за установление структур белков, особенно инсулина, а [вторую награду](#) ему вручили в том числе и за разработку методов определения первичной последовательности нуклеиновых кислот.

Методику секвенирования ДНК с использованием радиоактивно меченых нуклеотидов и ДНК-полимеразы (или [фрагмента Кленова](#) ДНК-полимеразы I) предложили Сэнгер и его коллеги в 1977 году, причем с течением времени этот метод прошел несколько модификаций и к настоящему моменту считается золотым стандартом современного секвенирования.

Первоначально Ф. Сэнгер и Алан Коулсон разработали так называемый «плюс-минус» метод секвенирования ДНК [7], который можно подразделить на две основные стадии:

1. *Полимеразная цепная реакция* [8], в которой используется ДНК (например, ДНК человека), фермент (ДНК-полимераза), олигонуклеотидные праймеры и смесь четырех дезоксинуклеотидов (dNTPs) (А, Т, G и С), причем один из дезоксинуклеотидов радиоактивно помечен по α -положению фосфата (^{32}P).

2. Очистка смеси амплифицированных фрагментов от дезоксинуклеозидтрифосфатов, не вступивших в реакцию (например, на колонках). Смесь делят на восемь равных частей (в разных пробирках). В «плюс»-системе проводят четыре ПЦР-реакции в присутствии каждого из четырех типов дезоксинуклеозидтрифосфатов; параллельно в «минус»-системе проводят четыре ПЦР-реакции в отсутствии каждого из них. Далее результаты визуализируют с помощью электрофореза, и определяют последовательность ДНК, исходя из того, что в «плюс»-системе терминация (прерывание) ПЦР происходит после конкретного dNTP, а в «минус»-системе — перед ним (рис. 4).

Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов»

Спустя пару лет Сэнгер с коллегами предложил еще один способ секвенирования, получивший название метода «терминаторов» или метода «обрыва цепи» [9]. Суть этого

метода заключается в том, что в реакционную смесь добавляют аналоги привычных нуклеотидов (дидезоксинуклеозидтрифосфаты), включение которых в синтезируемую цепь приводит к невозможности ее дальнейшего синтеза (терминации), а по образовавшемуся «обломку» можно установить последнюю букву секвенируемого фрагмента ДНК (рис. 5).

Автоматизированные модификации метода «терминаторов» активно применяют до сих пор в специальных приборах — секвенаторах. Открытие многочисленных флуоресцентных молекул позволило отказаться от использования радиоактивной метки и сделало возможным проведение реакции в одной пробирке. Реакционную смесь разделяют капиллярным электрофорезом, а выстроившиеся в синтезируемую цепочку ДНК меченые нуклеотиды затем регистрируют детекторами флуоресценции, предоставляя возможность считывать последовательность всего секвенируемого ДНК-фрагмента.

Другие методы секвенирования «старого поколения»

Кроме методов, предложенных Сэнгером, в конце прошлого века развивались и другие подходы к определению последовательности НК, которые — в частности, метод химической дегградации, разработанный Максамом и Гилбертом [10], — не получили дальнейшего распространения из-за быстрого развития энзимологии (раздел биохимии, изучающий ферменты), которая предоставила преимущество методу «терминаторов» Сэнгера.

Использование секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар нуклеотидов и применяется для небольших фрагментов генома/генов. В частности, оно используется для:

- секвенирования отдельных участков генома с целью анализа мутаций и полиморфизмов;
- идентификации вирусов и организмов (бактерий, растений, грибов и животных);
- валидации данных, полученных на платформах секвенирования нового поколения (NGS);
- микросателлитного анализа;
- анализа делеций и инсерций (малых и протяженных).

Наиболее популярными секвенаторами, использующими технологию секвенирования по Сэнгеру, являются приборы, производимые компанией Thermo Fisher Scientific: 3730xL, 3730, 3500xL, 3500, 3130xL, 3130, 310.

Следует отметить, что все описанные выше типы исследований сейчас можно проводить с помощью секвенирования «нового поколения», речь о котором пойдет в следующей главе, однако главные плюсы секвенирования по Сэнгеру — высокая точность (достоверность) полученных данных и невысокая стоимость работ при анализе небольшого количества ДНК-фрагментов — сохраняют актуальность этого типа определения последовательности НК.

2. Секвенирование «нового поколения» — next-generation sequencing (NGS)

За последние полтора десятилетия были разработаны, коммерциализированы и продолжают успешно развиваться совершенно новые технологии определения последовательности НК, в основе которых лежит стремление к миниатюризации, автоматизации, увеличению объема получаемых данных, а также удешевлению процесса. Появление NGS впервые позволило значительно ускорить и удешевить определение полной последовательности миллионов геномов организмов, начиная от бактерий и заканчивая человеком. Более того, появилась реальная возможность одновременно оценивать экспрессию (работу) тысяч генов в организмах, тканях и единичных клетках (секвенирование транскриптомов), а также анализировать регуляцию их активности (анализ экспрессии микроРНК и метилирования генома). В настоящее время на рынке представлено сразу несколько разработок, позволяющих определять последовательность

полных геномов организмов, проводить анализ экспрессии генов и метилирования генома. Эти подходы реализуются на секвенаторах нового поколения производства коммерческих компаний Illumina, Thermo Fisher Scientific, Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies. Часть разработанных платформ уже ушли с рынка (например, GS FLX, 454/Roche или HeliScope/Helicos Bioscience); другие, пройдя несколько реинкарнаций и модификаций, прочно закрепились на нем (Illumina и Thermo Fisher Scientific); третьи только нащупывают почву, намереваясь занять свою нишу и найти своего потребителя (например, Oxford Nanopore Technologies).

Появление высокопроизводительных технологий секвенирования сопровождается прогрессом программного обеспечения — создаются алгоритмы с открытым программным кодом, появляются открытые источники данных и платформы для вычислений. Новые математические и информационные технологии позволяют геномике развиваться быстрее и использовать более сложные алгоритмы. Эти алгоритмы могут включать в себя сразу несколько приложений и программ и позволяют работать с очень большим объемом данных.

Секвенирование «нового поколения» применяется как для анализа геномов организмов, для которых уже доступен референсный геном (*ресеквенирование*), так и для того, чтобы впервые расшифровать геном организма (*секвенирование de novo*).

Для **ресеквенирования** успешно используют платформы, генерирующие большое количество коротких чтений (секвенируемых фрагментов ДНК), поскольку даже относительно короткие фрагменты ДНК успешно картируются (картирование, или выравнивание, — процесс биоинформатического поиска расположения конкретного короткого фрагмента в полной геномной последовательности) на референсный геном (последовательность ДНК в цифровом виде, составленную учеными как общий репрезентативный пример последовательности генома конкретного вида) при биоинформатическом анализе данных. Такие выравненные чтения могут использоваться для поиска однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), малых делеций и инсерций или других структурных изменений в геноме.

Что касается **секвенирования de novo** и сборки новых, ранее не прочитанных, геномов, то использование коротких чтений сильно усложняет сборку, особенно в случае больших по размеру и сложно устроенных геномов эукариот (например, полиплоидных геномов). В этих случаях используют комбинированный подход — сочетание платформ, генерирующих как короткие, так и длинные чтения. При сборке генома *de novo* ученые уподобляются ребенку, пытаясь правильно сложить элементы геномного пазла (короткие фрагменты отсеквенированной ДНК) в единую картину, созданную эволюцией за сотни миллионов лет (рис. 6).

В то же время наибольший интерес представляет отнюдь не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует. Новые методы секвенирования НК позволяют оценивать уровень метилирования ДНК, проводить анализ дифференциальной экспрессии генов, в том числе и генов-регуляторов (например, микроРНК). Возможность анализа экспрессии генов в биологических системах открывает перед исследователем огромные возможности. Например, этот метод можно применять при исследовании функционирования центральной нервной системы человека (для понимания основных молекулярных аспектов работы головного мозга [11], [12]), при оценке защитного ответа клеток на атаки вирусов [13] или ответной реакции на стресс [14]. Не менее интересные данные может дать изучение регуляции экспрессии генов посредством анализа их метилирования [15] или изучение экспрессии некодирующих РНК [16], [17].

Оценка уровня метилирования генома, например, позволяет определить, какие генные пути и сети включаются в ответ на меняющиеся факторы окружающей среды; такие работы зачастую проводят для изучения эволюционных механизмов в живых системах. Изучение экспрессии кодирующих белки и некодирующих РНК в разных

тканях и клетках также позволяет понять и описать гены, вовлеченные в жизнедеятельность клеток, органов и организмов.

Пиросеквенирование

Одним из первых методов глубокого секвенирования, предложенным на суд научного сообщества, было пиросеквенирование, подразумевающее «секвенирование путем синтеза». Основной смысл этого типа секвенирования заключается в последовательном синтезе ДНК на ДНК-фрагментах изучаемого организма в специальных пиколитровых «реакторах». В ходе синтеза дочерней цепочки ДНК детектируют пирофосфаты, высвобождающиеся при включении нуклеотида в синтезируемую на матрице (участке молекулы ДНК, служащим матрицей для синтеза) комплементарную цепь.

Технологию предложил в 1996 году Пол Нирен с коллегами из Королевского технологического института в Стокгольме [19]. Затем ее коммерциализировали (2005 год) и воплотили в приборе GS FLX, 454 производства Roche (2008 год). Этим методом можно определять нуклеотидную последовательность фрагментов геномной ДНК размером 300–500 пар оснований (п.о.). Особо следует отметить тот факт, что подавляющее большинство NGS-методов требуют предварительной фрагментации ДНК для упрощения ферментативных реакций. К обоим концам фрагментированной ДНК «пришивают» *ДНК-адаптеры* (данная конструкция называется ДНК-библиотекой), необходимые для эмульсионной ПЦР (эПЦР) на магнитных сферах и последующего секвенирования.

Готовые ДНК-библиотеки иммобилизуют на магнитных сферах. Затем магнитные сферы с нанесенной на них клональной библиотекой доставляют на проточную ячейку, где в присутствии праймера, дезоксинуклеотидтрифосфатов и ферментов — ДНК-полимеразы, люциферазы, АТФ-сульфуриказы — происходит циклический синтез новой цепи.

Во время цикла пиросеквенирования при образовании фосфодиэфирной связи между матричной цепочкой ДНК и нуклеотидом синтезируемой цепи выделяется пирофосфат, который запускает каскад химических реакций, приводящих к выделению АТФ, необходимой для реакции окисления люциферина с выделением кванта света, который фиксируют аналоговой интегральной микросхемой (ПЗС-матрицей), состоящей из светочувствительных фотодиодов. Нуклеотиды, не вовлеченные в синтез новой цепи, удаляют из проточной ячейки, и начинается следующий реакционный цикл, в ходе которого добавляют дезоксинуклеотидтрифосфат другого типа (рис. 7).

Технология секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов

Технология секвенирования на молекулярных кластерах, так же как и пиросеквенирование, подразумевает синтез новой молекулы ДНК по матрице. Этот метод начали разрабатывать еще в середине 90-х годов прошлого века химики Шанкар Баласубраманиан и Дэвид Кленерман из Кембриджа, изучавшие работу ДНК-полимеразы на молекулярном уровне, используя флуоресцентно меченые нуклеотиды и ДНК-матрицу, иммобилизованную на поверхности [20]. Творческие семинары в лаборатории и дружеские посиделки в баре привели к коммерциализации этой технологии в 2006 году под брендом Solexa, который спустя год был приобретен компанией Illumina. Сейчас платформа продолжает развиваться, и потребителям предлагают новые линейки приборов.

Суть метода заключается в следующем. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для ПЦР и последующего секвенирования на молекулярных кластерах. Полученные ДНК-библиотеки иммобилизуют на поверхности проточной ячейки, где и проводят циклический процесс секвенирования. Реакционная смесь для синтеза комплементарной ДНК подается на поверхность проточной ячейки и содержит ферменты, олигонуклеотиды, а также четыре типа флуоресцентно меченых дезоксинуклеозидтрифосфатов. После включения в синтезируемую цепь ДНК нуклеотида-терминатора идентифицируют с помощью ПЗС-

матрицы как тип включенного нуклеотида, так и его положение. Затем терминирующая группа и флуоресцентная краска отщепляются от нуклеотида, и цикл синтеза повторяется. Эта серия шагов продолжается определенное количество раз, число которых задает пользователь (рис. 8).

Размер чтений, получаемых с секвенатора, может достигать 300 п.о. (прибор Illumina MiSeq). Кроме того, серия секвенаторов 2017 года NovaSeq позволяет определять последовательность до 48 геномов человека за один запуск прибора.

Технология циклического лигазного секвенирования

Технология циклического лигазного секвенирования была разработана группой Джорджа Макдональда Черча [21] и, в отличие от представленных выше, использует метод лигирования (формирование химических связей между нуклеотидами при помощи специального фермента — лигазы). Данный подход к секвенированию НК коммерциализировали в 2006 году, и приборы, известные под брендом SOLiD, уже длительное время представлены на рынке (первоначально развитием этой системы секвенирования занималась компания Applied Biosystems, а затем Life Technologies и Thermo Fisher Scientific).

Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером 25–75 п.о. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для эПЦР на магнитных сферах и последующего секвенирования на проточной ячейке.

Магнитные сферы с нанесенной на них клональной библиотекой помещают на проточную ячейку, где и происходит секвенирование с помощью лигирования восьминуклеотидных зондов, несущих четыре различных флуорофора на 5'-конце. Флуоресценция считывается с помощью специальной камеры после каждого цикла секвенирования и, затем переводится в последовательность нуклеотидов (рис. 9).

Технология лигазного секвенирования применялась в приборах, выпускаемых под брендом SOLiD. Спустя несколько поколений приборов пробоподготовку усовершенствовали, и на рынок вышла новая линейка приборов — 5500, 5500x1, а также 5500w, использующий изотермальную ПЦР (WildFire технология) для клонирования ДНК-библиотек [22].

Ионное полупроводниковое секвенирование

Ионное полупроводниковое секвенирование, основанное на технологии PostLight™, разработано компанией Ion Torrent и в настоящее время применяется в приборах, реализуемых Thermo Fisher Scientific — Ion S5 / Ion S5 XL, Ion Proton, Ion Personal Genome Machine (PGM).

Технология, предлагаемая в этой приборной линейке, основана на использовании полупроводниковых микрочипов для секвенирования. Суть этого подхода весьма проста и заключается в регистрации локального изменения pH на микрочипе в момент удлинения синтезируемой цепи ДНК-полимеразой на ДНК-матрице (рис. 10).

Пробоподготовка (приготовление ДНК-библиотек) напоминает таковую при циклическом лигажном секвенировании. Первоначально ДНК фрагментируют, затем к концам полученных фрагментов лигируют специфические ДНК-адаптеры, необходимые для эмульсионной ПЦР на магнитных сферах и последующего секвенирования.

Одномолекулярное секвенирование

SMRT-секвенирование (single molecule real time sequencing), предложенное сотрудниками компании Pacific Biosciences, не только позволило отказаться от проведения полимеразной цепной реакции при пробоподготовке, но и дало возможность наблюдать за работой ДНК-полимеразы, наращивающей синтезируемую цепь, в реальном времени [23].

Создание платформы Pacific Biosciences не только решило проблему ПЦР-дубликатов, но и значительно увеличило длину чтений, что крайне важно при сборке геномов *de novo*. Суть метода заключается в определении нуклеотидной

последовательности фрагментов геномной ДНК размером до 20 000 п.о. с лигированными к их концам специфическими ДНК-адаптерами, необходимыми для последующего секвенирования.

Сама реакция секвенирования молекул ДНК проходит в специальных ячейках (SMRT-ячейки) на прозрачной (кремниевой) подложке, с напыленным на нее слоем алюминия. В основе метода лежит использование технологии [Zero-mode waveguide](#) (ZMW) [24]. Сквозь дно в ячейку подается свет, однако благодаря особенностям ее строения, пучок фотонов не рассеивается, а освещает только конкретную часть (на подложке), где закреплена молекула [phi29 ДНК-полимеразы](#). Эта полимераза была выбрана в качестве «считывающего» фермента благодаря своей высокой точности, скорости синтеза дочерней цепи и эффективной работе с нуклеотидами, несущими флуоресцентную метку [25].

Смысл SMRT-секвенирования схож с описанными ранее методами NGS — ДНК-полимераза достраивает вторую цепь исследуемой молекулы ДНК, используя нуклеотиды, меченные различными флуоресцентными метками, которые регистрируют при помощи конфокальной микроскопии. В 2016 году анонсировали покупку платформы Pacific Biosciences биотехнологическим гигантом Roche Diagnostics, однако сделка так и не состоялась [26].

Разработка другого способа одномолекулярного секвенирования (коммерциализированного к настоящему времени) началась в конце прошлого века, когда группа американских ученых наглядно продемонстрировала возможность побуждать молекулы ДНК и РНК проходить сквозь ионный канал диаметром 2,6 нм в двуслойной липидной мембране под воздействием электрического поля. Более того, уже тогда исследователи сумели различать ДНК и РНК, а также оценивать длину входящих в нанопору олигонуклеотидов [27]. Спустя 13 лет впервые продемонстрировали возможность определения последовательности НК нанопоровым секвенированием [28], а затем данную технологию коммерциализировала и представила на рынок компания Oxford Nanopore Technologies (рис. 11).

Суть работы нанопоровых систем (MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION), предложенных британской компанией, достаточно проста. Реакционная камера, в которой проходит процесс считывания последовательности НК, разделена двуслойной мембраной с единичной порой. К камере прикладывается напряжение, вызывающее движение ионов и молекул ДНК или РНК через пору. При прохождении молекулы НК сечение поры (доступное для миграции ионов) уменьшается, в результате чего сила тока падает. Таким образом, считывая изменение силы тока, можно определять тип нуклеотида, проходящего через пору в конкретный отрезок времени.

Кроме описанных выше двух технологий компания Helicos Biosciences пыталась продвинуть на биотехнологический рынок свою технологию одномолекулярного секвенирования — *true Single Molecule Sequencing (tSMS)*. Данный подход во многом схож с технологией секвенирования на молекулярных кластерах (Illumina), однако позволяет обходиться без ПЦР при пробоподготовке.

Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером до 50 п.о. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры. Полученные ДНК-библиотеки иммобилизуют на поверхности проточной ячейки, где и проводят циклический процесс секвенирования. Один цикл состоит из удлинения синтезируемой на матрице цепочки за счет одного из четырех флуоресцентно меченых нуклеотидов, присоединение которого детектируется прибором.

Небольшая длина чтения (до 50 п.о., медиана — 30 п.о.) и большое количество ошибок (3–5%) данной платформы привели к оттоку потенциальных покупателей. Технология не получила широкого распространения, несмотря на потенциальную применимость в работе со сложными образцами, например, в палеогеномике, где отказ

от ПЦР мог бы привести к сокращению процентного соотношения экзогенной (мусорной) ДНК в анализируемых образцах древней ДНК. В итоге, в конце 2012 года компания Helicos Biosciences была признана банкротом и прекратила свое существование.

Одномолекулярное секвенирование длинных фрагментов ДНК может найти свое применение в самых разнообразных областях, и, что самое интересное, при работе с единичными клетками позволяет описывать их молекулярный «портрет». Это особенно важно при анализе транскриптомов клеток, позволяя описывать все возможные изоформы активных генов — благодаря длине чтений, недоступных для технологии Solexa или PostLight.

Использование секвенирования нового поколения

Производительность и относительная доступность NGS-методов привели к настоящей революции в биологической и медицинской науке. Более того, благодаря новым подходам появилась реальная возможность проводить ранее технически недоступные исследования. Использование секвенирования нового поколения позволяет проводить такие проекты как:

1. **Полногеномный анализ** (в том числе, ресеквенирование и секвенирование *de novo*). Ресеквенирование полных геномов человека в интересах персонализированной медицины или секвенирование ранее не изученных геномов вирусов, бактерий, архей, растений, грибов и животных как с чисто фундаментальными, так и прикладными целями.
2. **Секвенирование РНК (RNA-Seq)**, позволяющее оценивать экспрессию генов не только качественно, но и количественно. Существует возможность отдельно оценивать экспрессию кодирующих и регуляторных РНК. Данные методики направлены на изучение работы генома (активности его генов, в том числе генов-регуляторов) в разных клетках, тканях и органах.
3. **Метагеномное секвенирование** — оценка разнообразия микроорганизмов в различных образцах. Позволяет оценивать бактериальное разнообразие в различных средах, например, в кишечнике человека, донных отложениях озера Байкал или в горячих источниках Камчатки.
4. **Анализ ДНК-белковых взаимодействий (ChIP-Seq)** — изучение влияния транскрипционных факторов и других ДНК-связывающих белков на экспрессию генов, а через нее на фенотипические и физиологические особенности клеток, органов и тканей.
5. **Бисульфитное секвенирование и его модификации (например, RRBS)** — оценка метилирования в геноме или его участках. Влияние метилирования регуляторных участков генома на уровень экспрессии генов через подавление их транскрипционной активности.
6. **Таргетное секвенирование (экзомное секвенирование, секвенирование митохондриальных генов, секвенирование ампликонов)**. Секвенирование отдельных (выбранных исследователем) участков генома, например, только генов митохондриальной ДНК, кодирующих белки генов или генов, для которых уже описано участие в процессах онкогенеза. Таргетное секвенирование позволяет значительно снизить стоимость эксперимента (из расчета на один образец) и многократно увеличить количество анализируемых образцов.

1.10 Лекция №10 (2 часа).

Тема: «Гибридизация ДНК».

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Этапы ДНК-гибридизации.

2. Гибридизационные зонды.
3. Нерадиоактивные методы детекции ДНК-гибридизации.

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Этапы ДНК-гибридизации.

Информация о всем многообразии свойств организма заключена в его генетическом материале. Так, патогенность бактерий определяется наличием у них специфического гена или набора генов. Сегмент ДНК, детерминирующий данный биологический признак, имеет строго определенную нуклеотидную последовательность и может служить диагностическим маркером. Исторически первыми молекулярно-биологическими методами стали методы, основанные на гибридизационном анализе с использованием олигонуклеотидных зондов.

Гибридизация ДНК применяется для непосредственного обнаружения нуклеиновых кислот в биологических образцах. Метод основан на связывании молекулой ДНК своей комплементарной цепи. Процедура в общих чертах состоит в следующем.

1. Фиксация одноцепочечной ДНК-мишени на мембранном фильтре. Нуклеиновые кислоты экстрагируют из исследуемых образцов и наносят на нейлоновую или нитроцеллюлозную мембрану в денатурирующих условиях в виде парных пятен. В некоторых модификациях пробоподготовка сведена к минимуму: исследуемую суспензию наносят на мембрану в денатурирующих условиях без предварительной очистки нуклеиновых кислот.

2. Нанесение меченой одноцепочечной ДНК-зонда, которая при определенных условиях (температуре и ионной силе) спаривается с ДНК-мишенью.

