

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ИНГУШСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Кафедра биологии

Курс лекций по дисциплине «Молекулярная биология»

Факультет: химико-биологический

Для студентов направление подготовки: **06.03.01. Биология - 2 курс**

Преподаватель: д.б.н., профессор Плиева А.М.

ВВЕДЕНИЕ.

Молекулярная биология – наука об особенностях строения и свойствах молекул, обеспечивающих существование биологической формы движения материи. Молекулярная биология занимается изучением целого ряда проблем, стоящих перед современной биологией. К ним относятся:

1. Исследование тонкой структуры нуклеиновых кислот и генов.
2. Изучение процессов, в которых участвуют нуклеиновые кислоты: транскрипция, трансляция, репликация, репарация, рекомбинация.
3. Мобильные генетические элементы.
4. Структура и функции белков.
5. Молекулярная биология развития, нуклеиновые кислоты в оогенезе и онтогенезе.
6. Проблемы старения клетки и апоптоз.
7. Канцерогенез.

Молекулярная биология как самостоятельная наука, изучающая молекулярные основы жизнедеятельности клетки, возникла на рубеже 1940-1950 гг., когда была установлена генетическая роль ДНК, а расшифровка структуры ДНК позволила описать принцип передачи наследуемых признаков от родительской клетки к дочерним.

К этому времени история изучения нуклеиновых кислот насчитывала уже около восьмидесяти лет. Честь их открытия принадлежит выдающемуся швейцарскому биохимику Фридриху Мишеру, который в 1868-1872 гг. выделил из ядер клеток гноя и спермы лосося новое фосфорсодержащее вещество, названное им нуклеином. Впервые нуклеиновую кислоту, свободную от белков, получил Р. Альтман в 1889 г., который и ввел этот термин в биохимию. Разработка методов выделения и изучение химического состава нуклеиновых кислот были продолжены в лабораториях А. Косселя, У. Джонса, П. Левина, О. Гаммерстена, Дж. Гулланда и др.

Усилиями этих ученых и их сотрудников удалось установить, что в природе существует два типа нуклеиновых кислот. К середине 1930-х годов

было доказано, что ДНК и РНК содержатся в каждой живой клетке. Первостепенная роль в утверждении этого фундаментального положения принадлежит А. Н. Белозерскому. С развитием методов цитохимии и гистохимии к концу 1940-х годов было установлено, что ДНК локализуется преимущественно в ядре, а РНК – в цитоплазме клеток.

К началу 1950-х годов были завершены работы по изучению принципов химического строения нуклеиновых кислот, когда было установлено строение их мономеров – нуклеотидов и нуклеозидов, и доказано, что и в ДНК, и в РНК нуклеотидные остатки связаны только фосфодиэфирной связью. Было показано, что в ДНК аденин и тимин, гуанин и цитозин всегда содержатся в равных количествах (Э. Чаргафф и сотр.); это имело принципиальное значение при установлении ее макромолекулярной структуры.

Выдающейся вехой в изучении нуклеиновых кислот стало открытие О. Эйвери и сотр. (1944). Они показали, что с помощью чистой ДНК наследуемый признак может быть перенесен из одной клетки в другую и что ДНК является носителем генетической информации. Это положение получило вскоре убедительное подтверждение в экспериментах А. Херши и М. Чейз с ДНК бактериофагов.

В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик сумели правильно интерпретировать данные рентгеноструктурного анализа ДНК, накопленные в лабораториях Р. Франклина и М. Уилкинса, и на их основе построить модель пространственной структуры ДНК. Они показали, что макромолекула ДНК - это регулярная двойная спираль, в которой две нуклеотидные цепи строго комплементарны друг другу. Из анализа модели следовало, что после расплетания двойной спирали на каждой из цепей может быть построена комплементарная ей новая, в результате чего образуются две дочерние молекулы, не отличимые от материнской ДНК. Через пять лет М. Мезельсон и Ф. Сталь экспериментально подтвердили этот механизм, а несколько раньше (1956) А. Корнберг открыл фермент ДНК-полимеразу, который на

расплетенных цепях, как на матрицах, синтезирует новые, комплементарные им цепи ДНК.

Открытие генетической роли ДНК потребовало решения другой фундаментальной задачи – проблемы кода, с помощью которого нуклеотидный текст переводится на язык аминокислот – структурных единиц белка. Впервые эту задачу правильно сформулировал в начале 1950-х годов Г. Гамов, который предсказал, что этот код должен быть трехбуквенным и неперекрывающимся. Экспериментально общие свойства генетического кода были установлены Ф. Криком, С. Бреннером и сотр. к концу 1950-х – началу 1960-х годов. К этому же времени в общих чертах были выяснены функции и принципы структурной организации РНК. Были открыты рибосомы и рибосомные РНК, транспортные РНК и, наконец, информационные РНК. Стало ясным, что в совокупности все эти РНК служат промежуточным звеном при переносе генетической информации от ДНК к белкам. Было доказано, что собственно биосинтез цепей белка происходит на рибосомах, где генетическая информация, переписанная (транскрибированная) с ДНК в виде мРНК, транслируется с помощью тРНК.

В 1960 г. сразу в нескольких лабораториях был открыт фермент РНК-полимераза, осуществляющая синтез РНК на ДНК-матрицах. Таким образом, идея Ф. Крика о передаче генетической информации от ДНК к белку через РНК была подтверждена.