3. Промывание фильтра для удаления избытка не связавшейся меченой ДНК-зонда.

4. Детекция гибридных молекул зонд/мишень.

В диагностических тестах, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот, ключевыми являются три компонента: ДНК-зонд, ДНК-мишень и метод детекции гибридизационного сигнала. Система детекции должна быть в высшей степени специфичной и высокочувствительной.

Весьма желательно, чтобы ДНК-диагностику можно было проводить на исходном материале, без дополнительного его культивирования или выделения нуклеиновых кислот, особенно в тех случаях, когда тестируются клинические образцы. Исследователи с успехом проводят гибридизацию с ДНК-мишенями, присутствующими в образцах кала, мочи, крови, смывах из зева и в тканях без предварительной их очистки. Если концентрация последовательности-мишени в исследуемом образце слишком мала, ее можно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Таким образом, гибридизация является высокочувствительным и специфичным методом обнаружения нуклеотидных последовательностей в биологических образцах. Его использовали при разработке способов идентификации патогенных микроорганизмов в клинических образцах и различных микроорганизмов в окружающей среде. Однако в России зарубежные тест-системы ввиду высокой себестоимости анализа не получили широкого распространения, а отечественные коммерческие тест-системы на основе ДНК/РНК-зондов не созданы.

2. Гибридизационные зонды.

ДНК-зонд представляет собой фрагмент, комплементарный участку генома возбудителя инфекционного заболевания. Чтобы обеспечить адекватность диагностического теста, гибридизационные ДНК- и РНК-зонды должны быть высокоспецифичными. Другими словами, необходимо, чтобы зонд гибридизовался только с искомой нуклеотидной последовательностью. Если есть вероятность получения ложноположительного (наличие гибридизационного сигнала в отсутствие последовательности-мишени) или ложноотрицательного (отсутствие сигнала при наличии последовательности-мишени) результата, то целесообразность применения теста

значительно снижается. Специфичность зондов может проявляться на разных уровнях: они могут «различать» два и более вида, отдельные штаммы в пределах одного вида или разные гены. В зависимости от ситуации зонды могут быть представлены молекулами ДНК или РНК; они могут быть длинными (более 100 нуклеотидов) или короткими (менее 50 нуклеотидов), представлять собой продукт химического синтеза, клонированные интактные гены или их фрагменты. Зонд может быть мечен как радиоактивной меткой (например, изотопами фосфора или серы, излучающими бета-частицы), так и безопасными соединениями, например, биотином.

Зонды получают разными способами. Один из них состоит в следующем: ДНК патогенного микроорганизма расщепляют с помощью рестрицирующей эндонуклеазы и клонируют в плазмидном векторе. Затем проводят скрининг рекомбинантных плазмид с использованием геномной ДНК как патогенного, так и непатогенного штаммов. Те плазмиды, которые содержат последовательности, гибридизующиеся только с ДНК патогенного штамма, составляют основу видоспецифичных зондов. После этого проводят ряд дополнительных гибридизаций с ДНК, выделенными из различных организмов, чтобы удостовериться, что потенциальные зонды не дают с ними перекрестной гибридизации. Для определения чувствительности метода каждый из зондов проверяют также на модельных образцах, в том числе и на смешанных культурах.

В качестве примера использования ДНК-зондов для диагностики заболеваний можно привести процедуру обнаружения *Plasmodium falciparum*. Этот паразит вызывает малярию – заболевание, угрожающее примерно трети всего населения Земли. Он инфицирует эритроциты и разрушает их, что приводит к развитию лихорадки, а в тяжелых случаях – к поражению мозга, почек и других органов. Чтобы выявить источники инфекции, оценить эффективность мер по их ликвидации и обеспечить раннюю диагностику и лечение, необходимы достаточно чувствительные, простые и недорогие методы. В настоящее время малярию диагностируют с помощью микроскопического исследования мазков крови – эффективного, но трудоемкого и занимающего много времени процесса. Иммунологические методы обнаружения *Plasmodium*, такие как ELISA, достаточно быстрые и их легко автоматизировать, но с их помощью нельзя отличить текущую инфекцию от прошедшей, поскольку при этом определяется только наличие антител к *Plasmodium* в крови больных.

Получены и охарактеризованы более 100 различных ДНК-зондов, позволяющих обнаруживать патогенные штаммы различных бактерий, вирусов и паразитических простейших. Так, имеются зонды для диагностики бактериальных инфекций человека, вызываемых *Legionella pneumophila* (респираторные заболевания), *Salmonella typhi* (пищевые отравления), *Campylobacter hyointestinalis* (гастриты), а также для выявления энтеротоксичного штамма *Escherichia coli* (гастроэнтериты). Однако это лишь «верхушка айсберга»; в принципе с помощью гибридизации можно выявлять практически любые патогенные микроорганизмы.

3. Нерадиоактивные методы детекции ДНК-гибридизации.

В большинстве лабораторий для гибридизации используют зонды, меченные каким-либо радиоактивным изотопом, чаще всего ^{32}P . Такие зонды обладают высокой удельной радиоактивностью и обеспечивают хорошее отношение сигнал/шум. Радиоактивно меченный зонд наносят на фильтр с фиксированной на нем ДНК-мишенью, проводят гибридизацию, отмывают несвязавшуюся ДНК-зонд и детектируют метку с помощью радиоавтографии.

Однако ^{32}P является короткоживущим изотопом, испускающим высокоэнергетическое излучение; при работе с ним необходимо использовать специальное оборудование и обеспечивать безопасную утилизацию отходов. Чтобы обойти эти трудности, были созданы нерадиоактивные системы детекции. Для усиления гибридизационного сигнала в этом случае используется ферментативное превращение хромогенного или хемилюминесцентного субстрата: первый из них под действием

фермента изменяет окраску, а второй испускает свет. В большинстве подобных систем применяются ДНК-зонды, содержащие биотинилированные нуклеотиды. Гибридизация и детекция сигнала проводятся более или менее стандартным образом.

Один из недавно разработанных нерадиоактивных методов детекции основан на использовании зонда – «молекулярного маяка».

Такой зонд состоит из 25 нуклеотидов. Средние 15 из них комплементарны ДНК-мишени и не взаимодействуют друг с другом, а 5 концевых нуклеотидов взаимно комплементарны и образуют шпильку. К 5'-концу присоединен флуоресцентный хромофор (флуорофор), а к 3'-концу – нефлуоресцентный хромофор (тушитель), на который передается энергия возбуждения флуорофора. В растворе при комнатной температуре «маяк» имеет такую конфигурацию, при которой флуорофор и тушитель находятся в тесном контакте, и флуоресценция флуорофора тушится. Когда же 15 средних нуклеотидов зонда гибридизуются с комплементарной последовательностью ДНК- или РНК-мишени, происходит пространственное разделение флуорофора и тушителя, и зонд испускает свет. Температура реакционной смеси должна быть близка к комнатной, поскольку при ее повышении шпилька денатурирует, флуорофор и тушитель расходятся и происходит флуоресценция. Необходимо также, чтобы все 15 нуклеотидов зонда были комплементарны соответствующей последовательности ДНК- или РНК-мишени.

Одноцепочечная область зонда гибридизуется с комплементарной последовательностью ДНК-мишени, его «шпилька» разрушается, флуорофор и тушитель флуоресценции перестают контактировать друг с другом и наблюдается флуоресценция. Это указывает на то, что между зондом и последовательностью-мишенью произошла гибридизация.

Метод обладает высокой специфичностью, не боится лабораторной контаминации, даёт представление об относительных количествах выявляемого микроорганизма в образцах. До появления полимеразной цепной реакции метод гибридизации был, пожалуй, единственным способом выявить специфические гены. Сегодня роль этого метода для фундаментальных исследований несколько не снизилась, а в диагностике его вытесняет более чувствительный метод ПЦР.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Молекулярная и пространственная организация РНК. Типы РНК и их распространенность».

2.1.1 Цель работы: изучить организацию и типы РНК.

2.1.2 Задачи работы: изучить организацию и типы РНК.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.1.4 Описание (ход) работы:

РНК - это полинуклеотид длиной от 70 мономерных единиц у некоторых тРНК до 10000 и более у некоторых мРНК. Два пурина и один пиримидин входят также в состав ДНК. А вместо тимина в РНК входит урацил, у которого 5-метильная группа отсутствует. Нуклеотиды в молекуле РНК соединены в цепочку такими же 5'-3'-фосфодиэфирными связями, как и в ДНК. Из-за наличия 2'-ОН-группы связь Р-О чувствительна к действию щелочей и ферментов, расщепляющих РНК.

Некоторые пурины и пиримидины в РНК модифицированы: они содержат метил-, тиол-, водород- и изопентенил-заместители. В РНК присутствуют 2'-О-метилнуклеотиды с модифицированным остатком рибозы, а также может наблюдаться иной способ связывания между урацилом и рибозой. Такие модифицированные нуклеотиды довольно редко встречаются в рРНК и мРНК и достаточно часто - в тРНК. Как правило, модификация оснований и рибозных остатков происходит после завершения синтеза РНК, а не на стадии биосинтетических предшественников. Функциональное значение этого явления установлено лишь отчасти.

Структура РНК

Большинство клеточных РНК - одноцепочечные молекулы, хотя некоторые вирусные геномы представлены двухцепочечными РНК, напоминающими А-форму ДНК. В одиночных цепях все время образуются короткие внутримолекулярные двухцепочечные участки. Это связано с тем, что в большинстве РНК имеются небольшие комплементарные последовательности, которые спариваются и образуют петли. В таких двухцепочечных участках А спаривается с U, а G с C; G может образовать пару и с U, но GU-пара менее стабильна, чем стандартная пара GC, поскольку ее компоненты соединены двумя, а не тремя водородными связями. Двухцепочечные области, образованные подобным образом, обычно непротяженны и прерывисты, поскольку спаривающиеся участки редко бывают абсолютно комплементарными. Укладка большинства РНК может происходить более чем одним способом, однако биологическое значение образующихся при этом изомеров установлено только в некоторых случаях. Например, известно, что адекватная укладка некоторых вирусных РНК чрезвычайно важна для экспрессии генов, поскольку ответ на ключевые регуляторные сигналы зависит от конфигурации молекулы. Подобная зависимость функции от упаковки молекулы наилучшим образом продемонстрирована на примере тРНК. Несмотря на разную нуклеотидную последовательность, третичная структура разнообразных тРНК весьма сходна, и ее стабилизация, по-видимому, имеет огромное значение для функционирования этих молекул. Правильная терминация синтеза РНК и созревание транскрипта тоже часто зависят от характера укладки РНК.

Содержание РНК в любых клетках в 5-10 раз превышает содержание ДНК. Основная роль РНК состоит в трансляции генетической информации с образованием белков. Однако молекулы РНК принимают участие и в осуществлении некоторых специализированных эндонуклеазных функций, возможно регулирующих различные этапы экспрессии генов. Молекулами РНК представлены геномы некоторых вирусов.

Во всех клетках присутствуют следующие виды РНК: рибосомная РНК, транспортная РНК и информационная, или матричная, РНК. Большинство клеток содержат также много других малых цитоплазматических РНК, а в клетках эукариот присутствует еще и множество малых ядерных РНК. Около 80% массы клеточных РНК составляют три или четыре вида рРНК, а около 15% - почти 100 видов тРНК. На долю нескольких тысяч различных матричных РНК приходится менее 5% клеточной РНК, а на долю малых ядерной и цитоплазматической РНК, число видов которых пока неизвестно, - менее 2% от общего количества.

Некоторые основные РНК

Тип РНК	Приблизительное число разных видов в клетках	Приблизительная длина (число нуклеотидов)	Распространенность
Транспортная РНК (тРНК)	80-100	75-90	П, Э
Рибосомная 5S-РНК (рРНК)	1-2	120	П, Э
Рибосомная 5,8S-РНК (рРНК)	1	155	Э
Рибосомная 16S-РНК (рРНК)	1	1600	П
Рибосомная 23S-РНК (рРНК)	1	3200	П
Рибосомная 18S-РНК (рРНК)	1	1900	Э
Рибосомная 28S-РНК (рРНК)	1	5000	Э
Матричная РНК (мРНК)	Тысячи	Варьирует	П, Э
Гетерогенная ядерная РНК (гяРНК)	»	»	Э
Малая цитоплазматическая РНК (мцРНК)	Десятки	90-330	П, Э
Малая ядерная РНК (мяРНК)	»	58-220	Э

Денатурация и ренатурация РНК

Как и в случае ДНК, двухцепочечные участки в РНК разрушаются при повышении температуры или рН, но, в отличие от ДНК, при высоких значениях рН в РНК разрушаются и фосфодиэфирные связи. Поскольку протяженность спирализованных участков в одноцепочечной РНК невелика, а сами спирали несовершенны, разрушаются они довольно легко. Однако полностью комплементарная двухцепочечная РНК плавится в довольно узком температурном интервале, как и двухцепочечная ДНК. В результате денатурации образуются две комплементарные одиночные цепи, способные к последующему воссоединению при плавном понижении температуры. После денатурации двухцепочечных участков одноцепочечной РНК восстановление тех же спаренных областей оказывается затрудненным, и в результате ренатурации могут образоваться структуры, отличные от исходной.

Гибридные спирали ДНК-РНК

Полинуклеотидные цепочки РНК и ДНК, имеющие комплементарные последовательности, могут образовывать двойную спираль РНК-ДНК с антипараллельными цепями. Структура таких комплексов напоминает А-ДНК. Спаривание оснований в них отвечает правилам Уотсона-Крика для ДНК: dA спаривается с rU, rA - с dT, dG - с rC и dC - с rG. В дуплексах РНК-ДНК пара оснований rG'dC более стабильна, чем пара dG'rQ и обе они стабильнее пар dG'dC в ДНК; обе пары, менее стабильны, чем пара dA'dT в ДНК. Гибридные спирали, или гетеродуплексы, способны к денатурации и ренатурации, как и дуплексы ДНК. В водных растворах с умеренной концентрацией солей двухцепочечные комплексы РНК-ДНК денатурируют легче, чем соответствующие спирали, состоящие исключительно из цепей РНК и ДНК. В растворах

же, содержащих формамид и соли в определенных концентрациях, дуплекс РНК-ДНК стабильнее дуплекса ДНК. Эти условия могут использоваться для образования и специфической стабилизации гибридных дуплексов.

Полинуклеотидные цепи РНК или ДНК считаются комплементарными, если они способны образовать протяженную двойную спираль с уотсон-криковскими парами оснований. Две нуклеиновые кислоты можно назвать гомологичными, если их нуклеотидные последовательности идентичны или очень близки. Гомологичность двух нуклеиновых кислот можно определить по степени образования двойных спиралей соответствующими одиночными цепями РНК, ДНК или гибридов РНК-ДНК. За образованием ДНК-, РНК- и гибридных РНК-ДНК-спиралей можно следить разными способами. В качестве зонда для выявления и количественного анализа гомологичных молекул РНК часто используется одноцепочечная ДНК. Так, степень превращения одноцепочечной РНК в двухцепочечную форму в присутствии другой нуклеиновой кислоты является мерой гомологичности их последовательностей. Используя соответствующего партнера по гибридизации, можно установить протяженность специфической нуклеотидной последовательности и гомологичность двух ДНК, РНК и ДНК, а также двух РНК.

Контрольные вопросы: 1. Молекулярная и пространственная организация РНК.
2. Типы РНК. 3. Распространенность РНК.

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Бактериальные плазмиды. IS-элементы и транспозоны бактерий».

2.2.1 Цель работы: изучить внехромосомные генетические элементы бактерий.

2.2.2 Задачи работы: Изучить бактериальные плазмиды и IS-элементы и транспозоны бактерий

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.2.4 Описание (ход) работы:

Плазмиды — внехромосомные мобильные генетические структуры бактерий, представляющие собой замкнутые кольца двунитчатой ДНК. По размерам составляют 0,1—5 % ДНК хромосомы. Плазмиды способны автономно копироваться (реплицироваться) и существовать в цитоплазме клетки, поэтому в клетке может быть несколько копий плазмид. Плазмиды могут включаться (интегрировать) в хромосому и реплицироваться вместе с ней. Различают трансмиссивные и нетрансмиссивные плазмиды. Трансмиссивные (конъюгативные) плазмиды могут передаваться из одной бактерии в другую.

Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие:

- 1) устойчивость к антибиотикам;
- 2) образование колицинов;
- 3) продукция факторов патогенности;
- 4) способность к синтезу антибиотических веществ;
- 5) расщепление сложных органических веществ;
- 6) образование ферментов рестрикции и модификации.

Термин «плазмиды» впервые введен американским ученым Дж. Lederbergом (1952) для обозначения полового фактора бактерий. Плазмиды несут гены, не обязательные для клетки-хозяина, придают бактериям дополнительные свойства, которые

в определенных условиях окружающей среды обеспечивают их временные преимущества по сравнению с бесплазмидными бактериями.

Некоторые плазмиды находятся под *строгим контролем*. Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хромосомы так, что в каждой бактериальной клетке присутствует одна или, по крайней мере, несколько копий плазмид.

Число копий плазмид, находящихся под *слабым контролем*, может достигать от 10 до 200 на бактериальную клетку.

Для характеристики плазмидных реплика-нов их принято разбивать на группы совместимости. *Несовместимость* плазмид связана с неспособностью двух плазмид стабильно сохраняться в одной и той же бактериальной клетке. Несовместимость свойственна тем плазмидам, которые обладают высоким сходством реплика-нов, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем же механизмом.

Некоторые плазмиды могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого реплика-на. Такие плазмиды называются *интегративными или эписомами*.

У бактерий различных видов обнаружены *R-плазмиды*, несущие гены, ответственные за множественную устойчивость к лекарственным препаратам — антибиотикам, сульфаниламидам и др., *F-плазмиды*, или половой фактор бактерий, определяющий их способность к конъюгации и образованию половых пилей, *Ent-плазмиды*, детерминирующие продукцию энтеротоксина.

Плазмиды могут определять вирулентность бактерий, например возбудителей чумы, столбняка, способность почвенных бактерий использовать необычные источники углерода, контролировать синтез белковых антибиотикоподобных веществ — бактериоцинов, детерминируемых плазмидами бактериоциногении, и т. д. Существование множества других плазмид у микроорганизмов позволяет полагать, что аналогичные структуры широко распространены у самых разнообразных микроорганизмов.

Плазмиды подвержены рекомбинациям, мутациям, могут быть элиминированы (удалены) из бактерий, что, однако, не влияет на их основные свойства. Плазмиды являются удобной моделью для экспериментов по искусственной реконструкции генетического материала, широко используются в генетической инженерии для получения рекомбинантных штаммов. Благодаря быстрому самокопированию и возможности конъюгаци-онной передачи плазмид внутри вида, между видами или даже родами плазмиды играют важную роль в эволюции бактерий.

Инсерционные последовательности, инсерционные элементы, IS-элементы (insertion sequences, IS-elements) [лат. *inserto* — вставлять, вкладывать] — простейшие транспозоны, мобильные нуклеотидные последовательности генома прокариот длиной от 700 до 1500 п.н., которые содержат на концах инвертированные повторы (несколько десятков п.н.) и не содержат никаких генов, кроме тех, которые необходимы для их перемещения (транспозиции) по геному. В разных штаммах *E. coli* в геноме присутствуют 19 копий IS1-элементов. Большинство других IS-элементов также представлено в хромосомах разных штаммов *E. coli* несколькими копиями. Транспозиции И.п. не сопряжены с их исключением из мест исходной локализации в плазмидах или хромосоме; при транспозиции И.п. удваивается, и одна его копия остается на прежнем месте, а другая попадает в новый локус (местоположение гена в хромосоме или плазмиде). Т. обр., транспозиции этого элемента сопряжены с репликацией (удвоением) его ДНК. Обычно И.п. встраиваются (интегрируют) в различные места бактериального генома, однако некоторые участки оказываются более предпочтительными, чем другие. Встраивание и исключение И.п. происходит с высокой точностью, что свидетельствует об участии в этих процессах ферментов, узнающих инвертированные концевые повторы. Ферментные системы, обуславливающие транспозиции И.п., по крайней мере, частично кодируются их собственной ДНК. Так, IS1, судя по длине его нуклеотидной последовательности, может кодировать лишь небольшие полипептиды, которые

участвуют в его транспозиции, вероятно, в комплексе с клеточными белками. Значение И.п. для эволюции бактерий связано с тем, что эти элементы при своих перемещениях инактивируют различные гены или нарушают нормальную регуляцию их экспрессии. Помимо прямого влияния на экспрессию гена (развития признака, контролируемого данным геном) вследствие внедрения И.п. непосредственно в кодирующую часть гена или его регуляторную зону, эти элементы могут влиять также на транскрипцию окружающих их последовательностей ДНК генома. Транспозиции И.п. могут вызывать слияние двух не связанных ранее генов или оперонов с образованием новых функциональных единиц, а также индуцировать все виды хромосомных перестроек. И.п. обнаружены П. Старлинджером, Г. Седлером и Дж. Шапиро в начале 70-х гг. прошлого века.

Инсерционные элементы являются простейшей разновидностью транспозиционных элементов. Они не несут никакой генетической информации, за исключением той, которая необходима для транспозиции. Они были обнаружены в бактериях, бактериофагах, плазмидах и кукурузе. Бактериальные элементы обозначаются префиксом IS, за которым следует типовой номер. IS из кишечной бактерии *Escherichia coli* - IS1 - имеет длину около 770 нуклеотидов, включая два неидентичных инвертированных повтора длиной 23 н.п. каждый. IS1 содержит две рамки считывания, *InsA* и *InsB*, которые кодируют одну или две разновидности транспозазы, фермента, катализирующего включение транспозиционных элементов в сайты встраивания. У *E.coli* существуют десятки различных разновидностей инсерционных элементов, и геномы большинства линий, выделенных из дикого типа, содержат различное количество каждого из них. ([Sawyer et al, 1987](#))

Контрольные вопросы: 1. Дать характеристику бактериальных плазмид. 2. Описать IS-элементы и транспозоны бактерий.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Мобильные диспергированные гены эукариот, их разнообразие и классификация. Ретропозоны. Псевдогены».

2.3.1 Цель работы: изучить мобильные генетические элементы эукариотических геномов.

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить мобильные диспергированные гены эукариот, их разнообразие и классификацию. Ретропозоны. Псевдогены.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.3.4 Описание (ход) работы:

Различают два основных класса подвижных элементов: транспозоны и ретротранспозоны. Такая классификация основана на молекулярных механизмах, с помощью которых перемещаются подвижные элементы.

Транспозоны перемещаются с участием комплекса белков, обеспечивающего активность фермента транспозазы, которая «узнает» элемент и обеспечивает его перенос на новое место. Мобильные элементы обычно фланкированы короткими повторами генома хозяина, служащими целевой последовательностью для их интеграции, причем они часто оканчиваются инвертированными повторами. Инвертированные повторы – это последовательности, направленные навстречу друг другу. Они необходимы для перемещения элемента, которое осуществляется благодаря их сближению друг с другом и

узнаванию транспозазами. Инвертированные повторы сближаются и точно отрезаются от соседних участков ДНК хозяина.

Успешному вырезанию элемента способствует дополнительная сверхспирализация двухнитевой спирали ДНК, обеспечивающая изгибы двойной спирали и сближение отдельных ее участков. Вырезанный транспозон внедряется в район вносимого транспозазой разрыва в молекуле-мишени и сшивается с ДНК хозяина в новом месте (см. рис. 1). Разрыв и зашивание осуществляются транспозазой и вспомогательными белками. Транспозаза может кодироваться как самим подвижным элементом, который будет перемещаться, так и другой копией элемента, локализованной в том же геноме в отдалении.

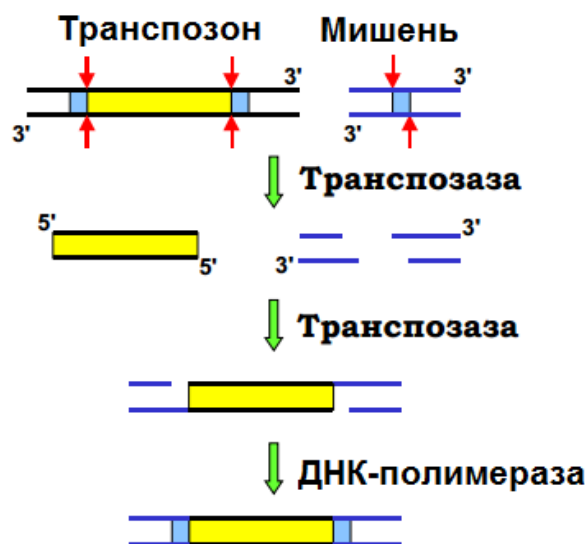


Рис.1. Механизм перемещения ДНК-транспозона [4]

Бреши в ДНК, оставляемая после вырезания транспозона, может залечиваться – застраиваться с участием гомологичного участка, например сестринской, только что редулицированной молекулы ДНК[2].

Число ДНК транспозонов не увеличивается при транспозиции, но число их копий в видовом геноме обычно может достигать от нескольких штук до нескольких сот. Эти элементы кодируют один или несколько белков, достаточных для того, чтобы транспозиция осуществилась. Структура их концевых последовательностей является более сложной, чем у ретротранспозонов, поскольку содержит два типа последовательностей, действующих в *cis* – положении, таких, как концевые инвертированные повторы (КИП) и субконцевые последовательности, которые совместно регулируют механизм вырезания–сшивания [1].

Другой большой класс подвижных элементов – это ретротранспозоны, они не вырезаются из хромосомы, как это делают транспозоны. Механизм их перемещения основан на существовании открытой в 1970 году Г. Теминым и Д. Балтимором реакции обратной транскрипции – синтеза нити ДНК на РНК. Химическая реакция протекает так же, как при образовании нити комплементарной ДНК на ДНК–матрице при репликации двухнитевой молекулы ДНК. Ретротранспозоны используют РНК в качестве посредника (рис.1) [3,5].

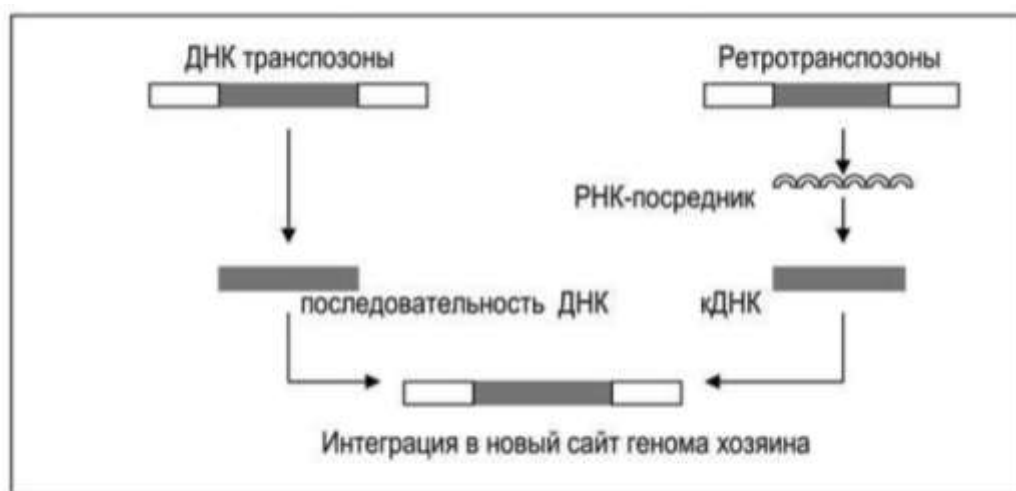


Рис.2. Транспозиция в новый сайт генома хозяина двух типов мобильных элементов посредством вырезания и последующей интеграции участка ДНК (слева) и с помощью РНК-посредника, сопровождаемая обратной транскрипцией кДНК и ее вставкой в новый сайт генома (справа) [3]

Ретротранспозоны транскрибируются подобно другим последовательностям генома, и полученная РНК используется в качестве матрицы для синтеза кДНК с помощью фермента обратной транскриптазы, кодируемого ДНК транспозона [3]. Новосинтезированный ретротранспозон встраивается в другой участок генома.

Активные ретротранспозоны млекопитающих делятся на три основные семьи: Alu-повторы, ДДП-1, SVA.

ДДП-1 ретротранспозоны – длинные диспергированные повторы – тип ретротранспозонов, который широко распространён у млекопитающих и составляет до 20 % генома. ДДП-1 элементы имеют длину около 6 тысяч пар оснований. Большинство этих ретротранспозонов в геноме представлено неполно, хотя существует примерно 150 полных и потенциально мобильных ДДП-1 элементов в последовательности ДНК человека и примерно 3000 – у мыши [6].

ДКП – длинные концевые повторы – ретротранспозоны, имеющие конечные повторяющиеся последовательности, которые играют важную роль в транскрипции и обратной транскрипции РНК транспозона. ДКП-элементы кодируют белки pol и gag, которые близки к белкам ретровирусов, но, в отличие от последних, ДКП не хватает белков, которые смогли бы сформировать внешнюю оболочку (суперкапсид) и выйти из клетки.

КДП – короткие диспергированные повторы, являются неавтономными ретротранспозонами: они требуют активности ДДП-1 элементов для передвижения, в ДНК последовательности КДП содержат только участок связывания РНК-полимеразы. В число КДП входят Alu-ретротранспозоны [7].

Alu-повтор (Alu от *Arthrobacter luteus*) — широко распространённые мобильные элементы в геноме человека. Alu-элементы имеют длину около 300 пар оснований и часто расположены в интронах, участках генома, которые не транслируются, и межгенных участках. Приставку Alu- ретротранспозоны получили за то, что они содержат последовательность распознавания рестрикционного энзима AluI. Анализ последовательностей показал, что Alu – элементы возникли у приматов примерно 65 миллионов лет назад от гена 7SL РНК, который входит в рибосомный комплекс. Alu-ретротранспозоны не имеют собственной обратной транскриптазы, поэтому для передвижения им необходимы ферменты ДДП-1 элементов [8].

SVA – мобильные элементы длиной в 2–3 тысячи пар оснований ДНК, состоящие из нескольких частей. SVA элементы значительно варьируют в длину из-за разного количества составляющих повторов. Они не являются автономными и нуждаются в

белках, закодированных в ДДП1 ретротранспозонах для передвижения, но они активны в геноме человека. SVA–элементы претерпевают высокий уровень метилирования ДНК в большинстве тканей человека[6].

Ретротранспозоны широко распространены у эукариот, населяя геномы дрожжей, растений, насекомых и позвоночных, включая человека. Ретротранспозоны пока не обнаружены у прокариот. Тысячи различных семейств ретротранспозонов могут занимать до 70–85% ядерной ДНК растений и животных. Около 75% генома кукурузы представлено ретротранспозонами, главным образом ДКП типа. В то же время маленький геном дрожжей *Saccharomices cerevisiae* содержит только лишь пять семейств ДКП ретротранспозонов, занимающих лишь 3% их геномной ДНК. В геноме *Arabidopsis* обнаружено несколько сот семейств ДКП и без ДКП ретротранспозонов, которые составляют около 14% его ядерной ДНК. У млекопитающих число LINE и SINE может достигать сотни тысяч копий, составляя 35% величины их генома. В целом разнообразие и численность мобильных элементов в геномах растений выше, чем у представителей других царств. На рис.2. отображена представленность различных типов транспозонов в геноме человека.



Рис.2. Представленность транспозонов в геноме человека

Роль мобильных элементов в геноме эукариот

Присутствие мобильных элементов в геноме является необходимым для генерирования генетического разнообразия посредством гомологической рекомбинации в неаллельных локусах, возникновения хромосомных перестроек и изменения экспрессии генов путем инсерций в их регуляторные последовательности или путем разрушения генов посредством инсерций в их кодирующие последовательности. ДНК транспозоны способны вызывать нестабильные мутации благодаря процессу вырезания и вставки своих нуклеотидных последовательностей в новые сайты.

Мобильные элементы как относительно автономные последовательности ДНК со своими собственными генами, обеспечивающими транспозицию, могут размножаться в видовом геноме, одновременно увеличивая при этом груз вредных мутаций, которые снижают его среднюю приспособленность. Передвижение транспозонов может вызвать ряд цитогенетических эффектов, включая разрывы хромосом и инверсии.

Ранние наблюдения МакКлинток и других исследователей показали, что транспозоны могут содействовать переносу генов не только в рамках видового генома, но также могут облегчать и горизонтальный перенос генов между разными видовыми геномами.

Многочисленные мобильные элементы, встроенные в видовые геномы, играют свою роль в горизонтальном переносе ДНК как внутри отдельного вида, так и между видовыми геномами. Этот процесс сопровождает и дополняет процесс вертикальной передачи видовых геномов из одного поколения в другое и вносит свой вклад в реорганизацию геномов и изменение их размеров в ходе колонизации и эволюции. Существуют также механизмы, которые ограничивают подвижность мобильных элементов и их накопление в видовых геномах, способствуя таким образом сохранению организации генома и его приспособленности [3].

Ретротранспозоны залечивают двухнитевые разрывы ДНК. Обычно двухнитевой разрыв залечивается с помощью гомологичной молекулы ДНК, например сестринской, только что реплицированной нити. Однако, если клетка лишена обычной системы залечивания двухнитевого разрыва, то в качестве заплатки может быть использована подвижная ДНК. Оказалось, что в роли такой подвижной ДНК может выступать реплицирующаяся ДНК ретротранспозонов. В этом случае спасательную функцию осуществляет класс ретротранспозонов, содержащих ДКП. Заплата позволит хромосоме сохранить целостность и не утратить концевой фрагмента. Правда, брешь в двухнитевой спирали ДНК будет залеплена заплаткой из ретротранспозона, то есть исходная нуклеотидная последовательность не будет восстановлена. Однако если район разрыва не содержал существенного гена, то клетка, а возможно, и организм сохраняют жизнеспособность. Возможность участия ретротранспозонов, содержащих длинные концевые повторы, в процессе заживления двухнитевых разрывов была обнаружена в клетках дрожжей недавно, поэтому молекулярные механизмы обнаруженного явления остаются пока невыясненными [2].

Ретротранспозоны выступают как компоненты генома, спасающие хромосому от укорачивания. При воспроизведении ДНК перед клеточным делением синтез ДНК начинается с образования затравки РНК, поскольку фермент ДНК-полимераза способен только добавлять дезоксирибонуклеотидные звенья к 3'-концу полинуклеотидной цепи, но не способен начинать синтез цепи ДНК. Затравка затем удаляется, и бреши застраиваются. Однако на одном из концов реплицирующихся молекул останется брешь, которую не удастся заделать с помощью ДНК-полимеразы, работающей в 5'-3' направлении. Возникает опасность, что одиноко выступающий одонитевый конец ДНК будет уничтожен каким-либо ферментом, в результате чего молекула укоротится с конца. Если не принять соответствующих мер, то при каждом акте репликации ДНК хромосома будет укорачиваться с концов. В конечном итоге могут быть утрачены важные гены и клетка погибнет. В качестве спасателей в ряде случаев выступают ретротранспозоны, относящиеся к семействам, без длинных концевых повторов. Ретротранспозоны перемещаются, образуя повторяющуюся структуру, в которой элементы соединены друг с другом по типу «голова к хвосту». Таким образом, если эти ретротранспозоны и существовали когда-то как элементы-паразиты, то впоследствии геном хозяина приспособил их для выполнения столь важной функции, как сохранение концевых участков хромосом. Эти ретротранспозоны стали уже не эгоистами, а бесценными помощниками, спасающими хромосому от потери генов [2].

Репликация транспозонов может вызвать некоторые заболевания. По состоянию на 2012 год задокументировано 96 различных заболеваний человека, причиной которых является *de novo* внедрение мобильных генетических элементов. *Alu*-повторы часто вызывают хромосомные аберрации и являются причиной 50 разновидностей заболеваний. Так, у нейрофиброматоза I типа было найдено 18 случаев встроенных ретротранспозонов, 6 из которых происходят в 3 специфических местах. Активность ДДП-1 мобильных элементов в соматических тканях зафиксирована у пациентов с раком легких.

Если транспозиция, которая вызывает заболевания, происходит в гаметах, то следующие поколения наследуют болезни. Так, гемофилия может возникать из-за встраивания ретротранспозона ДДП-1 в участок ДНК, кодирующий ген VIII фактора

свертывания крови. У мышей были зафиксированы случаи онкогенеза, остановки развития и стерильность в связи со встраиванием мобильных элементов генома [10,11].

Естественный отбор способствует возникновению динамического баланса между положительными и отрицательными воздействиями мобильных элементов на приспособленность генома. Те видовые геномы, которые не способны противостоять вторжению генетических паразитов, неизбежно вытесняются из биосферы. Однако в процессе коэволюции большинство видов выработало компромиссную стратегию для защиты генома от неограниченного размножения мобильных элементов. Увеличение размера генома, например, ограничено оптимальным соотношением между ядром и объемом клетки, способным поддерживать установившийся темп метаболических процессов.

Поэтому лишь те мобильные элементы, которые приобрели отрицательную обратную связь на эффект дозы, сохранились в ходе эволюции, в то время как более агрессивные ДНК-паразиты исчезли [3].

Поскольку мобильные элементы генома способны к встраиванию в хроматин, они используются в генной инженерии для специального и контролируемого встраивания генов или участков ДНК, которые изучают учёные. Транспозоны используются для мутагенеза и для определения регуляторных элементов генома в лабораториях. Наиболее изученные транспозоны с успехом используют в качестве молекулярных векторов (молекула нуклеиновой кислоты, чаще всего ДНК, используемая в генетической инженерии для передачи генетического материала другой клетке) [1, 9].

Кроме использования транспозонов в генной инженерии, изучение активности транспозонов является методом филогенетики. Путём анализа и сопоставления нуклеотидных последовательностей геномов различных видов можно найти транспозоны, которые имеются у одних видов, но отсутствуют у других. Виды, у которых есть одинаковый ретротранспозон, скорее всего получили его от общего предка. Таким образом, можно получить информацию об эволюционном развитии видов и строить филогенетические деревья [8].

Контрольные вопросы: 1. Что такое транспозоны? 2. Описать различные ретротранспозоны. 3. Какова роль мобильных генетических элементов эукариот?

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Неядерные геномы. Особенности структуры ДНК митохондрий и хлоропластов».

2.4.1 Цель работы: изучить генетическую систему митохондрий и хлоропластов.

2.4.2 Задачи работы:

1. Генетическая структура митохондрий.
2. Генетическая система хлоропластов.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, средства мультимедиа

2.4.4 Описание (ход) работы:

1. Митохондриальный геном.

К настоящему времени прочитано более 100 разных геномов митохондрий. Набор и количество их генов в митохондриальных ДНК, для которых полностью определена последовательность нуклеотидов, сильно различаются у разных видов животных, растений, грибов и простейших. Наибольшее количество генов обнаружено в митохондриальном геноме жгутикового простейшего *Rectinomonas americana* – 97 генов, включая все кодирующие белок гены, найденные в мтДНК других организмов. У

большинства высших животных геном митохондрий содержит 37 генов: 13 для белков дыхательной цепи, 22 для тРНК и два для рРНК (для большой субъединицы рибосом 16S рРНК и для малой 12S рРНК). У растений и простейших, в отличие от животных и большинства грибов, в митохондриальном геноме закодированы и некоторые белки, входящие в состав рибосом этих органелл. Ключевые ферменты матричного полинуклеотидного синтеза, такие как ДНК-полимераза (осуществляющая репликацию митохондриальной ДНК) и РНК-полимераза (транскрибирующая геном митохондрий), зашифрованы в ядре и синтезируются на рибосомах цитоплазмы. Этот факт указывает на относительность автономии митохондрий в сложной иерархии эукариотической клетки. Геномы митохондрий разных видов отличаются не только по набору генов, порядку их расположения и экспрессии, но по размеру и форме ДНК. Подавляющее большинство описанных сегодня митохондриальных геномов представляет собой кольцевые суперспирализованные двуцепочечные молекулы ДНК. У некоторых растений наряду с кольцевыми формами имеются и линейные, а у некоторых простейших, например инфузорий, в митохондриях обнаружены только линейные ДНК. Как правило, в каждой митохондрии содержится несколько копий ее генома. Так, в клетках печени человека около 2 тыс. митохондрий, и в каждой из них – по 10 одинаковых геномов. В фибробластах мыши 500 митохондрий, содержащих по два генома, а в клетках дрожжей *S. cerevisiae* – до 22 митохондрий, имеющих по четыре генома. Митохондриальный геном растений, как правило, состоит из нескольких молекул разного размера. Одна из них, “основная хромосома”, содержит большую часть генов, а кольцевые формы меньшей длины, находящиеся в динамическом равновесии, как между собой, так и с основной хромосомой, образуются в результате внутри- и межмолекулярной рекомбинации благодаря наличию повторенных последовательностей. В митохондриях большинства организмов (кроме высших животных) часть кольцевых молекул ДНК присутствует в виде олигомеров, которые можно разделить на три класса: линейные; кольцевые, имеющие контурную длину, кратную длине мономерных колец; цепные, катенаны, состоящие из топологически связанных, т.е. продетых друг в друга, мономерных колец. Так, в единственной митохондрии простейших из отряда кинетопластид, включающего эндопаразита человека – трипаному, содержатся тысячи кольцевых молекул ДНК. У *Trypanosoma brucei* имеются два типа молекул: 45 одинаковых максиколец, каждое из которых состоит из 21 тыс. пар нуклеотидов, и 5.5 тыс. идентичных друг другу миниколец по 1000 пар нуклеотидов. Все они, соединяясь в катенаны, образуют переплетенную сеть, которая вместе с белками формирует структуру, называемую кинетопластом.

2. Мутации генов митохондрий.

Митохондриальные болезни – гетерогенная группа заболеваний, обусловленных генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий и нарушением тканевого дыхания. Для постановки диагноза митохондриального заболевания важен комплексный генеалогический, клинический, биохимический, морфологический и генетический анализ. Основным биохимическим признаком митохондриальной патологии является развитие лактат-ацидоза, обычно выявляется гиперлактатацидемия в сочетании с гиперпируватацидемией. Число различных вариантов достигло 120 форм. Отмечается стабильное повышение концентрации молочной и пировиноградной кислот в цереброспинальной жидкости.

Митохондриальные болезни (МБ) представляют собой существенную проблему для современной медицины. По способам наследственной передачи среди МБ выделяют заболевания, наследуемые моногенно по менделевскому типу, при которых в связи с мутацией ядерных генов либо нарушаются структура и функционирование митохондриальных белков, либо изменяется экспрессия митохондриальной ДНК, а также болезни, вызываемые мутациями митохондриальных генов, которые в основном передаются потомству по материнской линии.

Данные морфологических исследований, свидетельствующие о грубой патологии митохондрий: аномальная пролиферация митохондрий, полиморфизм митохондрий с нарушением формы и размеров, дезорганизация крист, скопления аномальных митохондрий под сарколеммой, паракристаллические включения в митохондриях, наличие межфибриллярных вакуолей.

Формы митохондриальных заболеваний

1. Митохондриальные болезни, вызванные мутациями митохондриальной ДНК

1.1. Болезни, обусловленные делециями митохондриальной ДНК

1.1.1. Синдром Кернса-Сейра

Заболевание проявляется в возрасте 4-18 лет, прогрессирующая наружная офтальмоплегия, пигментный ретинит, атаксия, интенционный тремор, атриовентрикулярная блокада сердца, повышение уровня белка в цереброспинальной жидкости более 1 г\л, "рванные" красные волокна в биоптатах скелетных мышц

1.1.2. Синдром Пирсона

Дебют заболевания с рождения или в первые месяцы жизни, иногда возможно развитие энцефаломиопатий, атаксии, деменции, прогрессирующей наружной офтальмоплегии, гипопластическая анемия, нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, прогрессирующее течение

2. Болезни, обусловленные точковыми мутациями митохондриальной ДНК

2.1. Наследственная атрофия зрительных нервов Лебера

Материнский тип наследования, острое или подострое снижение остроты зрения на один или оба глаза, сочетание с неврологическими и костно-суставными нарушениями, микроангиопатия сетчатки, прогрессирующее течение с возможностью ремиссии или восстановления остроты зрения, дебют заболевания в возрасте 20-30 лет

2.2. Синдром NAPR (невропатия, атаксия, пигментный ретинит)

Материнский тип наследования, сочетание нейропатии, атаксии и пигментного ретинита, задержка психомоторного развития, деменция, наличие "рванных" красных волокон в биоптатах мышечной ткани

2.3. Синдром MERRF (миоклонус-эпилепсия, "рванные" красные волокна)

Материнский тип наследования, дебют заболевания в возрасте 3-65 лет, миоклоническая эпилепсия, атаксия, деменция в сочетании с нейросенсорной глухотой, атрофией зрительных нервов и нарушениями глубокой чувствительности, лактацидоз, при проведении ЭЭГ обследования выявляются генерализованные эпилептические комплексы, "рванные" красные волокна в биоптатах скелетных мышц, прогрессирующее течение.

2.4. Синдром MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобные эпизоды)

Материнский тип наследования, дебют заболевания в возрасте до 40 лет, непереносимость физических нагрузок, мигренеподобные головные боли с тошнотой и рвотой, инсультоподобные эпизоды, судороги, лактацидоз, "рванные" красные волокна в биоптатах мышц, прогрессирующее течение.