Генетический аминокислотный код был полностью расшифрован в 1961-1966 гг. усилиями лабораторий М. Ниренберга, С. Очоа и Г. Кораны.

Открытие основных компонентов систем транскрипции и трансляции послужило важным стимулом в изучении механизма регуляции этих процессов. В 1961 г. Ф. Жакоб и Ж. Моно опубликовали схему регуляции синтеза белков на уровне транскрипции при помощи регуляторных белков, а в 1966 г. У. Гилберт и Б. Мюллер-Хилл впервые выделили такой белок. Кроме того, оказалось, что РНК-полимераза сама является регулятором

генной активности (Р.Б. Хесин). Эти работы привели к открытию основных регуляторных элементов – промоторов и терминаторов транскрипции.

В середине 1960-х годов начались исследования нуклеотидных последовательностей РНК. Первыми были определены первичные структуры тРНК (Р. Холли и сотр., 1965; А. А. Баев и сотр., 1967) . Развитие техники фракционирования фрагментов нуклеиновых кислот и, прежде всего, гель-электрофореза (Ф. Сэнгер и сотр.) позволило в начале 1970-х годов приступить к изучению первичной структуры высокомолекулярных РНК. В 1976-1978 гг. были созданы исключительно быстрые и эффективные методы секвенирования ДНК и РНК (А. Максам и У. Гилберт, Ф. Сэнгер и сотр.), которые позволили за короткое время получить огромную информацию о первичной структуре генов, их регуляторных элементах, вирусных и рибосомных РНК и т.д.

В 1973 г. одновременно в лабораториях А. Рича и А. Клуга с помощью рентгеноструктурного анализа была установлена пространственная структура тРНК. В эти же годы был открыт основной структурный элемент эукариотических хромосом – нуклеосома – и разработаны методы ее исследования.

В 1970 г. Г. Темин и Д. Балтимор открыли в онкогенных вирусах РНК-зависимую ДНК-полимеразу и тем самым показали, что в принципе поток генетической информации может быть обращен от РНК к ДНК.

Огромное значение для молекулярной биологии имело развитие генетической инженерии (возникшей в 1972-1973 гг.; П. Берг, П. Лобан, С. Коэн и Г. Бойер) и методов работы с рекомбинантными ДНК в сочетании с методами химического синтеза крупных фрагментов ДНК. В результате сделались доступными для исследования индивидуальные гены и регуляторные генетические элементы, было стимулировано изучение ферментов биосинтеза и обмена нуклеиновых кислот. Благодаря этому после 1977 г. были обнаружены мозаичное (экзон-интронное) строение генов, явление сплайсинга и ферментативной активности у РНК, усилители

(энхансеры) экспрессии генов, многие регуляторные белки, онкогены и онкобелки, мобильные генетические элементы. Возникла белковая инженерия, которая позволяет получать новые, не существующие в природе белки. Молекулярная биология начала оказывать существенное влияние на развитие биотехнологии, медицины и сельского хозяйства.

Идентификация генов человека и выяснение первичной нуклеотидной последовательности человеческого генома составляет основные, взаимосвязанные задачи Международной программы «Геном Человека». Официально эта научная программа с участием ведущих молекулярно-генетических лабораторий США, Западной Европы, России и Японии оформилась в 1990 г. Однако, задолго до приобретения официального статуса в этих странах проводились молекулярные исследования по изучению генома человека и картированию генов. Предполагалось, что основной раздел программы, касающийся секвенирования всего генома человека, т.е. выяснения первичной последовательности молекулы ДНК, достигающей 1,5 метров и состоящей из $3,5 \cdot 10^9$ нуклеотидов, будет завершён уже к 2005 году. Однако, серьёзные технические усовершенствования этого трудоёмкого процесса, его автоматизация и резкое снижение себестоимости многих молекулярно-генетических методов позволили сделать это уже в 2002-2003 гг.

Как и любая другая наука, молекулярная биология использует целый ряд методов.

Физические методы изучения структуры и свойств нуклеиновых кислот и белков.

Рентгеноструктурный анализ. Для того, чтобы определить структуру какого-либо вещества с помощью рентгеновских лучей, необходимо получить это вещество в кристаллической форме. В кристалле атомы расположены в закономерно повторяющемся порядке во всех трех измерениях. Если в определенных направлениях провести через кристалл прямые плоскости, то одинаковые атомы будут повторяться в них периодически, т.е. с одинаковыми интервалами.

Когда пучок рентгеновских лучей проходит через кристалл, эти наборы параллельных плоскостей действуют как системы зеркал, расположенных под разными углами, они отражают часть лучей в разных направлениях. Если позади кристалла поместить фотопластинку, то на ней появится очень интенсивное центральное пятно от прямого луча, окруженное множеством мелких пятен, соответствующих отражениям от различных групп параллельных плоскостей кристалла. Измерив положение и интенсивность каждого пятна и сочетая сложнейшие вычисления с более или менее обоснованными догадками, можно определить структуру молекул.

Электронная микроскопия. В 1924 г. Л. Бойль высказал мысль, что электроны в некоторых отношениях ведут себя подобно свету. Через восемь лет был создан электронный микроскоп в его первоначально примитивной форме, а еще через 20 лет он был усовершенствован почти до своего теоретического предела. Замена светового луча пучком электронов сделала видимыми объекты в несколько тысяч раз меньше тех, которые видны в обычный микроскоп. В 1950-х гг. удалось разработать методы приготовления препаратов для электронной микроскопии, позволившие выявить до того невидимые структуры, заполнявшие клетку. Электронный микроскоп позволяет исследовать лишь очень тонкие срезы ткани – толщиной лишь около тысячной доли диаметра средней клетки. По электронным микрофотографиям этих ультратонких срезов восстанавливается трехмерная структура исследуемого объекта.

Седиментационный анализ. Ротор ультрацентрифуги делает 50 000 и больше оборотов в минуту; при такой скорости вращения могут осаждаться мелкие частицы, даже такие, как молекулы ДНК. Молекулы солей в ультрацентрифуге не осаждаются, однако и они испытывают действие центробежной силы; поэтому их концентрация возрастает по направлению к дну центрифужной пробирки. Если увеличивается концентрация соли, то в этом же направлении возрастает и плотность раствора. Значит, при ультрацентрифугировании солевого раствора создается градиент плотности. На этой основе и был разработан метод, позволяющий разделять даже мало различающиеся по плотности молекулы ДНК. Обычно используется раствор хлористого цезия такой концентрации, чтобы его плотность была равна плотности ДНК. После центрифугирования этого раствора в течение нескольких часов в нем устанавливается градиент плотности: в середине пробирки плотность раствора не меняется, но выше этой зоны она уменьшается, а ниже – увеличивается. Если раствор содержит не только хлористый цезий, но и ДНК, то в процессе установления градиента ДНК концентрируется в узкой зоне средней части пробирки, где плотность равна плотности самой ДНК. Молекулы ДНК с несколько иной плотностью концентрируются немного выше или ниже этой зоны.

Химические методы.

Определение первичной структуры биополимеров. Определение нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот называется секвенированием. Для этого исходная молекула ДНК сначала фрагментируется путем гидролиза рестриктазами. Существуют два принципиально различных подхода к определению первичной структуры ДНК. Первый из них предложен А. Максамом и У. Гилбертом и основан на специфическом химическом расщеплении полинуклеотидной цепи с последующим анализом рестриктов с помощью гель-электрофореза.

Второй подход разработан Ф. Сэнгером. В его основе лежит копирование анализируемого участка ДНК с помощью ДНК-полимеразной

реакции. В настоящее время эти методы автоматизированы и позволяют определять полинуклеотидную последовательность ДНК, составляющей геном любого организма, включая и геном человека.

Синтез олигонуклеотидов и генов. Олигонуклеотиды синтезируют химическим методом, а гены – химико-ферментативным. При синтезе однонитевых олигонуклеотидов наращивают их цепочки путем присоединения определенных звеньев в заданной последовательности. Побочные реакции предотвращают химической защитой реакционноспособных групп, которые не участвуют в реакции полимеризации. Таким ступенчатым способом синтезируют лишь 3-4-членные олигонуклеотиды. Аналогичным образом происходит синтез олигонуклеотидов в твердой фазе, только в данном случае первые члены соединяют с нерастворимой матрицей (специально модифицированный полимер). Такой метод позволяет стандартизировать этапы синтеза олигонуклеотидов. На его основе сконструированы синтезаторы ДНК с полностью автоматизированным синтезом.

Основные принципы химико-ферментативного синтеза двунитевых фрагментов ДНК разработаны Г. Кораной в конце 1960-х годов. Они предусматривают несколько этапов данного процесса. На первом этапе химически синтезируют 10-12-членные однонитевые олигонуклеотиды, из которых затем образуют двунитевые фрагменты. При этом соседние олигонуклеотиды, относящиеся к комплементарным нитям, должны частично перекрываться друг другом. Затем смежные олигонуклеотиды «сшивают» ДНК-лигазой.

Биологические и биохимические методы.

Культуры клеток. Многие типы клеток животных и растений растут и делятся в подходящих питательных средах. При этом некоторые из них прочно прикрепляются к твердым поверхностям и продолжают делиться до тех пор, пока поверхность чашки целиком не покроется одиночным слоем клеток. Другие типы клеток не прекращают деление после вступления в

контакт с соседними клетками и образуют на чашке множество слоев; часто этим свойством отличаются клетки ракового происхождения. Некоторые клетки животных не прикрепляются к поверхности и растут в суспензии подобно клеткам бактерий и дрожжей.

Первичные клеточные культуры, полученные из свежих тканей, обычно имеют ограниченное время жизни. Они делятся всего несколько раз, а затем рост их прекращается. Однако из таких культур можно получить перевиваемые клеточные линии, клетки которых по существу бессмертны. Такие линии широко используются в экспериментах с рекомбинантными ДНК. Они были получены из клеток различных организмов и органов, например из эмбрионов грызунов, почек обезьян, из *Drosophila* и раковых опухолей грызунов и человека.

Гибридные клетки. Неограниченные возможности для объединения геномов, включая геномы эволюционно далеких организмов, открывает техника слияния протопластов в присутствии полиэтиленгликоля. В таких гибридных клетках чаще всего со временем остается полный набор хромосом одного их родителей и одна или несколько хромосом другого родителя. Эти методы позволяют конструировать рекомбинанты, минуя половой процесс, т.е. создавать соматические гибриды. Они также применяются для картирования генов и изучения механизмов их регуляции.