3. Патология, связанная с дефектами межгеномной коммуникации

3.1. Синдромы множественных делеций митохондриальной ДНК

Блефароптоз, наружная офтальмоплегия, мышечная слабость, нейросенсорная глухота, атрофия зрительных нервов, прогрессирующее течение, "рванные" красные волокна в биоптатах скелетных мышц, снижение активности ферментов дыхательной цепи.

3.2. Синдром делеции митохондриальной ДНК

Аутосомно-рецессивный тип наследования

Клинические формы:

3.2.1. Фатальная инфантильная

а) тяжелая печеночная недостаточность б) гепатопатия в) мышечная гипотония

Дебют в периоде новорожденности

3.2.2. Врожденная миопатия

Выраженная мышечная слабость, генерализованная гипотония, кардиомиопатия и судороги, поражение почек, глюкозурия, аминоацидопатия, фосфатурия

3.2.3. Инфантильная миопатия

возникает в первые 2 года жизни, прогрессирующая мышечная слабость, атрофия проксимальных групп мышц и утрата сухожильных рефлексов, течение быстро прогрессирующее, летальный исход в первые 3 года жизни.

3. Полиморфизм митохондриальной ДНК и его использование в популяционно-генетических исследованиях.

Полиморфизм митохондриальной ДНК (мтДНК) широко используется в филогенетических исследованиях и при изучении генетического разнообразия. Гаплоидная мтДНК, которую несут митохондрии в цитоплазме клеток, имеет материнский характер наследования (индивидуумы наследуют мтДНК от своих матерей, но не от отцов) и высокую скорость мутирования; мтДНК не рекомбинирует. Эти характеристики позволяют биологам реконструировать эволюционные взаимосвязи между видами и внутри них на основании оценок распределения мутаций в мтДНК. МтДНК-маркеры могут также обеспечивать быстрый способ выявления гибридизации между видами или подвидами домашних животных. Полиморфизм в последовательности гипервариабельного района Д-петли, или контролирующей области мтДНК вносит очень большой вклад в идентификацию диких предковых видов одомашнированных видов животных, установление географического распределения генетического разнообразия и в понимание процессов одомашнивания животных. Например, происхождение современного европейского крупного рогатого скота из Среднего Востока (средиземноморский центр происхождения) было продемонстрировано недавно в работе Трой и др. (2001).

2. Фотосинтез является одним из главных биологических процессов, обеспечивающих жизнь на планете. В клетках фотосинтезирующих организмов происходят превращение световой энергии в химическую, образование органического вещества из воды и углекислого газа. Фотосинтезирующие бактерии осуществляют фотосинтез без выделения кислорода, а растения, водоросли и цианобактерии способны к оксигенному фотосинтезу, в процессе которого происходит фотолиз воды с выделением молекулярного кислорода, необходимого для дыхания большинства организмов. Оксигенный фотосинтез осуществляется у растений и водорослей в мембранных (тилакоидных) структурах хлоропласта - специализированной клеточной органеллы. В трансформации световой энергии принимают участие четыре основных комплекса: фотосистема I (ФС1), фотосистема II (ФС2), цитохромный (b₆/f) и АТФ-синтетазный комплексы, встроенные в липидные мембраны тилакоидов. Хлоропласты представляют собой сложные мембранные структуры, которые содержат все необходимое для синтеза белков. Они обладают собственными ДНК, РНК и белоксинтезирующей системой, отличными от соответствующих компонентов остальной клетки.

Рибосомы и РНК.

От 20 до 50% популяции рибосом фотосинтезирующих клеток составляют рибосомы хлоропластов, которые формируются и локализуются в этих органеллах. Большая часть рибосом хлоропластов имеет коэффициент седиментации 67-70S. В хлоропластах находятся специфические тРНК, не встречающиеся в цитоплазме. Кроме того, хлоропласты содержат мРНК, которая транслируется на хлоропластных рибосомах с образованием белков.

ДНК хлоропластов

ДНК представляет хлоропластов собой кольцевой дуплекс, содержащий какое-то количество (но далеко не все) генов, существенных для функционирования хлоропластов и поддержания их структуры, и имеет достаточно большую длину: как правило, 120-180 тпн. Хлоропласты полиплоидны и содержат 10-60 копий кольцевой ДНК. Молекулы ДНК

обычно расположены в 5-6 участках хлоропласта. Полностью установлены последовательности ДНК хлоропластов у печеночников (моховидные), табака (двудольные) и риса (однодольные).

Структура хлоропластной ДНК.

По данным рестрикционного картирования, структура ДНК хлоропластов, в отличие от митохондриальной ДНК, в пределах вида остается довольно консервативной. Так, хлоропластная ДНК шпината имеет структуру, типичную для соответствующей ДНК всех покрытосеменных, как одно-, так и двудольных. В пределах сегмента длиной примерно 25 тпн находятся четыре гена рРНК (16S, 23S, 5S и 4,5S), и этот сегмент повторен в обратной ориентации еще раз через 15 т. п. н. Всего хлоропластная ДНК кодирует примерно 100 полипептидов и 35 РНК (рРНК и тРНК). Продукты многих генов с открытой рамкой считывания уже идентифицированы. Единственное известное исключение из правил организации хлоропластной ДНК покрытосеменных - ДНК некоторых бобовых (например, гороха), у которых утрачена одна копия инвертированного повтора. Такой повтор присутствует даже в хлоропластной ДНК зеленой водоросли *Chlamidomonas reinhardii*, но не у *Euglena*. Последняя отличается тем, что у нее имеются три tandemных повторяющихся участка длиной 5,6 т.п.н., которые содержат гены рРНК. В отличие от ДНК митохондрий, в ДНК хлоропластов, по-видимому, используется универсальный генетический код. В ней содержится много генов тРНК, и в тех полипептидных генах, которые были исследованы, присутствует большинство универсальных кодонов.

Структура хлоропластных генов.

Структура хлоропластных белков и соответствующих генов у самых разных видов высококонсервативна. Скорость эволюции кодирующих последовательностей хлоропластных генов значительно ниже скорости эволюции ядерных генов.

В генах тРНК, рРНК и полипептидов разных видов содержатся интроны, однако картина их распределения неодинакова. Например, у *Euglena* в генах хлоропластных тРНК интроны отсутствуют, в отличие от соответствующих генов у многих организмов. У той же *Euglena* в полипептидных генах интроны имеются; в то же время многие из гомологичных мРНК цианобактерии и высших растений не нуждаются в сплайсинге. Даже среди высших растений одни полипептидные гены содержат интроны, а другие нет. В отличие от всех других исследованных организмов, у *Chlamidomonas reinhardii* ген 23S-рРНК прерывистый. Пока никаких закономерностей в наличии или отсутствии интронов в генах хлоропластов ДНК не обнаружено.

В большинстве хлоропластных интронов протяженные открытые рамки считывания отсутствуют. Впрочем, такая рамка длиной 509 кодонов обнаружена в интроне гена лизиновой тРНК в хлоропластах табака и в интроне гена 23S-рРНК у *C.reinhardii*. В соответствующих белковых продуктах имеются участки, гомологичные участкам матураз, кодируемым митохондриальными интронами дрожжей. Таким образом, интроны как хлоропластных, так и митохондриальных ДНК могут содержать функциональные сегменты.

Некоторые мРНК у водорослей и высших растений образуются в результате транс-сплайсинга. Например, 5'-экзон гена, кодирующего рибосомный белок хлоропластов slz, транскрибируется с одной цепи ДНК, а два других экзона - с другой цепи, на расстоянии 30 т.п.н. от этого локуса. При транс-сплайсинге эти транскрипты соединяются в одну функциональную мРНК.

Генетический контроль аппарата фотосинтеза

Главная особенность строения хлоропласта заключается в том, что в нем есть собственные ДНК и рибосомы, но аппарат фотосинтеза формируется из белков, только часть, из которых синтезируется в пластиде, в то время как другие кодируются ядерными генами, синтезируются в цитоплазме и затем транспортируются в пластиду и там включаются в хлоропластные структуры. Таким образом, формирование хлоропласта,

сборка фотосистем и функционирование аппарата фотосинтеза находятся под двойным генетическим контролем. Каждый из четырех основных комплексов аппарата фотосинтеза состоит из белков, кодируемых как хлоропластным, так и ядерным геномом. Мутации в генах, кодирующих белки фотосистем, могут снижать эффективность фотосинтеза или даже полностью блокировать его, как это наблюдается при инактивации многих генов, кодирующих белки фотосистем. К числу обслуживающих белков относятся ферменты биосинтеза хлорофилла и каротиноидов, белки – транспортеры металлов, ионов, ко-факторов, белки-транслоказы, доставляющие нужные белки из цитоплазмы в хлоропласт, различные протеазы, протеинкиназы, фосфатазы и другие вспомогательные белки, участвующие в сборке, активации и обновлении фотосинтетических комплексов, в уборке деградированных белков.

Молекулярные механизмы регуляции действия генов фотосинтеза

Хлоропластные гены имеют много общего с прокариотическими генами. У большинства хлоропластных генов нет интронов, характерных для эу-кариотических генов. Многие хлоропластные гены сгруппированы в кластеры, которые являются единицами транскрипции. Им свойственны промоторы, узнаваемые РНК-полимеразой прокариотического типа. В промоторной области некоторых генов фотосинтеза обнаружены регуляторные участки, которые могут выполнять функции усилителей или глушителей транскрипции. Таким образом, в принципе имеются условия для реализации прокариотических механизмов регуляции работы хлоропластных генов на уровне транскрипции. Однако в конце 80-х годов стало ясно, что экспрессия большинства хлоропластных генов контролируется не на уровне транскрипции, а уже после образования иРНК.

Контрольные вопросы: 1. Организация митохондриального генома. 2. Мутации генов митохондрий. 3. ДНК хлоропластов. 4. Структура хлоропластных генов.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Структура и уровни компактизации хроматина у эукариот. Нуклеосомы».

2.5.1 Цель работы: изучить структуру и уровни компактизации хроматина у эукариот.

2.5.2 Задачи работы: изучить структуру и уровни компактизации хроматина у эукариот.

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.5.4 Описание (ход) работы:

ДНК в ядрах клеток эукариот обычно находится в тесном взаимодействии с ядерными белками разных групп: основными (гистоновыми) и кислыми (негистоновыми). Ассоциируясь, ДНК и белки образуют единый нуклеопротеидный комплекс – дезоксирибонуклеопротеид (ДНП). Процентное соотношение сухого веса всех указанных компонентов ДНП таково: ДНК – 35–40 %, гистоновые белки – 30–50 %, негистоновые белки – 4–33 %, то есть 40 % сухого веса составляет ДНК и около 60 % – белки.

Термин «хроматин» (от греч. chroma – цвет, краска) был введен в 1880 году немецким гистологом Вальтером Флеммингом (1843–1905). Хроматин легко окрашивается ядерными красителями при исследовании клеточного препарата с помощью светового микроскопа.

Хроматином обычно называют дисперсное (деспирализованное) состояние хромосом в интерфазе клеточного ядра эукариот (в неделящейся клетке). Но с начала

деления ядра молекулы ДНК уже спирализированы (упакованы) в хромосомы. Одна молекула ДНК (точнее – комплекс ДНП) представляет собой одну хромосому. Спирализацию, или упаковку, ДНК осуществляют преимущественно гистоны.

Белки хроматина

В структурной организации ДНП центральную роль играют специфические белки – гистоны.

Гистоны – это относительно небольшие по молекулярной массе белки, присутствуют в ядрах клеток эукариот. Гистоновые белки богаты остатками аминокислот аргинина и лизина, определяющими их щелочные свойства. Практически все гистоны одинаковы, среди них насчитывают 5–7 типов молекул, обладающих сходными свойствами. Гистоны – это структурные белки, выполняющие важную роль – упаковку ДНК. Например, в растянутом состоянии двойная спираль ДНК, содержащаяся в хромосоме человека, имеет длину в среднем 4 – 5 см, а будучи спирализованной в хромосоме при участии гистонов, измеряется долями микрометра. По сравнению с остальными белками, присутствующими в клетке, количество гистонов в клетке очень велико – оно почти равно массе ДНК, содержащейся в ядре, что свидетельствует об их активном участии в структурировании хроматина. Известно также, что гистоновые белки являются регуляторами биосинтеза нуклеиновых кислот (и ДНК, и РНК). Гистоны синтезируются в цитоплазме, но затем транспортируются в ядро и там связываются с ДНК во время ее репликации. При этом синтез гистонов и ДНК синхронизирован. Молекулярный комплекс ДНК-гистоны имеет форму особых субъединиц – нуклеосом (от лат. nucleus – ядро и греч. soma – тело).

Кроме того, в состав хроматина входит значительное количество других белков, объединяемых общим названием «негистоновые белки».

Негистоновые белки в сравнении с гистонами, наоборот, очень разнообразны. В хроматине насчитывается несколько сотен типов их молекул. Среди них – ферменты, обеспечивающие процессы репликации ДНК, транскрипции, а также некоторые белки ядерного матрикса и матрикса ядрышка. Полагают, что негистоновые белки хроматина выполняют и некоторые регуляторные функции. Именно негистоновые белки участвуют в формировании самых высоких уровней упаковки ДНК.

Хроматин – это самый существенный, основной компонент ядерного аппарата клетки; из него образованы хромосомы клеток эукариот.

Формы упаковки ДНК

В процессе подготовки ядра клетки к делению, в интерфазе клеточного цикла, молекулы ДНК ассоциируются с белками и с их участием начинают «упаковываться», то есть скручиваться до минимальных размеров. Процесс упаковки хроматина (ДНП) до состояния размеров хромосомы называют процессом компактизации. Ведущая роль в организации расположения ДНК, ее компактизации и регулировании функциональных нагрузок принадлежит белкам.

Различают несколько структурных уровней компактизации хроматина в ядре клеток эукариот; от двухспиральной молекулы ДНК до ее суперупакованного состояния в хромосоме.

Как отмечалось выше, гистоны, синтезируемые в цитоплазме, транспортируются в ядро, где они связываются с длинной нитевидной цепью ДНК, начиная процесс ее упаковки. Среди ассоциированных с ДНК белков – гистоны H3 и H4, содержащие большое количество аргинина, H2A и H2B, умеренно обогащенные лизином, и H1, представляющий собой не одну молекулу, а целый класс близкородственных белков, обогащенных лизином. Для всех классов гистонов, особенно для H1, характерно кластерное (групповое) распределение основных аминокислот на N- и C-концах молекулы. У гистона H1 обычно один N-конец связывается с другими гистомами, а C-конец взаимодействует с ДНК. Эти гистоны и образуют нуклеосомы.

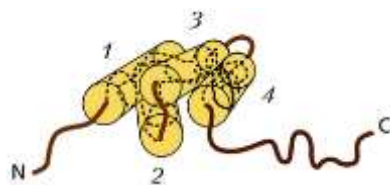


Схема третичной структуры белка гистона Н1: спиральные участки (1–4) и фибриллярные С- и N-концы полипептидной цепи

Нуклеосомы – структурные единицы хроматина, представляющие собой участки нити ДНК длиной около 200 пар оснований, уложенные на дисковидные гистоновые частицы диаметром около 10–11 нм. Они представляют собой октамер, или ядро, которое состоит из восьми молекул гистонов четырех типов (Н2А, Н2В, Н3 и Н4, по две молекулы каждого). Вокруг гистонового октамера участок молекулы ДНК длиной в 140 пар нуклеотидов делает 1,75 витка. Диаметр сформированной таким образом нуклеосомы достигает 10 нм. Молекулы гистона (Н1) не входят в структуру нуклеосом, но обеспечивают образование более высоких уровней упаковки ядерной ДНК.

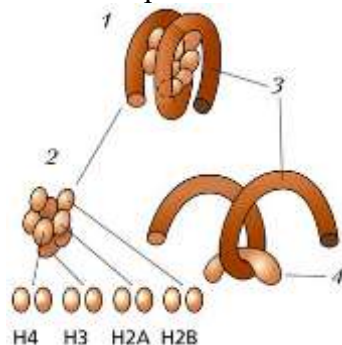
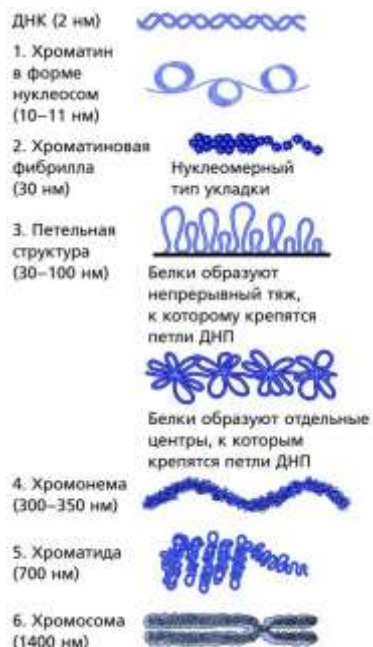


Схема строения нуклеосомы: 1 – нуклеосомная частица; 2– октамер, охватывающий четыре пары гистонов; 3 – фрагмент ДНК длиной в 146 пар оснований; 4 – гистон Н1

Формы упаковки (компактизации) хроматина (ДНП) в их последовательном усложнении показаны на схеме.

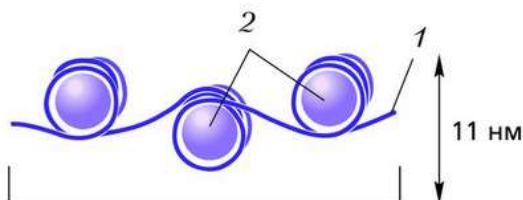


Уровни упаковки хроматина в ядре клеток эукариот (1-6 – уровни упаковки хроматина)

Уровни упаковки ДНК

Первым уровнем можно считать молекулярную форму ДНК в виде двойной спирали. Но поскольку она отдельно от белков в ядре практически не присутствует, чаще первым уровнем называют упаковку молекулы ДНК в нуклеосомной форме ДНП.

1. Первый уровень упаковки ДНП – *нуклеосомная нить*; она представляет собой структуру, напоминающую бусы на нитке, где в качестве бусин выступают нуклеосомы, а в качестве нитки – цепь ДНК. При этом толщина хроматиновой нити (ДНП) в нуклеосомах достигает 10–11 нм, что определяется фактически размерами самих нуклеосом.



Нуклеосомная нить («бусины на нитке»): 1 – ДНК; 2 – нуклеосома

2. *Хроматиновая фибрилла* – второй уровень упаковки хроматина. Представляет собой дальнейшую укладку нуклеосомной нити (бусин на нитке) в спираль с помощью гистона (H1). При формировании хроматиновой фибриллы происходит 40-кратная компактизация ДНП. Толщина такой фибриллы достигает уже 30 нм. Однако такого укорочения молекулы ДНК еще недостаточно даже для интерфазной хромосомы.

3. *Петельная структура* – третий уровень компактизации хроматина. Негистоновые белки образуют ось, или осевой скелет, – непрерывный тяж, к которому крепятся петли ДНП, имеющие форму хроматиновой фибриллы. На петельном уровне ДНК может достаточно легко освобождаться от упаковывающих ее белков, и на соответствующих участках становится возможной транскрипция (то есть синтез РНК).

4. *Хромонема* – форма хроматина четвертого уровня упаковки. Образуется путем конденсации (укладки) петельных фибрилл в отдельные участки – хромомерные (утолщенные) центры, которые у некоторых видов эукариот выглядят как узелки. При этом в самом конце интерфазы образуется серия динамических петель с большой толщиной (шириной). Толщина хромонемы уже достигает от 300 до 700 нм. В итоге достигается еще более плотная упаковка хроматина, прежде всего цепи ДНК.

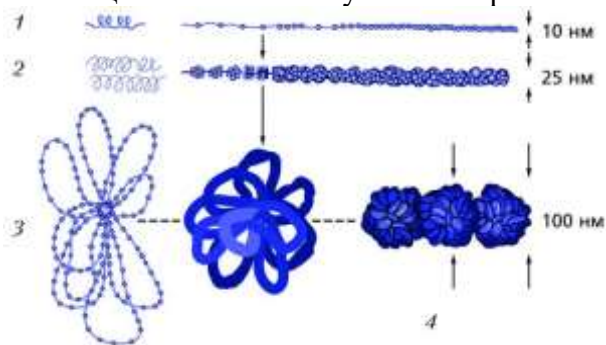


Схема начальных уровней компактизации хроматина: 1 – нуклеосомный; 2 – нуклеомерный; 3 – хромомерный (петлевой домен); 4 – хромонемный

5. Перед началом деления ядра происходит *удвоение хромонем*, то есть их репликация и самовоспроизведение. При удвоении хромосомного аппарата обе сестринские хромонемы укладываются спирально или петлеобразно вместе, образуя хроматиду. В этом случае упакованная хромосомная нить достигает 700 нм в ширину.

6. *Хромосома* – шестая, последняя и самая суперспирализованная стадия упаковки. Состоящая из двух хроматид, она уплотнена, по сравнению с молекулой ДНК, в 100–500 раз. Ее толщина (ширина) достигает примерно 1400 нм. На стадии метафазы хромосомы уже видны в световой микроскоп.

Первые три уровня упаковки хроматина имеют место в интерфазном ядре и обозначаются на микрофотографиях как эухроматин, но с отдельными участками

гетерохроматина. Начиная с третьего (петельного) уровня упаковка хроматина стабилизируется белками и разблокировка цепей ДНК происходит только на период считывания с них информации, то есть при синтезе РНК и редупликации ДНК. Однако еще до начала клеточного деления, в конце интерфазы, хроматин снова полностью спирализуется до уровня хромонем для обеспечения образования дочерних двойных цепей как основы хроматид, из которых впоследствии формируются хромосомы дочерних клеток.

Таким образом, процесс образования хромосом – сложное структурно-морфологическое преобразование, в основе которого лежит процесс компактизации структурных единиц в системе «молекула ДНК → хроматин (ДНП) → нуклеосома → хромонема → хромосома».

Контрольные вопросы: 1. Гистоны, негистоновые белки. 2. Хроматин, уровни компактизации хроматина.

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 1 модуль».

2.6.1 Цель работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.6.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

Контрольные вопросы:

1. Молекулярная и пространственная организация РНК.
2. Типы РНК.
3. Распространенность РНК.
4. Дать характеристику бактериальных плазмид.
5. Описать IS-элементы и транспозоны бактерий.
6. Что такое транспозоны?
7. Описать различные ретротранспозоны.
8. Какова роль мобильных генетических элементов эукариот?
9. Организация митохондриального генома.
10. Мутации генов митохондрий.
11. ДНК хлоропластов.
12. Структура хлоропластных генов.
13. Гистоны, негистоновые белки.
14. Хроматин, уровни компактизации хроматина.

2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: «Ферменты биосинтеза ДНК прокариот».

2.7.1 Цель работы: изучить ферменты репликации и их функции.

2.7.2 Задачи работы: изучить ферменты репликации и их функции.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
1. Схема "Ферменты репликации прокариот".