Гель-электрофорез позволяет определить длину фрагментов биополимеров, т.к. скорость движения молекул в электрофоретическом поле зависит от длины фрагмента. Для этого препарат разрезанной ДНК наносят сверху на агарозный гель. При наложении электрического поля фрагменты начнут перемещаться вниз по гелю со скоростью, зависящей от их длины. Чем короче фрагмент, тем быстрее он движется.

В результате электрофореза в геле образуется ряд полос. Те полосы, которые распределяются сверху геля, соответствуют большим фрагментам, а те, которые снизу – маленьким. Если гель прокалывать, то можно определить длину любого фрагмента ДНК. Для этого на одну из дорожек

геля наносят контрольную пробу. Она содержит смесь стандартных фрагментов известного размера.

Методы генной инженерии позволяют производить различные манипуляции с молекулами нуклеиновых кислот и получать их рекомбинантные молекулы.

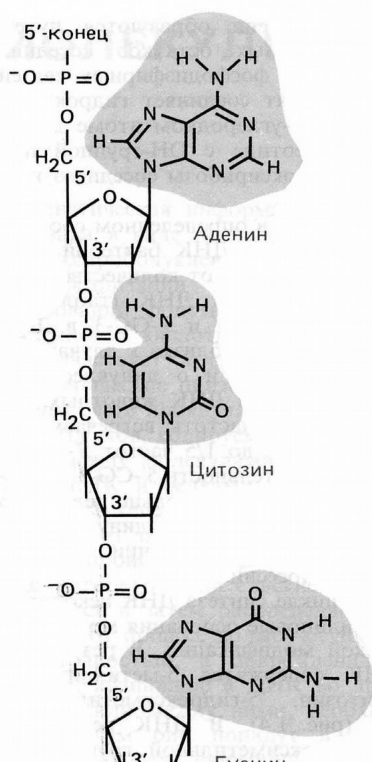
Глава I

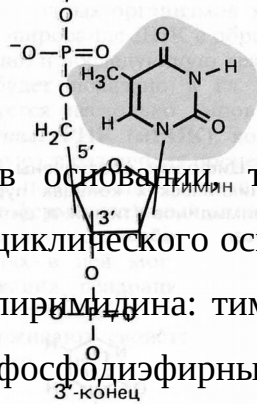
Структура нуклеиновых кислот.

1.1. Структура ДНК.

У эукариот ДНК локализована преимущественно в ядрах клеток, у прокариот она образует компактный нуклеоид, в котором содержится вся хромосома бактериальной клетки. Митохондрии и хлоропласты содержат свою собственную ДНК. Кроме того, в цитоплазме многих прокариот и низших эукариот обнаруживаются внехромосомные ДНК – плазмиды.

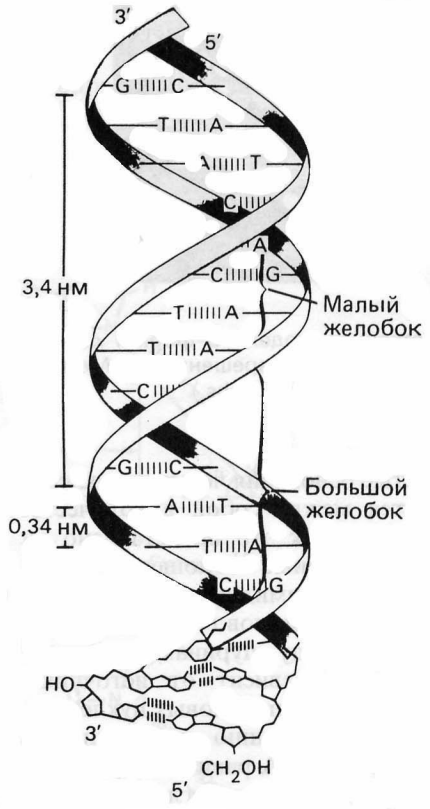
ДНК относится к классу биополимеров мономерами которой являются остатки нуклеотидов. Нуклеотиды – это фосфорные эфиры нуклеозидов. Нуклеозиды состоят из остатка углевода – пентозы и гетероциклического азотистого основания. Связь между углеводным остатком и гетероциклическим основанием в нуклеозиде осуществляется через атом





азота в основании, т.е. с помощью N-гликозидной связи. В качестве гетероциклического основания ДНК содержат два пурина: аденин и гуанин – и два пиримидина: тимин и цитозин. Мономерные остатки связаны между собой фосфодиэфирными связями (рис. 1). Связь осуществляется только за счет 3'-ОН одного нуклеотидного остатка и 5'-ОН другого. Поэтому межнуклеотидную связь называют 3' 5' – фосфодиэфирной. Следовательно, цепи ДНК полярны и их концевые остатки неравноценны. Эти концы называют 5'- и 3'- концами цепи. ДНК – это неразветвленный полимер.