2. Таблица "Ферменты репликации".

2.7.4 Описание (ход) работы:

ДНК-полимеразы. Ферменты, которые узнают нуклеотид материнской цепи, связывают комплиментарный нуклеозидтрифосфат и присоединяют его к 3'-концу растущей цепи 5'-концом. В результате образуется 5'-3'-диэфирная связь, высвобождается пирофосфат и растущая цепь удлиняется на один нуклеотид. Таким образом, ДНК-полимераза движется от 3'- к 5'-концу молекулы материнской ДНК, синтезируя новую цепь. ДНК-полимеразе для работы нужен праймер (т.е. 3'-ОН группа для присоединения нового нуклеотида) и матрица, детерминирующая присоединение нужного нуклеотида. ДНК-полимеразы помимо полимеразной активности, имеют экзонуклеазную активность, они способны к гидролизу фосфодиэфирных связей в одной цепи ДНК или на не спаренном конце дуплексной ДНК. За один акт удаляется один нуклеотид, начиная с 3'-конца цепи (3'-5'-экзонуклеаза) или с 5'-конца цепи дуплексной ДНК (5'-3'-экзонуклеаза). Эти различные активности присущи разным сайтам полипептидной цепи ДНК-полимераз. 3'-5'-экзонуклеазная активность обеспечивает контроль за присоединением каждого нуклеотида и удаление ошибочных нуклеотидов с растущего конца цепи. Все ДНК-полимеразы способны осуществлять данный тип реакции. Многие (но не все) ДНК-полимеразы обладают также 5'-3'-экзонуклеазной активностью. При сочетании 5'-3'-экзонуклеазной и полимеразной активностей происходит последовательное отщепление нуклеотидов с 5'-конца одноцепочечного разрыва в дуплексе и удлинение цепи с 3'-конца. В результате место разрыва перемещается по цепи в направлении от 5'- к 3'-концу (так называемая ник-трансляция).

ДНК-лигазы – ферменты, осуществляющие соединение цепей ДНК, т.е. катализирующие образование фосфодиэфирных связей между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних нуклеотидов в местах разрывов ДНК. Для образования новых фосфодиэфирных связей требуется энергия в форме АТФ либо НАД.

ДНК-геликазы (ДНК-хеликазы) – ферменты, осуществляющие расплетание двойной спирали ДНК. Для разделения цепей используется энергия АТФ. Геликазы часто функционируют в составе комплекса, осуществляющего перемещение репликативной вилки и репликацию расплетённых цепей. Для расплетания достаточно одного геликазного белка, но для того. Чтобы максимизировать скорость раскручивания. Несколько геликаз могут действовать совместно.

ДНК-топоизомеразы – ферменты, изменяющие степень сверхспиральности и тип сверхспирали. Путём одноцепочечного разрыва они создают шарнир, вокруг которого переплеченный дуплекс ДНК, находящейся перед вилкой, может свободно вращаться. Это снимает механическое напряжение, возникающее при раскручивании двух цепей в репликативной вилке, что является необходимым условием для её непрерывного движения. Кроме того, топоизомеразы (типа II) обеспечивают разделение или образование катенанов – сцепленных кольцевых ДНК (образуются в результате репликации кольцевой ДНК), а также устранение узлов и спутанных клубков из длинной линейной ДНК. Существует два типа топоизомераз. Топоизомеразы типа I уменьшают число сверхвитков в ДНК на единицу за один акт. Эти топоизомеразы надрезают одну из двух цепей, в результате чего фланкирующие дуплексные области могут повернуться вокруг интактной цепи, и затем воссоединяют концы разрезанной цепи. Эта реакция не требует энергии АТФ, т.к. энергия фосфодиэфирной связи сохраняется благодаря тому, что тирозиновый остаток в молекуле фермента выступает то в роли акцептора, то в роли донора фосфорильного конца разрезанной цепи.

Топоизомеразы типа II вносят временные разрывы в обе комплиментарные цепи, пропускают двухцепочечный сегмент той же самой или другой молекулы ДНК через разрыв, а затем соединяют разорванные концы. В результате за один акт снимаются два

положительных или отрицательных сверхвитка. Топоизомеразы типа II тоже используют тирозиновые остатки для связывания 5'-конца каждой разорванной цепи в то время, когда другой дуплекс проходит через место разрыва.

Праймаза – фермент, обладающий РНК-полимеразной активностью; служит для образования РНК-праймеров, необходимых для инициации синтеза ДНК в точке *ori* и дальнейшем для синтеза отстающей цепи.

Контрольные вопросы: 1. ДНК-полимеразы: функции, типы.
2. ДНК-геликазы, ДНК-лигазы и их функции. 3. ДНК-топоизомеразы: функции, типы.

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «ДНК-полимеразы эукариот. Элонгация и терминация репликации ДНК эукариот. Репликация теломерных участков эукариотических хромосом».

2.8.1 Цель работы: изучить особенности репликации ДНК у эукариот.

2.8.2 Задачи работы: изучить особенности репликации ДНК у эукариот.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.8.4 Описание (ход) работы:

Синтез ДНК у эукариот происходит в S-фазу клеточного цикла. Инициацию репликации регулируют специфические сигнальные белки – факторы роста, которые передают сигнал, побуждающий кл к началу репл.

Репликация начинается на определённом сайте молекулы ДНК, точке начала репликации или *ori*-сайте. В этой точке двойная спираль ДНК расплетается с образ двух репликативных вилок, которые движутся по направлению друг к другу.

В формировании репликативных вилок участвуют ДНК-топоизомеразы и ДНК-хеликазы. ДНК-топоизомераза I разрывает фосфодиэфирную связь одной цепи ДНК и ковалентно присоединяется к 5'-концу точки разрыва. По окончании формирования репликативной вилки фермент ликвидирует разрыв и отделяется от ДНК.

Разрыв водородных связей в двуцепочечной молекуле ДНК осуществляет фермент ДНК-хеликаза. Для этого фермент использует энергию макроэргических связей АТФ. В результате происходит раскручивание суперспиральной структуры ДНК в поддержании такой структуры участвуют SSB-белки. Эти белки не закрывают азотистых оснований и не препятствуют репликации.

Элонгация – продолжение репликации. Репликация ДНК осуществляется ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами. Субстратами для синтеза новой цепи ДНК являются дезоксинуклеозидтрифосфаты. (дГТФ (dGTP), дАТФ (dATP), ГТФ (TTP), дЦТФ (dCTP)). Эти же соединения служат источниками энергии. На образование каждой связи расходуются две макроэргические связи. В процессе также участвуют ионы магния, нейтрализуя отрицательный заряд нуклеотидов.

У эукариот принимают участие 5 ДНК полимераз (α , β , γ , δ , ϵ), которые различаются по числу субъединиц, молекулярной массе, способности взаимодействовать с другими белками и функциональному назначению. Полимеразы β , δ и ϵ не могут начинать образование дочерней ДНК, т.к. не имеют средств к одиночной цепи ДНК. Начинает репликацию полимераз α , которая синтезирует небольшой фрагмент РНК-праймер и далее примерно 60 нуклеотидных остатков ДНК. Образующийся небольшой двухцепочечный фрагмент позволяет присоединиться полимеразе δ и продолжить синтез новой цепи в направлении от 5' к 3'. Выбор очередного нуклеотида определяется матрицей ДНК. При созревании отстающей цепи ДНК праймеры удаляют ДНК-

полимераза β и присоединяет недостающие нуклеотиды. Восстановленные фрагменты соединяют ДНК-лигазы. В отстающей цепи синтез фрагмента okazaki катализирует полимеразы ϵ .

ДНК хромосомы человека содержит примерно 150 млн. пар нуклеотидов. Репликация такой большой молекулы со скоростью 50 нуклеотидов в минуту шла бы примерно 8 часов, поэтому инициация синтеза ДНК происходит в нескольких сайтах хромосомы. (ori-сайтах, origin, ориджин).

Эти сайты имеют определённую нуклеотидную последовательность. Последовательность ДНК, ограниченная двумя ori-сайтами называется репликоном или единицей репликации. На ориджинах при участии ДНК-топоизомеразы 1 образуются две репликативные вилки.

Контрольные вопросы: 1. Особенности репликации эукариотической ДНК. 2. ДНК-полимеразы эукариот.

2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Репликация РНК, специфическая репликаза. Репликация геномов ретровирусов».

2.9.1 Цель работы: изучить особенности репликации РНК на примере ретровирусов.

2.9.2 Задачи работы:

1. изучить репликативный цикл ретровирусов

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Схема «Репликация ретровирусов и синтез вирусных белков».
2. Схема «Этапы репликации ретровирусного генома от РНК до свободной двухцепочечной линейной ДНК»

2.9.4 Описание (ход) работы:

Стратегия репликации ретровирусов основана главным образом на заражении чувствительных клеток при контакте с инфекционными вирусными частицами и направлена на установление долгосрочной персистирующей инфекции, способной распространяться как вертикально (при делении клеток), так и горизонтально (от клетки к клетке).

Ретровирусы (за исключением лентивирусов) не уничтожают инфицированные клетки. После проникновения в клетку РНК ретровирусов служит матрицей для синтеза линейной двухцепочечной комплементарной ДНК (кДНК) при участии фермента обратной транскриптазы (ревертазы). На последующих этапах происходит интеграция полученной ДНК в хромосому клетки-хозяина.

Репликативный цикл ретровирусов удобно разделить на пять фаз:

1. ранние события: адсорбция, проникновение и "раздевание";
2. превращение вирусного РНК-генома в полноразмерную неинтегрированную линейную (свободную) ДНК;
3. интеграция вирусной ДНК с хозяйским геномом;
4. экспрессия генов интегрированной вирусной ДНК;
5. синтез вирусных белков и сборка вирионов.

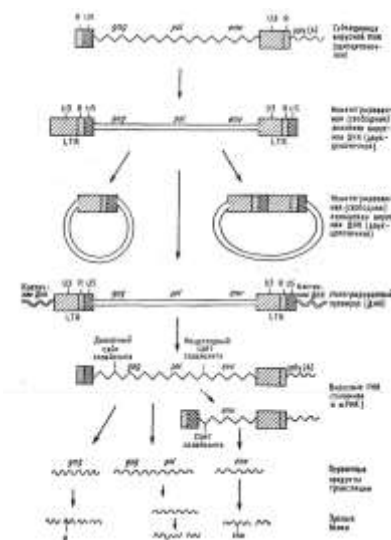


Рис. 1. Репликация ретровирусов и синтез вирусных белков.

По сравнению с другими вирусами, у ретровирусов есть три необычных свойства репликации. Во-первых, вирус должен превратить свой РНК-геном в ДНК. Во-вторых, эта ДНК длиннее, чем вирусная РНК. Это удлинение обусловлено удвоением части последовательности вирусной РНК. Дублированные последовательности образуют длинные концевые повторы (LTR – long terminal repeat) вирусной ДНК. Удвоенные последовательности расположены на концах провирусной ДНК. Размер LTR составляет от 0,3 до 1,4 kb в зависимости от вида вируса. Большинство последовательностей, образующих LTR, представлены в РНК лишь одной копией и расположены как на 5'-, так и на 3'-конце. Третья необычная черта ретровирусной репликации – эффективная интеграция свободной ДНК с геномом клетки в строго определенной ориентации, которая зависит от концевых последовательностей обоих LTR.

Фаза I: ранние события. Проникновению вирионов ретровирусов в клетки предшествует специфическое взаимодействие между поверхностным гликопротеином вируса и рецептором клетки хозяина. Сведения о способе попадания вириона внутрь клетки противоречивы: неясно, происходит ли проникновение непосредственно через плазматическую мембрану или путем эндоцитоза. Часть вирионов деградирует в лизосомах, однако не известно, ведет ли этот путь к инфекции или гибели вируса. Так или иначе, на первых этапах заражения вирион переходит в новое состояние, когда он готов начать синтез вирусной ДНК. В какой степени происходит при этом "раздевание" вирионов, остается неясным.

Фаза II: синтез неинтегрированной вирусной ДНК. Главная задача этого этапа инфекции – превратить одноцепочечный РНК-геном в линейную двухцепочечную вирусную ДНК. Синтез вирусной ДНК, который идет в цитоплазме и требует по крайней мере четырех часов, осуществляется обратной транскриптазой (ревертазой). В ходе этого процесса определенные последовательности, присутствующие в виде уникальных копий в РНК, должны быть дублированы, чтобы образовать LTR на обоих концах ДНК-продукта. Поэтому главными участниками второй фазы заражения являются ревертаза, последовательности на концах вирусной РНК и LTR.

Синтез вирусной ДНК начинается в течении первого часа после заражения с появлением одноцепочечной ДНК, комплементарной вирусной РНК. Это минус-цепь ДНК, поскольку вирусная РНК служит кодирующей плюс-цепью. Минус-цепь ДНК – единая и непрерывная молекула, хотя она и синтезируется в три этапа с трех различных матриц. Синтез минус-цепи ДНК идет справа налево относительно РНК, поскольку комплементарная цепь имеет противоположную полярность. Вместо того чтобы начаться у

3'-конца РНК, синтез ДНК начинается с тРНК-затравки вблизи ее 5'-конца. На первом этапе синтезируется последовательность, комплементарная фрагментам R и U5, расположенным перед сайтом связывания тРНК-затравки. Эта последовательность, комплементарная самой левой части в РНК, окажется затем самой правой в вирусной ДНК. На втором этапе синтез минус-цепи ДНК продолжается на правом конце одной из двух вирионных РНК и идет влево через сайт связывания тРНК-затравки (tb) возле левого конца РНК. На этих двух этапах образуется правый LTR путем соединения последовательностей, расположенных на левом и правом концах РНК, а также оставшаяся минус-цепь вирусной ДНК, за исключением левого LTR. На третьем этапе образуется левый LTR на матрице предварительно синтезированной плюс-цепи правого LTR.

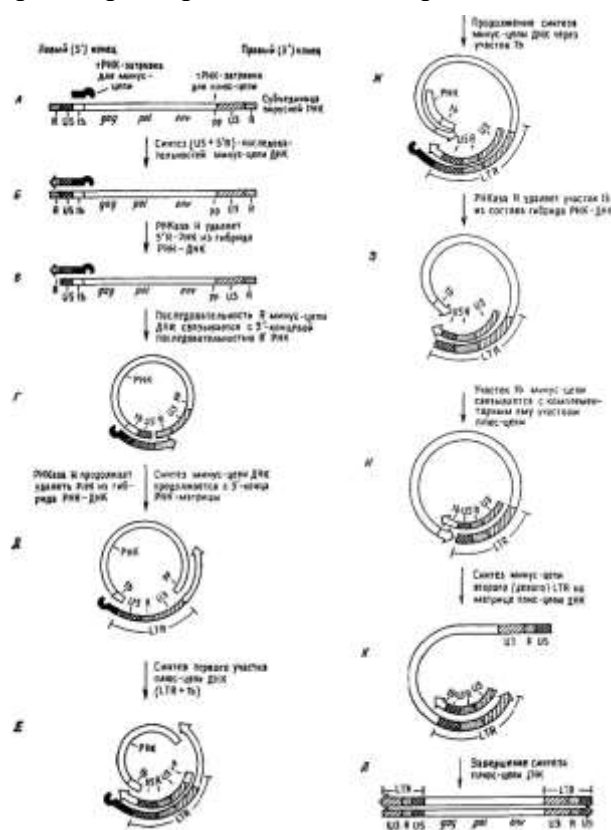


Рис. 2. Этапы репликации ретровирусного генома от РНК до свободной двухцепочечной линейной ДНК.

Фаза III: интеграция вирусной ДНК. По крайней мере одна копия ДНК оказывается интегрированной с ДНК каждой успешно зараженной клетки, а большинство клеток, продуцирующих вирус, содержит 4-10 копий провирусов. Внедрившись в клеточный геном, провирус в дальнейшем реплицируется и передается дочерним клеткам вместе с остальной ДНК. Первые интегрированные провирусы обнаруживаются через восемь часов после заражения, большинство же копий вирусной ДНК интегрирует в течении трех дней после заражения. Зараженная клетка может вновь заражаться тем же вирусом, пока не приобретет резистентность к заражению в результате образования вирусного гликопротеина. По крайней мере некоторые из провирусов не в состоянии обеспечить продукции вируса, поскольку они не транскрибируются или оказываются повреждены мутациями. Первое вирусное потомство появляется еще до того, как клетка становится устойчивой к суперинфекции (обычно через 1-2 дня после заражения). Поэтому многие зараженные клетки могут вновь инфицироваться вирусами, появившимися в результате первого цикла репликации.

Свободные линейные провирусные ДНК представляют собой предшественники интегрированных провирусов. Для успешного осуществления интеграции необходимы

концы LTR, поскольку мутанты, утратившие эти последовательности, не способны к ней. Интеграция требует также неизвестных клеточных факторов.

Анализ последовательностей клонированных провирусов, а также сайта их интеграции с хозяйской ДНК позволил установить как структуру провирусной ДНК, так и те изменения, которые происходят в клеточных последовательностях, прилегающих к месту интеграции, в ходе инфекции. Вирусная ДНК интегрирует с сохранением ДНК: LTR-gag-pol-env-LTR. Однако в клеточном геноме существует много мест, в которые может встроиться провирусной ДНК. Последовательности, в которые он встраивается, обычно не содержат гомологий с вирусной ДНК. Более того, у провирусов нет тенденции включаться в уже существующих в геноме последовательности эндогенных или экзогенных ретровирусов. Эти данные свидетельствуют о том, что провирус может внедриться в любое место хозяйской ДНК.

Фаза IV: экспрессия вирусной ДНК. В хронически инфицированных клетках вирусная РНК считывается с интегрированных провирусов. Свободная ДНК может экспрессироваться, но для сохранения провируса необходима его интеграция. В клетках, содержащих несколько провирусов, обычно бывает трудно разобраться, какой из них транскрибируется. Разные клетки одной популяции могут существенно различаться по уровню экспрессии вируса.

Провирус является транскрипционной единицей с собственными регуляторными последовательностями. Однако экспрессия конкретного провируса зависит как от вирус-специфических, так и от хозяйских факторов, в частности от места интеграции, физиологического состояния клетки и LTR. В отличие от многих других вирусов у ретровирусов продукты экспрессии, а экспрессия провируса зависит только от хозяйских ферментов.

Вирус-специфическая регуляция экспрессии осуществляется с помощью LTR, несущих промоторов, энхансер транскрипции. Транскрипция начинается на левом конце последовательности R левого LTR. Как и большинство эукариотических генов, провирусы транскрибируются с помощью клеточной РНК-полимеразы II.

В состав LTR входят также элементы, усиливающие транскрипцию (энхансеры) и работающие независимо от своего положения и ориентации. Относительная "сила" энхансера варьирует в зависимости от вида животного или стадии дифференцировки клеток.

Первичным продуктом транскрипции провируса является полноразмерная молекула РНК. Вирусная РНК обычно составляет от 0,1 до 1% тотальной клеточной РНК. У полноценных вирусов эта РНК, как и ее процессированные варианты, выполняют две главные функции: формирует вирионную РНК и служит мРНК для синтеза продуктов генов gag, pol и env. Около половины полноразмерной РНК упаковывается в вирионы, остальная служит мРНК. В клетках обычно содержится несколько больше мРНК для gag, чем для env, причем продукта гена gag синтезируется примерно в 20 раз больше, чем продукта гена pol. Каждый из вирусных генов детерминирует синтез полипротеина-предшественника, который затем разрезается на два зрелых полипептида.

мРНК для продуктов гена env – результат сплайсинга полноразмерной РНК, из которой удалена большая часть последовательностей генов gag и pol. Одна из интересных особенностей этой мРНК состоит в том, что ее акцепторный сайт сплайсинга, а также часть env-кодирующих последовательностей расположены перед терминирующим кодоном гена pol.

До сих пор не выявлено различий между вирионной РНК и РНК, которая служит матрицей для синтеза продуктов gag и pol. Тем не менее времена полужизни различаются, что указывает на различие их путей метаболизма внутри клетки. Продукт гена pol синтезируется в виде длинного слитного полипротеина gag-pol. С большинства же молекул полноразмерной мРНК транслируется лишь продукт гена gag.

Гены v-оnc экспрессируются сходно с обычными вирусными генами, поскольку находятся под тем же вирусным и клеточным контролем. Большинство генов v-оnc являются слитными с генами gag и кодируют гибридные продукты gag-оnc, у которых N-концевая часть кодируется геном gag, а С-концевая – онкогеном. Последовательности онкогенов в этих слитных генах могут замещать большую или меньшую часть гена gag и соответственно их экспрессия контролируется аналогично этому гену.

Фаза V: синтез вирусных белков и сборка вирионов. После завершения синтеза и процессинга РНК необходим синтез вирионных белков, которые собираются в частицы, содержащие вирионную РНК. Оболочка вириона образуется на плазматической мембране клетки, поскольку вирус освобождается из клетки почкованием. Сердцевины вирусов С-типа формируются в непосредственной близости от мембраны, тогда как у ретровирусов В- и D-типов капсиды образуются в цитоплазме.

Синтез белков и сборка вирионов идут сходным образом у разных видов ретровирусов, несмотря на то что молекулярные массы белков, выполняющих одни и те же функции, могут различаться. В качестве примера возьмем вирус, вызывающий мышинные лимфомы и лейкозы – MuLV. У вирусов этой группы нарезание полипротеинов-предшественников происходит в основном уже после сборки вирионов, поскольку свежесобранный вирус несет много неразрезанных предшественников. Следовательно последовательность белков в полипротеине имеет значение для их относительного расположения в составе вириона.

Из продуктов гена gag образуются все белки сердцевины вириона, за исключением ревертазы. Их одни достаточно, чтобы сформировать вирион, правда, неинфекционный. В случае MuLV белок-предшественник, кодируемый геном gag, имеет молекулярную массу 65 кДа (Pr65gag). Он нарезается на 4 белка. Неясно какой фермент осуществляет это нарезание – клеточная или вирусная протеаза.

Продукты гена pol синтезируются в виде белка-предшественника – полипротеина Pr180gag-pol. Он участвует в сборке вирионов.

Продукт гена env Pr90env гликолизуется и разрезается на два белка – gp70 и p15E – которые остаются связанными друг с другом дисульфидными мостиками. Вероятно, p15E – это трансмембранный белок, С-концевая часть которого находится внутри, а N-концевая – снаружи оболочки вириона. Заметные на электронных фотографиях шипы представляют собой молекулы p15E, а булавки на их вершине – это gp70. Гликозилированный белок gp70 детерминирует спектр хозяев и свойства вируса. Каким образом в состав вириона попадают две молекулы РНК и как формируется димерная структура вирионной РНК, неизвестно.

Контрольные вопросы: 1. Описать фазы репликативного цикла ретровирусов.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 2 модуль».

2.10.1 Цель работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.10.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: Ноутбук, средства мультимедиа

Контрольные вопросы:

1. ДНК-полимеразы: функции, типы.
2. ДНК-геликазы, ДНК-лигазы и их функции.
3. ДНК-топоизомеразы: функции, типы.

4. Особенности репликации эукариотической ДНК.
5. ДНК-полимеразы эукариот.
6. Описать фазы репликативного цикла ретровирусов.

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Молекулярные механизмы транскрипции. Промоторы про- и эукариот».

2.11.1 Цель работы: Изучить молекулярные механизмы транскрипции. Промоторы про- и эукариот

2.11.2 Задачи работы: 1. Изучить молекулярные механизмы транскрипции. 2. Изучить промоторы про- и эукариот

2.11.4 Описание (ход) работы:

Записанная с помощью генетического кода наследственная информация хранится в молекулах ДНК. Она размножается, переписывается в молекулы РНК для того, чтобы обеспечить клетки необходимыми для их жизни и развития белками. Транскрипцией называется синтез РНК-копий по матрице участка ДНК по принципу комплементарности. Транскрипцию проводит фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза.

Синтез мРНК начинается с обнаружения РНК-полимеразой особого участка в молекуле ДНК – промотора. После присоединения к нему РНК-полимеразы прилежащий виток спирали ДНК раскручивается, две цепи ДНК расходятся в результате разрыва водородных связей между комплементарными основаниями цепей на расстоянии примерно 18 нуклеотидных пар ДНК. Так образуется транскрипционная вилка, в которой матрица доступна для фермента. По одноцепочечной матрице РНК-полимераза синтезирует цепь РНК из свободных рибонуклеотидов, причем против аденина в ДНК встает комплементарный ему урацил. По мере продвижения РНК-полимеразы пройденные ею участки ДНК вновь объединяются в двойную спираль. Матрицей для транскрипции служит одна из цепей ДНК, ее называют кодогенной. Транскрипция продолжается до тех пор, пока РНК-полимераза не встретит специальную нуклеотидную последовательность – терминатор (стоп-кодон). В этом участке фермент отделяется и от матрицы, и от новообразованной молекулы мРНК. Синтезированная молекула РНК содержит точную копию информации, записанную в соответствующем участке ДНК (рис. 8).

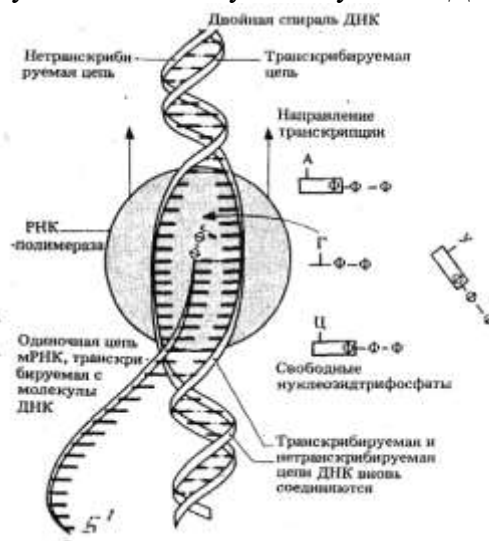


Рис. 8. Схема механизма транскрипции. В присутствии РНК-полимеразы двойная спираль ДНК раскручивается в результате разрыва водородных связей между комплементарными основаниями, при использовании свободных

рибонуклеозидтрифосфатов строится полинуклеотидная цепь мРНК. Она комплементарна транскрибируемой цепи ДНК, которая служит матрицей.

Участок молекулы ДНК, включающий промотор, транскрибируемую последовательность и терминатор, образуют единицу транскрипции - транскриптон.

У прокариот к образующейся цепи мРНК сразу же присоединяются рибосомы, начиная белковый синтез (рис. 9).

В эукариотических клетках мРНК сначала "дозревает" в ядре, а затем соединяется со специальными белками, которые обеспечивают ее прохождение через поры ядерной оболочки в цитоплазму.

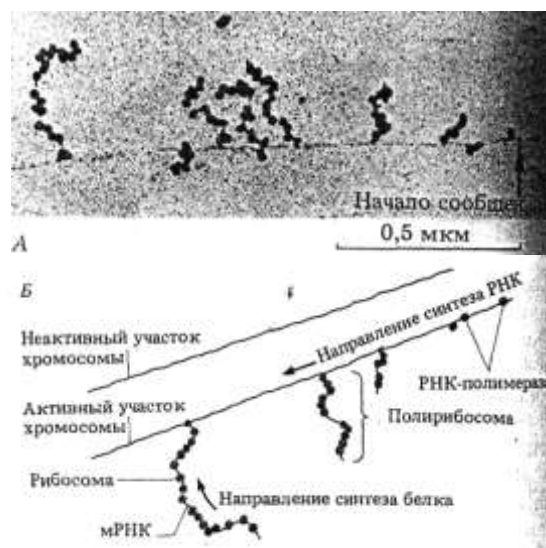


Рис. 9. Процесс транскрипции и образование полисомы у бактерий. А – Электронная микрофотография участка хромосомы, на которой можно видеть последовательные стадии образования мРНК и присоединения рибосом. Б – Схематическое изображение структуры вроде показанной на фотографии.

В клетках прокариот присутствует только одна РНК-полимераза, которая синтезирует все виды РНК. Она представляет собой крупный (м.м. 500 кДа) и сложный фермент, состоящий из нескольких субъединиц: двух α -цепей, одной β -, одной β' -, одной σ -цепи. Структура холофермента этой полимеразы обозначается как $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Первый этап транскрипции – инициация – это присоединение холофермента к промотору. После того, как РНК-полимераза займет правильное положение и образует несколько фосфодиэфирных связей, субъединица σ отделяется от холофермента, а оставшийся "кор-фермент" продолжает удлинять молекулу РНК (элонгация). По достижении терминатора РНК-полимеразой транскрипция прекращается (терминация). Освобождение полимеразы от матрицы и от РНК происходит с участием ρ -белка (фактора терминации).

В клетке присутствует несколько σ -частиц, обладающих неодинаковым сродством к промоторам разных генов. В смене σ -субчастиц РНК-полимеразы заключается один из механизмов регуляции синтеза разных белков.

Типичный промотор прокариот имеет три основных компонента: точку старта транскрипции, выше нее, примерно на 10 нуклеотидов располагается домен Прибнова ТАТААТ, и в положении -35 вторая консервативная последовательность ТГАЦ (рис. 10 а,б).

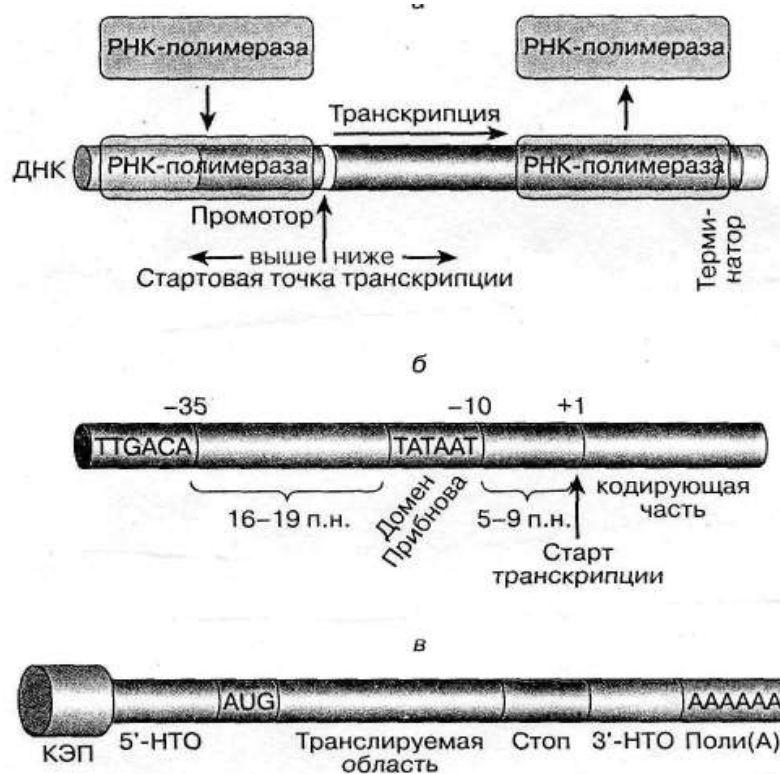


Рис. 10. Элементы организации транскрипции у прокариот (а, б) и эукариот (в): а – единица транскрипции, содержащая различные элементы гена; б – схема наиболее типичного промотора прокариот, имеющего три основных компонента: консервативные последовательности нуклеотидов в положениях -10 и -35, то есть на 10 и 35 нуклеотидов выше точки старта транскрипции, и точку старта транскрипции; в – схема расположения некоторых функциональных участков в молекуле мРНК эукариот. КЭП – структура, присоединенная с 5' - конца мРНК после транскрипции гена; 5'- и 3'-НТО – нетранслируемые области соответственно на 5'- и 3'-концах мРНК; поли(А) – полиаденилированный 3'-конец мРНК.

В ядре эукариотических клеток содержится три РНК-полимеразы. РНК-полимераза I находится в ядрышке и отвечает за биосинтез главным образом рибосомной РНК, РНК-полимераза II осуществляет синтез разнообразных мРНК, а РНК-полимераза III синтезирует тРНК и 5S-рРНК.

Промотор РНК полимеразы II эукариот имеет большую протяженность и более сложное строение. ТАТА-бокс (первый промоторный элемент) отделен от стартовой точки транскрипции приблизительно на 25 пар нуклеотидов, а вторая промоторная последовательность – СААТ-бокс – примерно на 40 (иногда до 120) пар от него. В промоторе содержатся и другие регуляторные участки, с которыми взаимодействуют разнообразные регуляторные факторы.

РНК-полимераза II у эукариот не может самостоятельно инициировать транскрипцию. Для ее активирования необходимо большое число белков, называемых общими факторами транскрипции. Прежде чем начнется транскрипция, они должны объединиться в комплекс. Сборка начинается на ТАТА - домене промотора. В присутствии источника энергии – АТФ один из белков фосфорилирует РНК-полимеразу II, в результате чего ее молекула изменяет конформацию и становится готовой к транскрипции. В регуляции активности РНК-полимеразы II принимают участие как факторы транскрипции, так и многочисленные регуляторные белки (рис. 11).

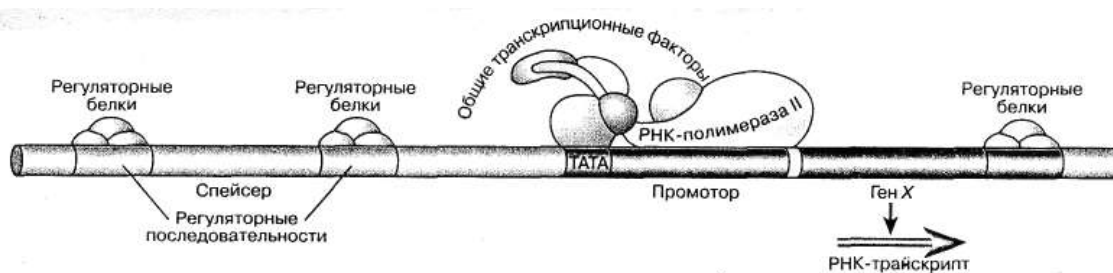


Рис. 11. Схема организации контролирующего района типичного гена эукариот, состоящего из регуляторных последовательностей и промотора.

мРНК эукариот также имеют более сложное строение, чем у прокариот. Помимо транслируемых (то есть кодирующих белки) областей в мРНК имеются достаточно протяженные нетранслируемые области (НТО), которые находятся на обоих концах молекулы мРНК (рис 10, в). Они определяют время жизни и активность мРНК, их внутриклеточное распределение, условия, при которых будет синтезирован белок. В мРНК (чаще в 5'-НТО) имеются и регуляторные элементы, с которыми связываются специальные регуляторные белки или РНК.

Свою сложную специфическую структуру мРНК приобретают уже после транскрипции в результате процессинга.

Процессинг мРНК в эукариотических клетках

Эукариотические гены имеют большую протяженность и сложное строение. Они включают в себя кроме кодирующих последовательностей – экзонов, многочисленные вставочные участки – интроны. Поэтому продукты транскрипции – предшественники мРНК имеют высокую молекулярную массу и подвергаются процессингу (ковалентной модификации), прежде чем из них образуются зрелые мРНК. Процессинг включает в себя модификацию 5'- и 3'-концов и сплайсинг (рис.12).

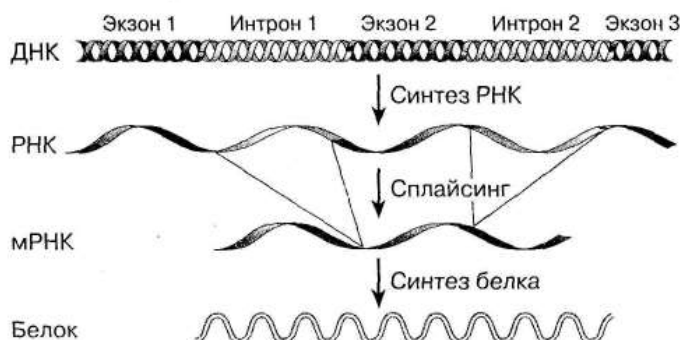


Рис. 12. Процесс передачи информации от ДНК до белка, кодируемого расщепленным геном

Кэпирование 5'-конца происходит, когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 н. К 5'-концу присоединяется ГДФ через свою фосфатную группу, а затем гуанин метилируется с образованием 7-метилгуанозина и образуется кэп.

Кэп обеспечивает: 1. инициацию трансляции, так как только в его присутствии рибосома распознает иницирующие кодоны мРНК – АУГ, ГУГ; 2. защиту мРНК от нуклеаз клетки, удлиняя тем самым время ее жизни; 3. работу ферментативной системы, проводящей сплайсинг.

У большинства транскриптов 3'-конец тоже подвергается модификации, при которой специальным ферментом наращивается поли-(А)-«хвост», состоящий из 100 - 200 остатков адениловой кислоты. Поли-(А)- последовательность облегчает выход мРНК из ядра и замедляет ее гидролиз в цитоплазме.

Важнейшее событие процессинга – сплайсинг – это соединение конец в конец экзонов и удаление интронов с образованием зрелых мРНК. Он протекает при участии малых ядерных РНП (мяРНП). Малые ядерные РНК (мяРНК) связываются с белковым остовом, состоящим из нескольких протомеров, образуют мяРНП. Последние взаимодействуют с РНК и друг с другом, фиксируют и ориентируют реакционные группы первичного транскрипта, образуя сплайсосому. Ее каталитическая активность обусловлена РНК-составляющими (такие РНК называются рибозимами). На концах интронов имеются специфические последовательности нуклеотидов – сайты сплайсинга, которые обеспечивают точное удаление интронов из молекулы пре-мРНК (на 5' – АГГУ, на 3' – ГАГГ). На первой стадии одни мяРНП связываются с сайтами сплайсинга, затем к ним присоединяются другие мяРНП – формируется сплайсосома. При этом концы экзонов сближаются и соединяются, а интроны удаляются (рис. 13). Так образуются «зрелые» мРНК, которые служат после выхода в цитоплазму матрицами для синтеза белков в процессе трансляции.

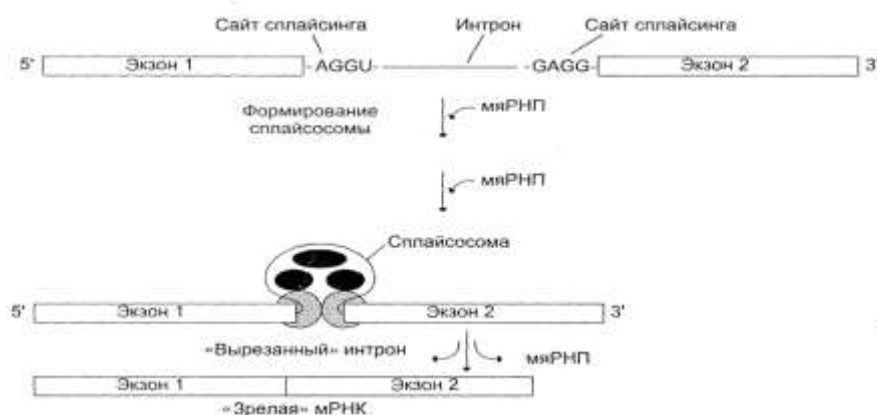


Рис.13. Сплайсинг РНК. В процессе сплайсинга принимают участие различные мяРНП, которые формируют сплайсосому. мяРНП, взаимодействуя с РНК и друг с другом, фиксируют и ориентируют реакционные группы первичного транскрипта. Каталитическая функция сплайсосом обусловлена РНК-составляющими; такие РНК называют рибозимами.

Для некоторых генов описаны альтернативные пути сплайсинга одного и того же транскрипта, которые приводят к образованию разных мРНК и соответственно разных белков.

Контрольные вопросы: 1. Промоторы прокариот. 2. Особенности строения промоторов эукариот. 3. Процессинг мРНК в эукариотических клетках

2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: «Белковые факторы транскрипции».

2.12.1 Цель работы: ознакомиться с белковыми факторами транскрипции

2.12.2 Задачи работы: изучить регуляцию транскрипции прокариот и эукариот с помощью белковых факторов

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.12.4 Описание (ход) работы:

В отличие от регуляторных элементов генома, факторы транскрипции по химической природе являются белками. Связываясь с определенными участками ДНК, они могут активировать, ингибировать, ускорять или замедлять процесс транскрипции.

В зависимости от производимого эффекта факторы транскрипции прокариот и эукариот можно разделить на две группы: активаторы (инициируют или увеличивают интенсивность синтеза РНК) и репрессоры (подавляют или угнетают процесс). В настоящий момент у различных организмов в совокупности обнаружено более 2000 ТФ.

Регуляция транскрипции у прокариотов

У прокариотов контроль синтеза РНК происходит преимущественно на стадии инициации за счет взаимодействия ТФ со специфической областью транскриптона – оператором, который располагается рядом с промотором (иногда пересекаясь с ним) и, по сути, является посадочной площадкой для регуляторного белка (активатора или репрессора). Для бактерий характерен еще один способ дифференциального контроля генов – синтез альтернативных σ -субъединиц, предназначенных для разных групп промоторов.

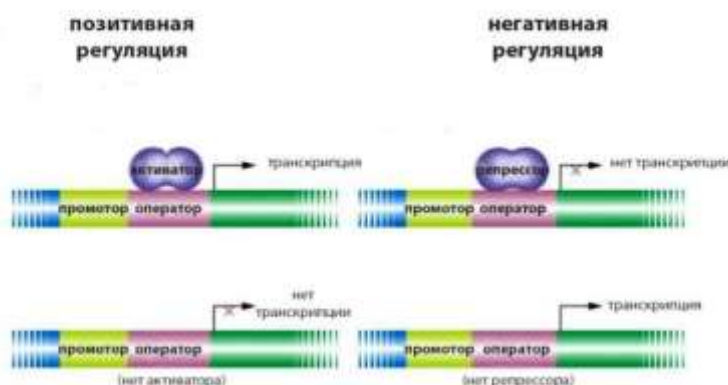
Частично экспрессия оперона может регулироваться на стадиях элонгации и терминирования, но уже не за счет связывающихся с ДНК ТФ, а благодаря белкам, взаимодействующим с РНК-полимеразой. К ним относят Gre-белки и антитерминаторные факторы Nus и RfaH.

На элонгацию и терминацию транскрипции у прокариотов определенным образом влияет происходящий параллельно синтез белка. У эукариотов как сами эти процессы, так и факторы транскрипции и трансляции пространственно разделены, а значит, функционально не связаны.

Активаторы и репрессоры

У прокариотов есть два механизма регуляции транскрипции на стадии инициации:

- позитивная – осуществляется белками-активаторами;
- негативная – контролируется репрессорами.



При позитивной регуляции присоединение фактора к оператору активирует ген, а при негативной, наоборот, выключает. Способность регуляторного белка связываться с ДНК зависит от присоединения лиганда. В роли последнего обычно выступают низкомолекулярные клеточные метаболиты, которые в таком случае выполняют роль коактиваторов и корепрессоров.

Механизм действия репрессора основан на перекрывании областей промотора и оператора. В оперонах с такой структурой присоединение белкового фактора к ДНК закрывает часть посадочной площадки для РНК-полимеразы, не давая последней инициировать транскрипцию.

Активаторы работают на слабых промоторах с низкой функциональностью, которые плохо распознаются РНК-полимеразами или с трудом поддаются плавлению

(разделению цепей спирали ДНК, необходимому для начала транскрипции). Присоединясь к оператору, белковый фактор взаимодействует с полимеразой, значительно повышая вероятность инициации. Активаторы способны увеличивать интенсивность транскрипции в 1000 раз.

Некоторые ТФ прокариот могут действовать и как активаторы, и как репрессоры в зависимости от расположения оператора по отношению к промотору: если эти области перекрываются, фактор ингибирует транскрипцию, а в противном случае – запускает.

Схема действия транскрипционных факторов прокариот

Функция лиганда по отношению к фактору	Состояние лиганда	Негативная регуляция	Позитивная регуляция
Обеспечивает отделение от ДНК	Присоединение	Удаление белка-репрессора, активация гена	Удаление белка-активатора, выключение гена
Присоединяет фактор к ДНК	Удаление	Удаление репрессора, включение транскрипции	Удаление активатора, выключение транскрипции

Негативную регуляцию можно рассмотреть на примере триптофанового оперона бактерии *E. coli*, для которого характерно расположение оператора внутри последовательности промотора. Белок-репрессор активируется присоединением двух молекул триптофана, которые изменяют угол наклона ДНК-связывающего домена таким образом, чтобы он мог войти в большую бороздку двойной спирали. При низкой концентрации триптофана репрессор теряет лиганд и вновь становится неактивным. Иными словами, частота инициации транскрипции обратно-пропорциональна количеству метаболита.

Некоторые опероны бактерий (например, лактозный) сочетают позитивный и негативный механизмы регуляции. Такая система необходима тогда, когда одного сигнала для рационального контроля экспрессии недостаточно. Так, лактозный оперон кодирует ферменты, транспортирующие внутрь клетки, а затем расщепляющие лактозу – альтернативный источник энергии, менее выгодный, чем глюкоза. Поэтому только при низкой концентрации последней белок CAP связывается с ДНК и запускает транскрипцию. Однако это целесообразно только при наличии лактозы, отсутствие которой приводит к активации Lac-репрессора, блокирующего доступ полимеразы к промотору даже при наличии функциональной формы белка-активатора.

Благодаря оперонной структуре у бактерий несколько генов контролируется одной регуляторной областью и 1-2 ТФ, тогда как у эукариотов на один-единственный ген приходится большое количество регуляторных элементов, каждый из которых зависит от множества других факторов. Такая сложность соответствует высокому уровню организации эукариот, и особенно – многоклеточных организмов.