С помощью физико-химических, электронно-микроскопических и рентгено-структурных методов показано, что большинство молекул ДНК представляют собой протяженные, гибкие, нитевидные структуры. Молекула ДНК имеет почти постоянный диаметр и состоит из регулярно расположенных повторяющихся звеньев, причем ее структура не зависит от нуклеотидного состава. Молекула ДНК обычно находится в форме двойной



клетидными цепями, обвивающимися о фосфатных остова, расположенные по параллельную ориентацию. В наиболее форме пуриновые и пиримидиновые в стопки с интервалом 0,34 нм и примерно перпендикулярны оптической ось. Полный оборот каждые 3,4 нм, т.е. через ее поверхности имеются два желобка – глубокий и узкий. В глубоком желобке нуклеотиды спарены, и двойная спиральных связей между пуринами одной цепи имеются два типа пар оснований – АТ и GC, называемые большими парами. В АТ – паре основания соединены двумя водородными связями, в GC – паре имеются три водородные связи.

Рис. 2. Схематическое изображение В – формы двойной спирали ДНК

соединены двумя водородными связями, в GC – паре имеются три водородные связи.

Дополнительная стабилизация двойной спирали обеспечивается межплоскостными взаимодействиями ароматических колец соседних оснований. Размеры комплементарных пар оснований практически одинаковы; примерно одинаковы также угол и направление связи дезоксирибоза – основание. Расстояние между соседними основаниями 0,34 нм, а угол, на который они повернуты друг относительно друга, - 36°. Из всех этих данных следует, что диаметр спирали постоянен, а число пар оснований на виток спирали равно 10.

Водородные связи и межплоскостные взаимодействия, стабилизирующие двойную спираль, достаточно слабы, и при относительно небольших воздействиях происходит разделение цепей – процесс, называемый денатурацией или плавлением. Двухцепочечная спиральная ДНК в растворе легко разрушается при нагревании до 100°C, при увеличении рН раствора. Денатурация – процесс обратимый, восстановление двухцепочечной структуры ДНК называется ренатурацией или отжигом.

1.2. Упаковка ДНК в хромосомах.

В клетках или вирусах ДНК, по-видимому, никогда не находится в свободной вытянутой форме. Она связана с низкомолекулярными катионами – ионами двухвалентных металлов либо с ди- и полиаминами или с белками, а возможно, с теми и с другими. Взаимодействие осуществляется с помощью электростатических сил – отрицательно заряженные фосфатные группы частично нейтрализуются положительно заряженными ионами металлов и полиаминами или основными аминокислотными остатками белков. В результате таких взаимодействий происходит конденсация ДНК с уменьшением объема, занимаемого молекулой, иногда в тысячу раз.

Хромосомы эукариотических клеток состоят в основном из хроматина – комплекса двухцепочечной ДНК и пяти гистоновых белков, обозначаемых Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Все они содержат необычно большое количество положительно заряженной аминокислоты лизина; Н3 и Н4 отличаются от других тем, что у них достаточно высок уровень положительно заряженной

аминокислоты аргинина. Соотношение между H2A, H2B, H3 и H4, содержащимися в хроматине низших эукариот такое же, как в хроматине млекопитающих.

На электронно-микроскопических фотографиях хроматин выглядит либо как длинное волокно диаметром 10 нм, либо чаще как более вытянутое волокно с утолщениями – «бусинками» диаметром 10 нм, нанизанными по всей длине волокна с определенными интервалами. Каждая из этих бусинок представляет собой нуклеосомный кор, на который намотан сегмент хромосомной ДНК длиной 145 пар оснований. Кор – это гистоновый октамер, состоящий из гистонов H2A, H2B, H3 и H4, по две молекулы каждого вида. Молекула ДНК обвиваясь $1\frac{3}{4}$ раза вокруг нуклеосомного кора, образует сверхспираль.

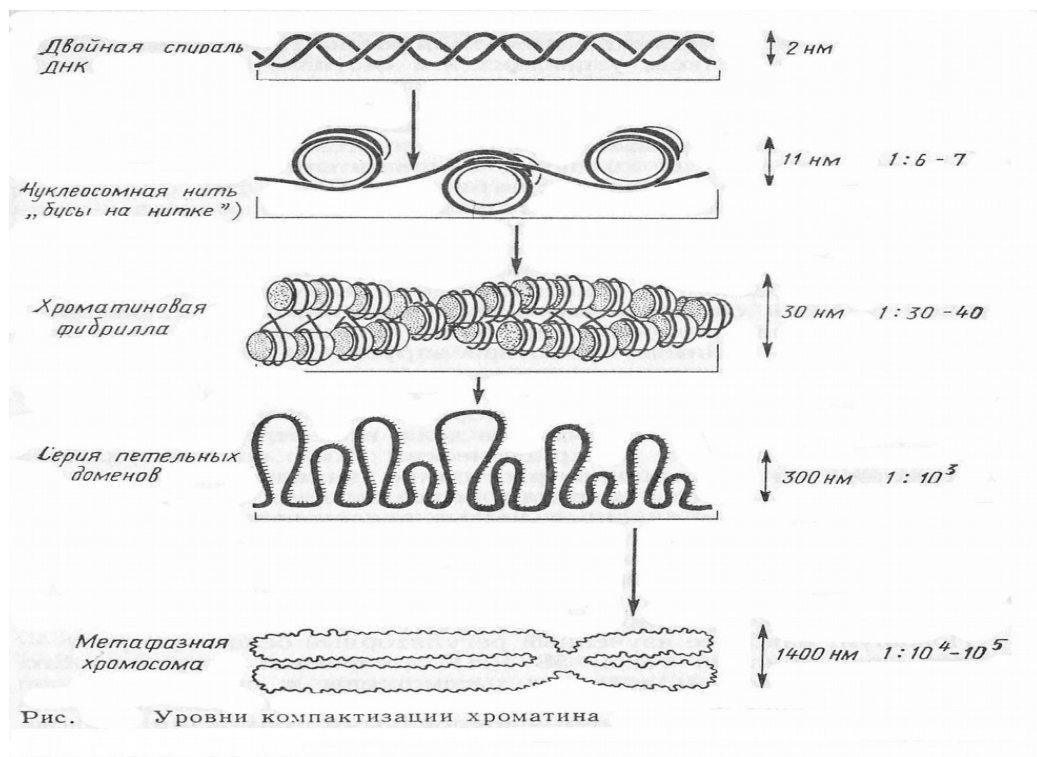


Рис. 3. Уровни компактизации хроматина

Пятый гистон, H1, не входит в состав нуклеосомного кора и не участвует в процессе наматывания ДНК на гистоновый октамер. Он

контактирует с ДНК в тех местах, где двойная спираль входит и выходит из нуклеосомного кода. В такой структуре с одним гистоновым октамером и молекулой гистона H1 ассоциированы 168 пар оснований спиральной ДНК. Далее подобная структура конденсируется в 10 нм фибриллы, в которой нуклеосомы упакованы бок о бок. Волокно диаметром 10 нм может подвергаться дальнейшей конденсации с образованием структур более высокого порядка. При этом нуклеосомы, по всей видимости, образуют соленид – структуру диаметром 30 нм (рис.3).

В результате взаимодействия ДНК с гистонами сегмент двойной спирали ДНК из 168 пар оснований со средним диаметром 2 нм и длиной 57 нм превращается в спираль диаметром 10 нм и длиной 5 нм. При последующем сжатии этой спирали до волокна диаметром 30 нм степень конденсации увеличивается в шесть раз. Таким образом, упаковка ДНК с гистонами приводит к 50-кратной конденсации ДНК. Однако столь высокая степень конденсации не может объяснить почти 5000-кратное уплотнение ДНК в метафазной хромосоме.

Представление о доменной организации хромосом эукариот было первоначальной гипотезой, выдвинутой по аналогии с хорошо установленной доменной структурой бактериального нуклеотида. Доменная организация хроматина проявляется на уровне метафазных хромосом, где ДНК присоединяется в виде петель (доменов) к белковому остову хромосомы (рис.3). Размер одной петли для млекопитающих составляет в среднем обычно 40 – 50 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.). Возможно, что такой структурный домен является функциональной единицей. Доменная организация ДНК сохраняется, по всей видимости, также в интерфазном хроматине. Каждая петля имеет свое постоянное место прикрепления к остову хромосомы. Места прикрепления обрамляют транскрипционные единицы или группы (кластеры) генов.

В конденсированном состоянии каждый домен хроматина представляет собой, вероятно, компактную глобулу, которая занимает в метафазной

хромосоме четко определенное положение для каждого участка ДНК. При локализации определенных генов в метафазной хромосоме они всегда обнаруживаются в одном и том же участке. Регулярная организация метафазных хромосом подтверждается также тем, что окрашивание их различными красителями дает стандартную картину в виде чередующихся полос более или менее интенсивной окраски. Полученная при окрашивании характерная исчерченность является надежным тестом для идентификации отдельных хромосом.

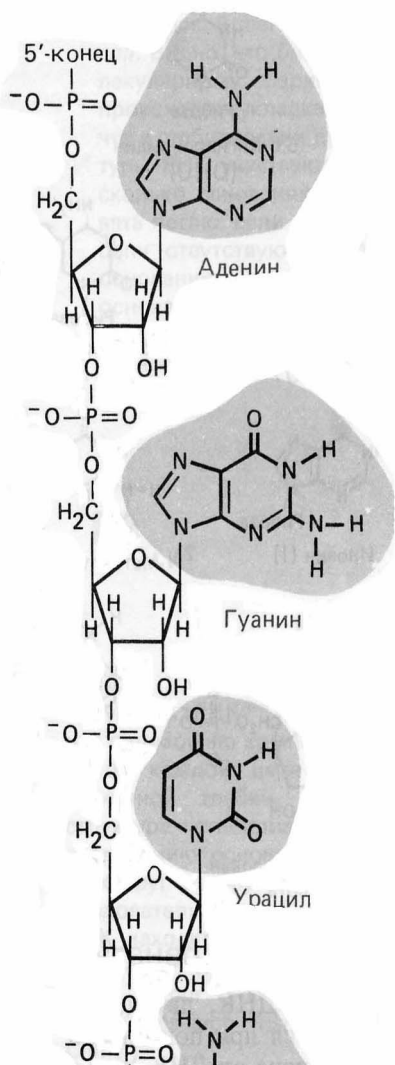
Благодаря последовательной конденсации хроматина метафазная хромосома, имеющая длину около 5 мкм, содержит ДНК длиной до 5 см, т.е. линейные размеры ДНК уменьшаются примерно в 10 тыс. раз.