Регуляция синтеза мРНК у эукариотов

Контроль экспрессии эукариотических генов определяется совокупным действием двух элементов: белковых факторов транскрипции (ТФ) и регуляторных последовательностей ДНК, которые могут находиться рядом с промотором, намного выше него, в интронах либо после гена (имеется в виду кодирующая область, а не ген в полном значении).

Некоторые участки выполняют функцию переключателей, а другие не взаимодействуют напрямую с ТФ, но придают молекуле ДНК гибкость, необходимую для формирования петлеобразной структуры, сопровождающей процесс транскрипционной активации. Такие участки называются спейсерами. Все регуляторные последовательности вместе с промотором составляют контролируемую область гена (gene control region).

Стоит отметить, что действие самих транскрипционных факторов является лишь частью сложной многоуровневой регуляции генетической экспрессии, в которой огромное количество элементов складываются в результирующий вектор, определяющий, будет ли в итоге с конкретного участка генома синтезироваться РНК.

Дополнительным фактором контроля транскрипции в ядерной клетке служит изменение структуры хроматина. Здесь присутствует как тотальная регуляция (обеспечивается распределением участков гетерохроматина и эухроматина), так и локальная, связанная с конкретным геном. Для работы полимеразы должны быть устранены все уровни компактизации ДНК, включая нуклеосомный.

Разнообразие факторов транскрипции у эукариотов связано с большим количеством регуляторов, к которым относят усилители, глушители (энхансеры и сайленсоры), а также адаптерные элементы и инсуляторы. Эти участки могут находиться как вблизи, так и на значительном расстоянии от гена (до 50 тыс н. п.).

Энхансеры – это короткие последовательные ДНК, способные при взаимодействии с регуляторным белком запускать транскрипцию. Приближение усилителя к промоторной области гена осуществляется за счет образования петлеобразной структуры ДНК. Связывание активатора с энхансером либо стимулирует сборку комплекса инициации, либо помогает полимеразе перейти к элонгации.

Энхансер имеет сложное строение и состоит из нескольких сайтов-модулей, каждому из которых соответствует свой регуляторный белок.

Сайленсоры – это участки ДНК, которые подавляют или полностью исключают возможность транскрипции. Механизм работы такого переключателя пока неизвестен. Одним из предположительных способов является оккупирование больших областей ДНК особыми белками группы SIR, которые закрывают доступ факторам инициации. В таком случае выключаются все гены, расположенные в пределах нескольких тысяч нуклеотидных пар от сайленсора.

Адаптерные элементы в комплексе со связывающимися с ними ТФ составляют отдельный класс генетических переключателей, избирательно реагирующих на стероидные гормоны, циклическую АМФ и глюкокортикоиды. Этот регуляторный блок отвечает за реакцию клетки на тепловой шок, воздействие металлов и некоторых химических соединений.

В числе контролирующих участков ДНК выделяют еще один тип элементов – инсуляторы. Это специфические последовательности, которые препятствуют влиянию факторов транскрипции на отдаленные гены. Механизм действия инсуляторов до сих пор не выяснен.

Транскрипционные факторы эукариот

Если у бактерий транскрипционные факторы имеют только регуляторную функцию, то в ядерных клетках есть целая группа ТФ, обеспечивающих фоновую инициацию, но при этом напрямую зависящих от связывающихся с ДНК белков-регуляторов. Количество и разнообразие последних у эукариотов огромно. Так, в организме человека доля последовательностей, кодирующих белковые факторы транскрипции, составляет около 10 % генома.

На настоящий момент ТФ эукариот изучены недостаточно, как и механизмы работы генетических переключателей, устройство которых намного сложнее моделей позитивной и негативной регуляции у бактерий. В отличие от последних, на активность факторов транскрипции ядерной клетки влияет не один-два, а десятки и даже сотни сигналов, которые могут взаимно усиливать, ослаблять или исключать друг друга.

С одной стороны, для активации конкретного гена требуется целая группа транскрипционных факторов, но с другой — одного регуляторного белка может быть достаточно, чтобы запустить экспрессию нескольких генов по механизму каскада. Вся эта система представляет собой сложнейшую вычислительную машину, обрабатывающую

сигналы от разных источников (как внешних, так и внутренних) и складывающую их эффекты в конечный результат со знаком «плюс» или «минус».

Регуляторные факторы транскрипции у эукариотов (активаторы и репрессоры) взаимодействуют не с оператором, как у бактерий, а с рассеянными по ДНК контролирующими участками и влияют на инициацию через посредников, в качестве которых могут выступать белки медиатора, факторы комплекса инициации и ферменты, изменяющие структуру хроматина.

За исключением некоторых ТФ, входящих в преинициаторный комплекс, все транскрипционные факторы имеют в своем составе ДНК-связывающий домен, который отличает их от других многочисленных белков, обеспечивающих нормальное прохождение транскрипции или выступающих в роли посредников при ее регуляции.

Последние исследования доказали, что ТФ эукариотов могут влиять не только на инициацию, но и на элонгацию транскрипции.

Разнообразие и классификация

У эукариотов выделяют 2 группы белковых факторов транскрипции: базальные (иначе называются общими или главными) и регуляторные. Первые отвечают за распознавание промоторов и создание преинициаторного комплекса. Необходимы для начала транскрипции. Эта группа насчитывает несколько десятков белков, которые всегда присутствуют в клетке и не влияют на дифференциальную экспрессию генов.

Комплекс из базальных факторов транскрипции представляет собой инструмент, по функции аналогичный сигма-субъединице у бактерий, только более сложный и подходящий для всех видов промоторов.

Факторы другого типа влияют на транскрипцию за счет взаимодействия с регуляторными последовательностями ДНК. Так как эти ферменты ген-специфичны, их насчитывается огромное количество. Связываясь с участками конкретных генов, они контролируют секрецию определенных белков.

Классификация факторов транскрипции у эукариотов основана на трех принципах:

- механизм действия;
- условия функционирования;
- структура ДНК-связывающего домена.

По первому признаку различают 2 класса факторов: базальные (взаимодействуют с промотором) и связывающиеся с upstream-участками (расположенными выше гена регуляторными областями). Этот вид классификации по сути соответствует функциональному делению ТФ на общие и специфические. Upstream-факторы делятся на 2 группы в зависимости от необходимости в дополнительной активации.

По особенностям функционирования различают конститутивные ТФ (всегда присутствуют в любой клетке) и индуцируемые (свойственны не всем типам клеток и могут требовать определенных механизмов активации). Факторы второй группы, в свою очередь, подразделяются на клетко-специфичные (участвуют в онтогенезе, характеризуются строгим контролем экспрессии, но не требуют активации) и сигнал-зависимые. Последние дифференцируются по типу и способу действия активирующего сигнала.

Структурная классификация белковых факторов транскрипции весьма обширна и включает 6 надклассов, в которые входят множество классов и семейств.

Принцип действия

Функционирование базальных факторов представляет собой каскадную сборку различных субъединиц с образованием комплекса инициации и активацией транскрипции. По сути, этот процесс является заключительным этапом воздействия белка-активатора.

Специфические факторы могут регулировать транскрипцию на двух этапах:

- сборка комплекса инициации;
- переход к продуктивной элонгации.

В первом случае работа специфических ТФ сводится к первичной перестройке хроматина, а также привлечению, ориентации и модификации медиатора, полимеразы и базальных факторов на промоторе, что приводит к активации транскрипции. Главным элементом передачи сигнала является медиатор — комплекс из 24 субъединиц, выступающий в качестве посредника между регуляторным белком и РНК-полимеразой. Последовательность взаимодействий индивидуальна для каждого гена и соответствующего ему фактора.

Регуляция элонгации осуществляется за счет взаимодействия фактора с белком Р-Tef-b, который помогает РНК-полимеразе преодолеть ассоциированную с промотором паузу.

Функциональные структуры ТФ

Факторы транскрипции имеют модульную структуру и выполняют свою работу за счет трех функциональных доменов:

1. ДНК-связывающего (DBD) — нужен для распознавания и взаимодействия с регуляторным участком гена.
2. Транс-активирующего (TAD) — позволяет взаимодействовать с другими регуляторными белками, включая транскрипционные факторы.
3. Сигнал-распознающего (SSD) — необходим для восприятия и передачи регуляторных сигналов.

В свою очередь ДНК-связывающий домен имеет множество типов. К основным мотивам в его структуре относятся:

- «цинковые пальцы»;
- гомеодомен;
- «β»-слои;
- петли;
- «лейциновая молния»;
- спираль-петля-спираль;
- спираль-поворот-спираль.

Благодаря этому домену транскрипционный фактор «прочитывает» нуклеотидную последовательность ДНК по форме рисунка на поверхности двойной спирали. Благодаря этому возможно специфическое узнавание определенных регуляторных элементов.

Взаимодействие мотивов со спиралью ДНК основывается на точном соответствии между поверхностями этих молекул.

Регуляция и синтез ТФ

Существует несколько путей регуляции влияния транскрипционных факторов на транскрипцию. К ним относятся:

- активация — изменение функциональности фактора по отношению к ДНК за счет фосфорилирования, присоединения лиганда или взаимодействия с другими регуляторными белками (в том числе ТФ);
- транслокация — транспортировка фактора из цитоплазмы в ядро;
- доступность сайта связывания — зависит от степени конденсации хроматина (в состоянии гетерохроматина ДНК недоступна для ТФ);
- комплекс механизмов, характерных и для других белков (регуляция всех процессов от транскрипции до посттрансляционной модификации и внутриклеточной локализации).

Последний способ определяет количественный и качественный состав транскрипционных факторов в каждой клетке. Некоторые ТФ способны регулировать свой синтез по типу классической обратной связи, когда ингибитором реакции становится ее собственный продукт. В таком случае определенная концентрация фактора останавливает транскрипцию кодирующего его гена.

Общие факторы транскрипции

Эти факторы необходимы для начала транскрипции любых генов и в номенклатуре обозначаются как TFI, TFII и TFIII в зависимости от вида РНК-полимеразы, с которой они взаимодействуют. Каждый фактор состоит из нескольких субъединиц.

Базальные ТФ выполняют три основные функции:

- правильное расположение РНК-полимеразы на промоторе;
- расплетание цепей ДНК в области начала транскрипции;
- освобождение полимеразы от промотора в момент перехода к элонгации;

Определенные субъединицы базальных факторов транскрипции связываются с регуляторными элементами промотора. Самым важным является ТАТА-бокс (характерен не для всех генов), расположенный на расстоянии «-35» нуклеотидов от точки инициации. Другие сайты связывания включают последовательности INR, BRE и DPE. Некоторые ТФ напрямую с ДНК не контактируют.

В группу главных факторов транскрипции РНК полимеразы II входят TFIID, TFIIIB, TFIIF, TFIIIE и TFIIH. Латинская буква в конце обозначения указывает на очередность обнаружения этих белков. Так, первым был выделен фактор TFIIA, относящийся к РНК-полимеразе III.

Базальные факторы транскрипции РНК-полимеразы II

Название	Число белковых субъединиц	Функция
TFIID	16 (TBP +15 TAFs)	TBP связывается с ТАТА-боксом, а TAFs узнают другие последовательности промотора
TFIIIB	1	Распознает BRE-элемент, точно ориентирует полимеразу в сайте инициации
TFIIF	3	Стабилизирует взаимодействие полимеразы с TBP и TFIIIB, облегчает присоединение TFIIIE и TFIIH
TFIIIE	2	Присоединяет и регулирует TFIIH
TFIIH	10	Разъединяет цепи ДНК в точке инициации, освобождает синтезирующий РНК фермент от промотора и главных факторов транскрипции (биохимия процесса основывается на фосфолировании Ser5-С-концевого домена РНК-полимеразы)

Сборка базальных ТФ происходит только при содействии активатора, медиатора и хроматин-модифицирующих белков.

Специфические ТФ

Через контроль генетической экспрессии эти факторы транскрипции регулируют биосинтетические процессы как отдельных клеток, так и целого организма начиная от эмбриогенеза заканчивая тонкой фенотипической адаптацией к изменяющимся условиям среды. Сфера влияния ТФ включает 3 основных блока:

- развитие (эмбрио- и онтогенез);
- клеточный цикл;
- ответ на внешние сигналы.

Особая группа факторов транскрипции регулирует морфологическую дифференцировку зародыша. Этот белковый набор кодируется особой консенсусной последовательностью длиной 180 пар нуклеотидов, названной гомеобоксом.

Для того чтобы определить, какой именно ген должен быть транскрибирован, регуляторный белок должен «отыскать» и связаться со специфическим участком ДНК, выполняющим роль генетического переключателя (энхансер, сайленсор и т. д.). Каждой такой последовательности соответствуют один или несколько родственных транскрипционных факторов, которые узнают нужный сайт за счет совпадения

химических конформаций конкретного внешнего отрезка спирали и ДНК-связывающего домена (принцип ключ-замок). Для распознавания используется участок первичной структуры ДНК, называемый большой бороздкой.

После связывания с ДНК действия белка-активатора запускают ряд последовательных этапов, приводящих к сборке преинициаторного комплекса. Обобщенная схема этого процесса выглядит следующим образом:

1. Связывание активатора с хроматином в области промотора, привлечение АТФ-зависимых перестраивающих комплексов.
2. Перестройка хроматина, активация гистон-модифицирующих белков.
3. Ковалентная модификация гистонов, привлечение других белков-активаторов.
4. Связывание дополнительных активирующих белков с регуляторной областью гена.
5. Привлечение медиатора и общих ТФ.
6. Сборка преинициаторного комплекса на промоторе.
7. Воздействие других белков-активаторов, перестройка субъединиц преинициаторного комплекса.
8. Начало транскрипции.

Порядок этих событий от гена к гену может изменяться.

Такому большому количеству механизмов активации соответствует столь же широкий набор способов репрессии. То есть ингибируя один из этапов на пути к инициации, регуляторный белок может снизить ее эффективность или полностью блокировать. Чаще всего репрессор задействует сразу несколько механизмов, гарантируя отсутствие транскрипции.

Координированный контроль генов

Несмотря на то что каждый транскриптон имеет свою систему регуляции, у эукариотов есть механизм, позволяющий подобно бактериям запускать или останавливать группы генов, направленных на выполнение конкретной задачи. Это достигается с помощью определяющего фактора транскрипции, который завершает комбинации других регуляторных элементов, необходимых для максимальной активации или подавления гена.

У транскриптонов, подверженных такой регуляции, взаимодействие разных компонентов ведет к одному и тому же белку, выполняющему роль результирующего вектора. Поэтому активация такого фактора оказывает влияние сразу на несколько генов. Система работает по принципу каскада.

Схему координированного контроля можно рассмотреть на примере онтогенетической дифференциации клеток скелетных мышц, предшественниками которых являются миобласты.

Транскрипция генов, кодирующих синтез характерных для зрелой мышечной клетки белков, запускается с помощью любого из четырех миогенных факторов: MyoD, Myf5, MyoG и Mrf4. Эти белки активируют синтез самих себя и друг друга, а также включают гены дополнительного фактора транскрипции Mef2 и структурных мышечных белков. Mef2 участвует в регуляции дальнейшей дифференциации миобластов, одновременно поддерживая концентрацию миогенных белков по механизму положительной обратной связи.

Контрольные вопросы: 1. Регуляция транскрипции у прокариот. 2. Классификация факторов транскрипции эукариот. Общие, специфические факторы транскрипции.

2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Тема: «Генетический код и его свойства».

2.13.1 Цель работы: изучить особенности генетического кода

2.13.2 Задачи работы: изучить особенности генетического кода

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.13.4 Описание (ход) работы:

Генетический код - это способ записи генетической информации о структуре белков (полипептидов) посредством последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах (ДНК или РНК).

Последовательность нуклеотидов ДНК однозначно определяет порядок расположения аминокислот в полипептидной цепи. В то же время химическая природа мономеров (нуклеотиды и аминокислоты) совершенно различна, так что они не могут непосредственно взаимодействовать друг с другом. К тому же в нуклеиновых кислотах содержится всего 4 нуклеотида, а в белке - 20 аминокислот. Поэтому белок можно рассматривать как линейный текст, записанный при помощи алфавита из 20 букв, роль которых играют аминокислоты, который определяется (кодируется) другим текстом, записанным при помощи алфавита из 4-х букв – нуклеотидов молекулы ДНК. Следовательно, для каждой аминокислоты имеется свой кодон.

Простые математические расчеты показывают, что каждая аминокислота кодируется более, чем одним нуклеотидом. Однако сочетаний по 2 нуклеотида $4^2 = 16$ недостаточно для кодирования 20-ти аминокислот. При сочетании нуклеотидов по 3 получается $4^3 = 64$ кодона, что и реализуется в клетке. "Словарь", при помощи которого в мРНК записана информация о кодируемом ею белке, расшифрован полностью (таблица 2).

Генетический код имеет следующие особенности.

1. Код триплетный, то есть одну аминокислоту определяет тройка нуклеотидов.
2. Код однозначный (специфичный): каждый кодон обозначает только одну, "свою" аминокислоту.
3. Код не имеет "запятых", то есть отсутствуют сигналы, показывающие конец одного кодона и начало следующего. Поэтому в начале прочтения мРНК должна быть правильно установлена "рамка считывания". Если в результате воздействия мутагенов произойдет выпадение или встраивание одного нуклеотида, то рамка считывания "сбивается" на один нуклеотид, и все последующие кодоны выйдут из правильной рамки, что приведет к образованию белка с искаженной аминокислотной последовательностью (мутации со сдвигом рамки считывания).

Таблица 2

Генетический код мРНК (подчеркнуты кодоны-терминаторы)

		ВТОРАЯ БУКВА					
П		У	Ц	А	Г		Т
Е	У	УУУ	УЦУ	УАУ	УГУ	У	Р
Р		УУЦ	УЦЦ	УАЦ	УГЦ	Ц	Е
В		УУА	УЦА	<u>УАА</u>	<u>УГА</u>	А	Т
А		УУГ	УЦГ	<u>УАГ</u>	УГГ	Г	Ь
Я	Ц	ЦЦУ	ЦЦУ	ЦАУ	ЦГУ	У	Я

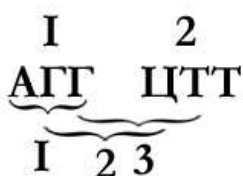
Б У К В А		ЦУЦ ЦУА ЦУГ	ЦЦЦ ЦЦА ЦЦГ	ЦАЦ ЦАА ЦАГ	ЦГЦ ЦГА ЦГГ	Ц А Г	Б У К В А
	А	АУУ АУЦ АУА АУГ	АЦУ АЦЦ АЦА АЦГ	ААУ ААЦ ААА ААГ	АГУ АГЦ АГА АГГ	У Ц А Г	
		Иле	Тре	Асн	Сер		
		Мет		Лиз	Арг		
Г		ГУУ ГУЦ ГУА ГУГ	ГЦУ ГЦЦ ГЦА ГЦГ	ГАУ ГАЦ ГАА ГАГ	ГГУ ГГЦ ГГА ГГГ	У Ц А Г	
		Вал	Ала	Асп	Гли		
				Глу			

4. Генетический код вырожден, то есть одной аминокислоте может соответствовать более, чем один кодон. Только две аминокислоты – метионин и триптофан имеют по одному кодону. Лейцину и серину соответствует по 6 кодонов, глицину и аланину - по 4, а глутаминовой кислоте, тирозину и гистидину - по 2. Если аминокислота кодируется несколькими кодонами, то в большинстве случаев они различаются по третьей букве, то есть по нуклеотиду на их 3'- конце. Таким образом, специфичность каждого кодона определяется главным образом его первыми двумя нуклеотидами, третий же имеет меньшую специфичность.

5. Генетический код содержит триплеты, обозначающие начало и окончание синтеза белка. АУГ - инициирующий кодон (но во внутреннем положении он кодирует аминокислоту метионин). Терминирующие кодоны - УАГ, УАА, УГА (нонсенс-кодона) не кодируют ни одну из известных аминокислот, сигнализируют об окончании синтеза белка.

6. Важным свойством генетического кода является его неперекрываемость, то есть независимость отдельных триплетов. Вследствие этого отсутствуют ограничения в последовательности аминокислот в белках.

Неперекрывающийся код



Перекрывающийся код 1, 2, 3-номера триплетов

Исключение из правила неперекрываемости обнаружено лишь в геномах некоторых вирусов. Это обусловлено малыми размерами их ДНК и в связи с этим экономным использованием ее, так как она должна кодировать несколько белков, обеспечивающих жизнеспособность и размножение вирусных частиц. У этих вирусов используются разные рамки считывания для биосинтеза нескольких белков на одной и той же последовательности нуклеотидов ДНК.

7. Удивительное свойство кода это его универсальность. Кодовые слова одинаковы у человека, животных, растений, многих бактерий. Это служит еще одним доказательством в пользу того, что все живые организмы произошли от единого предка, имевшего генетический код, сохранившийся на протяжении всей биологической эволюции. Благодаря универсальности кода возможна геновая инженерия.

Своеобразные "диалекты" генетического кода найдены у митохондрий, хлоропластов, мельчайших бактерий, реснитчатых простейших. У них найдены минорные отклонения в генетическом коде. Например, в ДНК митохондрий человека имеется 4 измененных кодона, а у дрожжевых клеток к этим четырем добавляется еще один. Это позволяет предполагать, что эволюционировали не только живые организмы в целом, но и

их генетический код.

Контрольные вопросы: 1. Дать характеристику основных свойств генетического кода.

2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Биосинтез белка в митохондриях. Трансляция в хлоропластах».

2.14.1 Цель работы: изучить систему трансляции в хлоропластах и митохондриях.

2.14.2 Задачи работы: изучить систему трансляции в хлоропластах и митохондриях.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:
Ноутбук, средства мультимедиа

2.14.4 Описание (ход) работы:

Хлоропласты являются органеллами клеток растений, осуществляющих процесс фотосинтеза - преобразование энергии квантов света в энергию макроэргических связей АТФ. Так же как и митохондрии, хлоропласты обладают собственным геномом, представленным множественными копиями кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (хпДНК - ctDNA), длина которой обычно составляет ~150 т.п.о. Геном хлоропластов заключает в себе более 100 различных генов. В соответствии с теорией эндосимбиоза хлоропласты произошли от цианобактерии *Anacystis nidulans* (*Synechococcus* PCC6301), которая в ходе адаптации к внутриклеточному существованию передала основную часть своих генов хромосомам ядра клетки-хозяина. В результате образовавшийся хлоропласт стал зависимым от ядра в отношении биосинтеза импортируемых хлоропластных белков и генетического контроля экспрессии собственных генов. Как и митохондрии, хлоропласты обладают собственной системой транскрипции и трансляции, а также репликации хпДНК.