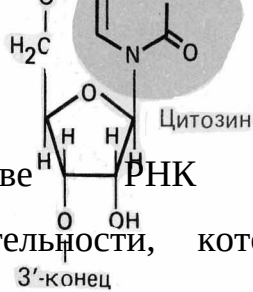
1.3. Структура РНК.

РНК, также как и ДНК является биополимером, состоящим из мономеров – нуклеотидов. В РНК углеводные остатки представлены рибозой, вместо тимина содержится урацил (рис. 4). Мономерные остатки также, как и в ДНК, связаны фосфодиэфирными связями. Концы молекулы также называют

3'- и 5'-концами цепи. На свойствах фосфодиэфирных связей сильно сказывается наличие или отсутствие ОН-группы при С2'-атоме рибозы. Так, межнуклеотидные связи в РНК значительно лабильнее, чем в ДНК

Большинство клеточных РНК – одноцепочечные молекулы, хотя некоторые вирусные геномы (в том числе геномы ретровирусов) представлены двухцепочечными РНК. В одиночных цепях все время образуются короткие внутримолекулярные двухцепочечные участки. Это связано с тем, что в





большинстве РНК имеются небольшие комплементарные последовательности, которые спариваются, образуя петли. В этих двухцепочечных участках аденин спаривается с урацилом, а гуанин с цитозином;

Рис. 4. Участок цепи РНК

Гуанин может образовать пару и с урацилом, но эта пара менее стабильна, чем стандартная пара GC, поскольку ее компоненты соединены двумя водородными связями, а не тремя. Двухцепочечные участки, 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.

Уже в ранних исследованиях макромолекулярной организации одноцепочечных РНК было установлено, что в физиологических условиях они характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, которая возникает за счет взаимодействия шпилькообразных элементов вторичной структуры. тРНК единственные представители природных РНК, которые удалось изучить методом рентгено-структурного анализа. Их вторичная структура в форме «клеверного листа» переходит в третичную L-структуру. Нет сомнения в том, что аналогичные принципы лежат в основе организации структуры всех одноцепочечных РНК.

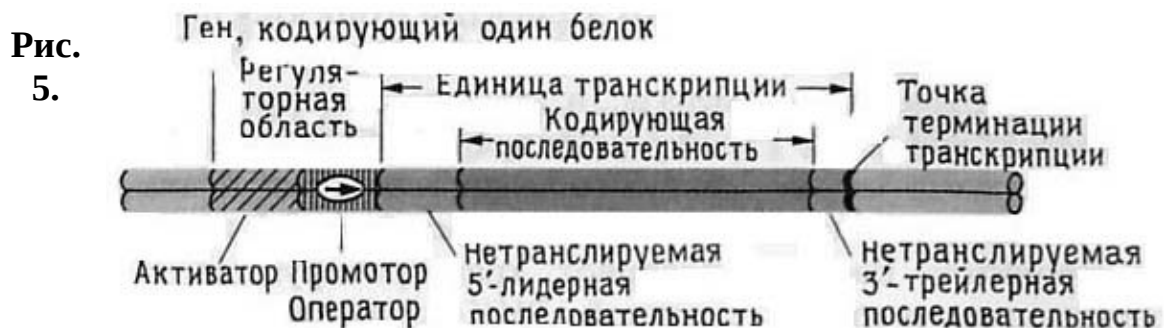
Глава II

Структура и организация генов и геномов про- и эукариот.

2.1. Структура генов прокариот.

Гены – это участки ДНК, детерминирующие последовательность мономерных звеньев в кодируемых ими полипептидах или полинуклеотидах. За последние годы представления о структуре генов кардинально изменились.

Информация, содержащаяся в генах, записана генетическим кодом. У всех организмов, за небольшим исключением, он одинаков. Одинаковы у всех клеток и принципы реализации генетической информации. В структуре любого гена запрограммированы два основных этапа его экспрессии. На первом этапе с помощью РНК-полимеразы синтезируется мРНК (транскрипция гена). Нуклеотидные последовательности, благодаря которым РНК-полимераза связывается с ДНК (промоторы) и отсоединяется от нее (терминаторы), располагаются в начале и конце гена соответственно. На втором этапе осуществляется синтез белка (трансляция). Генетические сигналы, обуславливающие этот процесс, также заложены в структуре генов: в начале и конце их белок-кодирующих областей стоят иницирующие и терминирующие кодоны.



Схематическое изображение прокариотического гена.

Гены прокариот включают промотор, белок кодирующую область и терминатор.

В состав промотора входят две консервативные последовательности. Одна из них (блок Хогнесса) необходима для узнавания, а другая (блок

Прибнова) – для тесного связывания промотора с РНК-полимеразой. Сигналами на завершение синтеза мРНК являются терминаторы транскрипции, расположенные в конце гена (рис. 5). Участок ДНК между сайтами, в которых начинается и заканчивается транскрипция, называется единицей транскрипции. Большая часть белок-кодирующих генов содержит различное число нуклеотидов, предшествующих белок-кодирующей последовательности (5'-лидер) или следующих за ней (3'-трейлер) (рис.5). В некоторых случаях в 5'-лидерную область входят последовательности, обеспечивающие дополнительный контроль транскрипции и трансляции.