В отличие от митохондрий животных, система трансляции хлоропластов высоко гомологична системе бактерий и представлена 70S рибосомами, собственными тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазами, многочисленными факторами трансляции и т.п. Геном хлоропластов содержит гены всех рРНК (16S, 23S и 5S), которые кластеризованы и транскрибируются полицистронно. В большой субчастице рибосом хлоропластов рРНК 23S-типа часто представлена двумя или четырьмя фрагментами. Так, в рибосомах *Chlamydomonas eugametos* она представлена четырьмя фрагментами длиной 280 (альфа-фрагмент), 52 (бета), 810 (гамма) и 1720 (дельта) нуклеотидов. Вторичная структура фрагментов идентична предсказанной структуре соответствующих участков 23S рРНК *E.coli*, поэтому считается, что физическая непрерывность молекулы 23S рРНК не существенна для ее функционирования.

70S рибосомы хлоропластов содержат ~60 рибосомных белков, что превышает их содержание (55 полипептидов) в рибосомах *E. coli*. Приблизительно 1/3 рибосомных белков кодируется хпДНК, а 2/3 - ядерным геномом. Рибосомы хлоропластов высших растений содержат, по крайней мере, пять белков, не имеющих гомологов в рибосомах *E.coli*.

Геномы хлоропластов, для которых определена полная первичная структура, содержат 27-35 потенциальных генов тРНК. В геноме для кодирования полипептидов используются все теоретически возможные кодоны (61). Это приводит к ситуации, характерной и для митохондрий, - у хлоропластов отсутствует полный набор тРНК, необходимых для декодирования этих кодонов. Эта проблема, по-видимому, решается так же, как и у митохондрий: индивидуальные тРНК^{Pro(UGG)}, тРНК^{Ala(UGC)} и

tРНКArg(ACG) распознают по четыре кодона, которые кодируют каждую из аминокислот, акцептируемых соответствующими молекулами тРНК.

Генетическая информация хлДНК во многих случаях редактируется на уровне мРНК. В результате запрограммированных замен нуклеотидов в мРНК происходит создание новых иницирующих и терминирующих кодонов, а также изменение их смысла. Иногда редактирование сопровождается синонимическими заменами нуклеотидов (без изменения смысла кодона). Редактирование является критическим событием в экспрессии генов хлоропластов, так как неотредактированные транскрипты не способны правильно транслироваться.

Результатом редактирования предшественника мРНК хлоропластов является создание в результате двух замен нуклеотидов иницирующего и терминирующего кодонов с образованием новой открытой рамки считывания, т.е. фактически нового гена, посттранскрипционно. В хлоропластах кукурузы, табака и черной сосны, геномы которых полностью секвенированы, имеется соответственно 26, 32 и 26 сайтов редактирования. Зрелые и функционально активные мРНК хлоропластов не обладают кэп-группами и не полиаденилированы на 3'-концах. Из 70 генов, кодирующих белки в хлоропластах табака, лишь пять транскрибируются моноцистронно. Полицистронные предшественники мРНК подвергаются эндонуклеазному процессингу с образованием моноцистронных матриц. Искусственные дицистронные мРНК не транслируются в бесклеточных системах. На этом основании делается вывод, что в хлоропластах в синтезе белка участвуют моноцистронные мРНК.

Среди 79 исследованных генов, кодирующих белки в хлоропластах табака, 30 содержат SD-подобные последовательности в 20- нуклеотидном участке перед иницирующим кодоном. Остальные 49 транскриптов также содержат такие последовательности, но их положение не фиксировано на матрице. Мутационные изменения некоторых SD-подобных последовательностей снижают эффективность трансляции мутантных мРНК, что указывает на функциональную значимость этих участков мРНК. Детальное исследование 5'UTR мРНК гена psbA хлоропластов табака позволило идентифицировать цис- действующие регуляторные элементы, существенные для ее трансляции. Два из них - RBS1 (AAG) и RBS2 (UGAU), расположенные между нуклеотидами в положениях -11 и -9, -25 и -22 соответственно комплементарны 3'-концу 16S рРНК хлоропластов. Полагают, что они участвуют во взаимодействии 30S субчастицы рибосом с мРНК. AU-богатая последовательность, расположенная между ними (UAAAUAAA) и получившая название AU-бокса, также критична для трансляции. Возможно, с этой последовательностью взаимодействуют транс-действующие белковые факторы, на наличие которых указывают данные мутационного анализа *Chlamydomonas*.

Как и у бактерий, AUG является основным иницирующим кодоном мРНК хлоропластов и направляет включение в полипептидную цепь формилметионина. Информация о молекулярных механизмах отдельных этапов трансляции в хлоропластах еще не получена.

Контрольные вопросы: 1. Особенности биосинтеза белка в митохондриях. 2. Трансляция в хлоропластах.

2.15 Лабораторная работа №15 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 3 модуль».

2.15.1 Цель работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.15.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Контрольные вопросы:

1. Промоторы прокариот.
2. Особенности строения промоторов эукариот.
3. Процессинг мРНК в эукариотических клетках
4. Регуляция транскрипции у прокариот.
5. Классификация факторов транскрипции эукариот. Общие, специфические факторы транскрипции.
6. Дать характеристику основных свойств генетического кода.
7. Особенности биосинтеза белка в митохондриях.
8. Трансляция в хлоропластах.

2.16 Лабораторная работа №16 (2 часа).

Тема: «Модификации полимеразной цепной реакции».

2.16.1 Цель работы: изучить виды полимеразной цепной реакции.

2.16.2 Задачи работы: 1. Основные виды ПЦР.
2. Способы детекции продуктов амплификации в режиме реального времени.

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе: Ноутбук, средства мультимедиа

2.16.4 Описание (ход) работы:

В процессе развития работ с использованием ПЦР возникла идея амплифицировать в одной пробирке сразу несколько различных генетических локусов. В этом случае одновременно используют более одной пары олигонуклеотидных праймеров. Такая реакция получила название мультиплексная ПЦР (МППЦР). Данный подход позволяет существенно экономить время и усилия при выполнении анализов. Особенно широко его стали применять для экспресс-идентификации инфекционных агентов. Например, С.Н. Щелкунов с сотрудниками разработали метод МППЦР, позволяющий при использовании пяти пар праймеров проводить одновременно родо- и видоспецифическую идентификацию ортопоксвирусов. С помощью мультиплексной ПЦР можно также осуществлять одновременно детекцию множественных инфекционных агентов, обуславливающих схожие клинические проявления.

«Вложенная» ПЦР (Nested PCR (англ.)) – применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

«Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR (англ.)) – используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR (англ.)) – проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в

некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR (англ.)) – с помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров на образование продукта. Первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают. При определённой температуре система пройдёт через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК.

ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR (англ.)) – модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч оснований и больше). Используют две полимеразы, одна из которых – Taq-полимераза с высокой процессивностью (то есть способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК-полимераза с 3'-5'-эндонуклеазной активностью. Вторая полимеразы необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой.

ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR (RAPD PCR) (англ.)) – используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (20 – 25 пар нуклеотидов (п.н.)). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру отжига и пр.), удастся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (Real-Time PCR (англ.)) – современный, быстрый, качественный метод молекулярной диагностики. Данный метод принципиально не отличается от ПЦР по сфере своего применения и интерпретации результатов. У него повышена надежность и степень автоматизации. Поэтому он сочетает в себе достоинства ПЦР (чувствительность) и ИФА (технологичность), что позволяет применять его так, как сегодня применяют ИФА – для массового анализа проб. Для постановки ПЦР в реальном времени необходим специальный амплификатор, отличительной особенностью которого является возможность возбуждать и детектировать флуоресценцию, отражающую накопление ампликонов, на каждом цикле амплификации.

Детекция продуктов амплификации. Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют следующие наиболее распространенные подходы:

1. Выщепление 5' концевой метки (Taq-Man Assay). Данная методика основана на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы.

2. Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons).

3. Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии (LightCycler assay). Данный способ детекции накопления продуктов амплификации отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК-зондов.

4. Использование интеркалирующих агентов. Этот способ детекции основан на том факте, что флуоресценция бромистого этидия и SYBR Green I значительно возрастает при их внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК.

Подводя итоги, стоит отметить следующее: использование ДНК-зондов в том или ином варианте является наиболее предпочтительным в свете повышения специфичности анализа. Однако к недостаткам зондов относится высокая стоимость, что делает работу по подбору зондов, праймеров и условий амплификации дорогостоящей. Вместе с тем, использование интеркалирующих агентов является очень простым и дешевым. Отпадает необходимость подбора специальных праймеров, зондов, так как можно пользоваться уже существующими праймерами, эффективность работы которых проверена. Эти обстоятельства делают применение интеркалирующих агентов весьма привлекательным.

Мишенью для NASBA служат молекулы РНК рибосом (рибосомальные РНК) микроорганизмов, что дает целый ряд преимуществ перед ПЦР. Во-первых, количество рибосом в одной клетке хламидии содержится от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч. Для сравнения: даже многокопийные участки ДНК, используемые в качестве мишени для ПЦР, не превышают двух десятков на бактериальную клетку. Тем самым с помощью NASBA можно выявлять возбудителей и в тех случаях, когда их количество слишком мало и недостаточно для выявления методом ПЦР.

Во-вторых, в то время как ДНК – достаточно стабильный материал, и обнаружение ДНК еще не означает наличие жизнеспособных микроорганизмов, РНК – наоборот, крайне нестабильный материал и достаточно быстро деградирует при гибели и разрушении клеток микроорганизмов. Это дает возможность не только верно судить о наличии текущей инфекции, но и более точно и надежно оценивать результаты проведенного лечения.

Детекция продуктов амплификации в режиме реального времени (NASBA-Real-time) с использованием флуоресцентных зондов дополнительно увеличивает специфичность теста и объективность результатов лабораторного исследования.

Основными недостатками метода NASBA-Real-time являются высокая стоимость и сложность исследования, что ограничивает распространение метода. Ввиду этого, метод рекомендован для подтверждения (или исключения) наличия возбудителя в спорных случаях при расхождении результатов исследований различными методами (ПЦР, ПИФ (прямая иммунофлуоресценция), посев).

Контрольные вопросы: 1. Асимметричная ПЦР, Touchdown (Stepdown) ПЦР, ПЦР длинных фрагментов, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК. 2. Real-time ПЦР.

2.17 Лабораторная работа №17 (2 часа).

Тема: «Знакомство с методикой проведения полимеразной цепной реакции. Техника выделения ДНК. Амплификация».

2.17.1 Цель работы: ознакомиться с этапами проведения ПЦР (пробоподготовка, амплификация).

2.17.2 Задачи работы:

1. Требования к проведению ПЦР-анализа.
2. Методика выделения нуклеиновых кислот. Амплификация.

2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

ПЦР-бокс для стерильных работ с электрическим таймером и УФ-рециркулятором, термостат для микропробирок, автоматические пипетки, амплификатор, миницентрифуга, суточная культура микроорганизмов, набор реагентов ДНК-экспресс, праймеры, dNTP, Taq-полимераза, MgCl₂, минеральное масло, вода без нуклеаз.

2.17.4 Описание (ход) работы:

ПЦР-лаборатория должна быть разделена на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР-диагностики. Следует иметь не менее двух комнат:

– пре-ПЦР-помещение, где проводится обработка клинических образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР; в этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами (микробиологический анализ, ИФА, другие диагностические тесты и т.д.), ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории.

– пост-ПЦР-помещение, где проводится детекция продуктов амплификации; в пост-ПЦР-помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций, диагностика которых проводится в данной лаборатории.

Выделяют два вида контаминации:

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов.

2. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

Для предотвращения контаминации используют различные физические и химические методы:

1. Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы.

2. Использованные наконечники для автоматических пипеток, пробирки и другие загрязненные ДНК материалы необходимо обрабатывать реагентами, вызывающими деградацию ДНК (1 н HCl, 10% гипохлоридом натрия или 10% хлорной известью).

При проведении ПЦР-анализа работать необходимо только в одноразовых перчатках; использовать одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Анализ продуктов ПЦР должен производиться в изолированной комнате сотрудником лаборатории, не производящим обработки клинических образцов и операций с реакционной смесью (МУ 1.3.2569-09).

1. Пробоподготовка или выделение ДНК (РНК).

Бактериальные лизаты для постановки ПЦР получают с помощью реагента «ДНК-Экспресс» (Литех, Россия). Для этого суточную агаровую культуру петлёй вносят в пробирку с реагентом, перемешивают на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 10 с, помещают пробирку в твердотельный термостат и инкубируют при температуре 98 °С в течение 20 минут. После завершения инкубации пробирки центрифугируют при 12000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 секунд. Надосадок помещают в чистые пробирки. Полученный супернатант используют в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

2. Собственно ПЦР или амплификация. Для ее проведения необходимы следующие компоненты:

ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент).

Праймеры (синтетические олигонуклеотиды, комплиментарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента).

Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ) в реакционной смеси содержатся в эквивалентных концентрациях, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Фермент Taq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к растущей цепи синтезируемой ДНК).

Магний необходим для функционирования фермента Taq-полимеразы.

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента.

Минеральное масло наслаивается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

ПЦР проводят в термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Реакционная смесь включает 1 мкл бактериального лизата, по 0,5-1 мкл специфических праймеров, 0,8 мкл дезоксирибонуклеозид-трифосфатов (10 mM, Thermo Scientific, США), 2,5 мкл 10хПЦР-буфера (Хеликон, Россия), 1,5 мкл хлорида магния (25 mM, Fermentas, Литва),

0,2-1 мкл фермента Таq-полимеразы (5 ед/мкл, Хеликон, Россия). Реакционную смесь доводят до 25 мкл водой без нуклеаз (Fermentas, Литва).

Контрольные вопросы: 1. Устройство ПЦР лаборатории. 2. Основные компоненты реакционной смеси для ПЦР. 3.

2.18 Лабораторная работа №18 (2 часа).

Тема: «Знакомство с методикой проведения полимеразной цепной реакции. Учёт результатов».

2.18.1 Цель работы: ознакомиться с детекцией результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле.

2.18.2 Задачи работы: Освоить детекцию результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле.

2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Камера для горизонтального электрофореза, источник постоянного тока "Эльф-4", дозатор одноканальный на 5-50мкл, трансиллюминатор с видеосистемой, агароза, буфер, маркеры молекулярных масс GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва), погружающий раствор, бромистый этидий.

2.18.4 Описание (ход) работы:

1. Детекция продуктов амплификации.

Продукты амплификации генов анализируют путем электрофоретического разделения в 1-2%-ном горизонтальном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве маркеров применяют GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Плотность агарозного геля и маркеры молекулярного веса подбирают в зависимости от молекулярной массы продуктов амплификации. Результаты визуализируют в ультрафиолетовом свете.

Положительное заключение о наличии гена делают при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определённой массы, которую устанавливают по линейке молекулярных масс.

Для документирования полученных результатов гелевые пластины фотографируют.

Контрольные вопросы: 1. Описать метод детекции продуктов амплификации в горизонтальном агарозном геле.

2.19 Лабораторная работа №19 (2 часа).

Тема: «Технология микрочипов».

2.19.1 Цель работы: изучить методы создания биочипов.

2.19.2 Задачи работы: 1. Биочип. 2. методы, лежащие в основе технологии биочипов. 3. Эффективность биочипов. 4. Принцип действия ячейки ДНК или олигонуклеотидного биочипа.

2.19.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, средства мультимедиа

2.19.4 Описание (ход) работы:

Биологические микрочипы (biochips) или, как их чаще называют – DNA microarrays, – это один из новейших инструментов биологии и медицины 21 века.

Изобретены биочипы были в конце 90-х годов XX века в России и в США. В настоящее время они активно производятся несколькими американскими биотехнологическими фирмами. Производят биочипы также и в России, в Центре биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Биочипы используются для самых разных целей. В медицине биочипы помогают за считанные часы обнаруживать у больных лекарственно устойчивые формы туберкулеза. Еще одно очень важное медицинское применение биочипов – это диагностика лейкозов и других раковых заболеваний. Биочипы позволяют быстро, за считанные дни или даже часы различать внешне неразличимые виды лейкозов. Исследователи в университетах и в фармакологических фирмах проводят на чипах одновременный анализ работы тысяч и десятков тысяч генов и сравнивают экспрессию этих генов в здоровых и в раковых клетках. Такие исследования помогают создавать новые лекарственные препараты и быстро выяснять, на какие гены и каким образом эти новые лекарства действуют. Биочипы являются также незаменимым инструментом для биологов, которые могут сразу, за один эксперимент, увидеть влияние различных факторов (лекарств, белков, питания) на работу десятков тысяч генов. Микрочип (или биочип) позволяет в короткое время (несколько часов) не только определить наличие инфекционного агента, но и дифференцировать его по видовой или штаммовой принадлежности.

Биочипы – это организованное размещение молекул ДНК на специальном носителе. Профессионалы называют этот носитель «платформой». Платформа – это чаще всего пластинка из стекла или пластика (иногда используют и другие материалы, например кремний). В этом смысле чипы биологические близки к чипам электронным, которые и базируются на кремниевых пластинах. Это организованное размещение занимает на платформе очень небольшой участок размером от почтовой марки до визитной карточки, поэтому в названии биочипов присутствует слово *micro*. Микроскопический размер биочипа позволяет размещать на небольшой площади огромное количество разных молекул ДНК.

Технология микрочипов представляет собой последовательное проведение ранее описанных методов ПЦР и ДНК-гибридизации с визуализацией результатов на микроносителе. После проведения ПЦР с универсальными праймерами, проводится гибридизация на микрочипе, который содержит набор зондов, меченных флюоресцентным красителем и специфичных к каждому из подтипов ДНК. Если гибридизации не произошло, цвет нанесённого зонда не меняется. Если гибридизация произошла – изменяется цвет зонда.

Если последовательность оснований в одной нити ДНК (или олигонуклеотида) полностью комплементарна последовательности другой нити, то образуется стабильная совершенная двухнитчатая спираль – дуплекс. Однако присутствие даже одной неправильной пары, например G-G, предотвращает образование дуплекса. В результате флюоресцентное свечение наблюдается только на этом комплементарном элементе биочипа. Регистрация происходящих на биочипах процессов осуществляется с помощью флюоресцентных, а также в некоторых случаях хемилюминисцентных и масс-спектрометрических методов. Для количественного флюоресцентного анализа были разработаны флюоресцентные широкопольные высоко-апертурные микроскопы, снабженные камерой с полярно-зарядовой связью (ПЗС-камера). Вместо фотопленки в этой камере используется пластина, состоящая из множества крошечных электронных элементов (пикселей), которые обладают свойством накапливать попадающий на них свет, передавая информацию на ЭВМ. Прибор позволяет проводить в реакционной камере количественный анализ в реальном времени сразу всех элементов биочипа в автоматическом режиме, одновременно при четырех длинах волн, при заданной или меняющейся температуре. Более 20 таких достаточно дорогих исследовательских анализаторов биочипов поставлены в лаборатории России и США. Для клиник разработан более простой и дешевый лазерный анализатор. Он позволяет проводить количественную

регистрацию флюоресценции одновременно со всего биочипа с помощью более простой ПЗС-камеры и обрабатывать результаты на прилагаемом портативном компьютере с помощью специально созданных программ.

Способы изготовления биочипов бывают разными. Одна из крупнейших фирм по производству биочипов – Affymetrix (США, Калифорния) — изготавливает биочипы таким же способом, каким изготавливают электронные чипы. Чипы Affymetrix наращиваются прямо из стеклянной пластинки методом фотолитографии с использованием специальных микромасок. Применение отработанных методов электронной промышленности позволило добиться впечатляющих результатов. На одном таком чипе расположены десятки (а иногда и сотни) тысяч пятен размером в несколько микрон. Каждое пятно – это один уникальный фрагмент ДНК длиной в десятки нуклеотидов. Изготовленный таким образом биочип в дальнейшем гибридизуют с молекулами ДНК, мечеными красителем.

Биочипы изготавливают не только методом фотолитографии. Другой подход – это когда олигонуклеотиды (относительно короткие фрагменты однонитевой ДНК) синтезируют отдельно, а затем уже пришивают к биочипу. Чипы такого типа изготавливают в разных фирмах, в частности, в Москве, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ). Биочипы, изготовленные в ИМБ, позволяют различать у больных туберкулезом штаммы, отличные от штаммов, устойчивых к антибиотикам. Проблема состоит в том, что у некоторых больных бактерии туберкулеза имеют устойчивость к антибиотику рифампицину, и он не помогает при лечении болезни. У большей части больных бактерии обычные (так называемые дикие штаммы бактерий), и антибиотик помогает. Необходимо знать устойчивость бактерий к антибиотику в самом начале лечения. Традиционные методы определения устойчивости бактерий туберкулеза могут отнять несколько недель. Биочипы позволяют решить эту задачу за 1–2 дня. В Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН разработана система идентификации *Bacillus anthracis* и дифференциации от родственных бацилл, создан ряд микрочипов для экспрессного метода идентификации нитрифицирующих бактерий и археобактерий. Присутствие рибосомальных РНК в клетке в количестве тысяч копий позволяет проводить анализ в ряде случаев без их амплификации.

Примером новейших специальных разработок в области биочипов является биочип, разработанный специалистами из Нортвестернского университета в США для американской армии. Если на этот биочип попадает ДНК от патогенных микробов, то фрагменты ДНК зондов с прикрепленными к ним микроскопическими частицами золота выстраиваются в ряд. Между электродами идет ток и биочип сигнализирует об угрозе. Специальный биочип сигнализирует о наличии бактериальной угрозы после того, как золотые микрочастицы замыкают два электрода.

Технологии биочипов, как и многие другие, ещё предстоит разработать и адаптировать к нуждам отечественного животноводства.

Контрольные вопросы: 1. Биочип. 2. методы, лежащие в основе технологии биочипов. 3. Эффективность биочипов. 4. Принцип действия ячейки ДНК или олигонуклеотидного биочипа.

2.20 Лабораторная работа №20 (2 часа).

Тема: «Итоговое занятие за 4 модуль».

2.20.1 Цель работы: Проверить знания студентов по пройденному материалу

2.20.2 Задачи работы: Оценить знания студентов по пройденному материалу

2.20.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

Ноутбук, средства мультимедиа

2.20.4 Описание (ход) работы:

Контрольные вопросы:

1. Асимметричная ПЦР, Touchdown (Stepdown) ПЦР, ПЦР длинных фрагментов, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК.
2. Real-time ПЦР.
3. Устройство ПЦР лаборатории.
4. Основные компоненты реакционной смеси для ПЦР.
5. Описать метод детекции продуктов амплификации в горизонтальном агарозном геле.
6. Биочип.
7. Методы, лежащие в основе технологии биочипов.
8. Эффективность биочипов.
9. Принцип действия ячейки ДНК или олигонуклеотидного биочипа.