Трансляция гена начинается с посадки рибосом на мРНК, что осуществляется благодаря наличию комплементарных последовательностей нуклеотидов на 3'-конце 16S рРНК и в лидерной части мРНК на расстоянии 4-8 нуклеотидов от кодона AUG, инициирующего синтез белка. Эту последовательность называют сайтом связывания рибосом или последовательностью Шайна-Далгарно. Она состоит из 5-9 нуклеотидов.

Белок-кодирующая часть мРНК (естественно, и самого гена) ограничена инициирующим (обычно – AUG, реже – GUG) и терминирующими (UAA, UAG и UGA) кодонами.

2.2. Структура эукариотических генов.

Строение и организация эукариотических генов значительно сложнее, чем у прокариот. Отчасти это обусловлено использованием трех разных систем транскрипции.

Гены класса I, кодирующие 5,8S-, 18S- и 28S-рРНК, транскрибируются РНК-полимеразой I. Все мРНК и ряд малых ядерных РНК (мяРНК) образуются при транскрипции генов класса II с участием РНК-полимеразы II. тРНК и некоторые малые цитоплазматические РНК (мцРНК) образуются при транскрипции генов класса III с участием РНК-полимеразы III.

Естественно, для инициации транскрипции с участием трех разных РНК-полимераз используются разные регуляторные последовательности, при этом они располагаются каждая на определенном расстоянии от точки начала

транскрипции. Кроме того, для РНК-полимеразы каждого типа требуются свои вспомогательные белки – факторы транскрипции, которые связываются с этими регуляторными последовательностями.

Рис.



6.

Структурные особенности типичного эукариотического гена, кодирующего белок.

Последовательности, которые определяют 3'-конец соответствующих функциональных РНК-продуктов (терминаторы) тоже уникальны для каждой полимеразной системы. Они зачастую многочисленны.

В отличие от прокариотических генов, почти всегда коллинеарных своим РНК, многие гены эукариот имеют мозаичное строение, т.е. у них чередуются кодирующие (экзоны) и не кодирующие (интроны) последовательности в пределах единицы транскрипции (рис.6). Интроны чаще всего встречаются в генах, кодирующих белки и тРНК, и реже в генах рРНК. За исключением некоторых генов, кодирующих пять гистонов, интерфероны и белки некоторых вирусов млекопитающих, все гены, кодирующие белки позвоночных, содержат интроны. Редко встречаются интроны в генах дрожжей, отсутствуют почти во всех генах *Drosophila*. Интроны присутствуют также во многих растительных генах.

Размеры, число и местоположение интронов у разных генов различны. Тем не менее, сходные гены у организмов разных видов часто имеют одинаковое число интронов в одних и тех же позициях, хотя длина и нуклеотидная последовательность интронов могут заметно различаться. Обычно число интронов на ген возрастает пропорционально длине последовательности, кодирующей белок, а размеры экзонов в среднем

составляют около 300 п.н. В целом общая длина последовательностей интронов превышает суммарную длину экзонов обычно от двух до десяти раз, а иногда и больше.

Таким образом, к сегментам ДНК, составляющим ген, относятся:

1. Единица транскрипции, которая представляет собой протяженный участок ДНК, кодирующий последовательность первичного транскрипта; в нее входят а) последовательность, кодирующая либо зрелую РНК, либо белковый продукт; б) интроны; в) 5'-лидерная и 3'-трейлерная последовательности, которые присутствуют в зрелых мРНК, а также промежуточные последовательности (спейсеры), которые удаляются в ходе процессинга первичных транскриптов генов, кодирующих РНК.
2. Минимальные последовательности, необходимые для начала правильной транскрипции (промоторы) и для образования правильного 3'-конца зрелой РНК.
3. Последовательности, регулирующие частоту инициации транскрипции; к ним относятся последовательности, ответственные за индуцибельность и репрессию транскрипции, а также клеточную, тканевую и временную специфичность транскрипции. Эти области так разнообразны по строению, положению и функциям, что для них трудно найти одно простое и емкое название. К их числу относятся энхансеры и сайленсеры – последовательности, которые оказывают дистанционное влияние на инициацию транскрипции независимо от своей ориентации относительно точки начала транскрипции.

На рис. 6 представлены основные структурные особенности эукариотического гена, кодирующего белок. Начало гена на этом рисунке находится слева, а конец – справа в соответствии с общепринятым соглашением, по которому транскрипция идет слева направо. Положение первого нуклеотида транскрипта обозначают числом +1, а нуклеотидов,

расположенных справа от него большими положительными числами. Нуклеотиды, находящиеся слева от +1, обозначаются отрицательными числами.

2.3. Организация генома прокариот.

2.3.а. Особенности организации прокариотических генов.

У *E. coli* гены, кодирующие белки одного и того же метаболического пути или определяющие близкородственные функции, часто регулируются согласованно. Это значит, что их экспрессия начинается и заканчивается или согласованно продолжается в ответ на один и тот же регуляторный сигнал. Гены, подчиняющиеся согласованной регуляции, в геноме часто бывают сцеплены и транскрибируются с промотора, находящегося на 5'-конце такой группы генов (кластера), в виде единственной молекулы РНК, называемой полицистронным транскриптом. Группа координированно экспрессирующихся генов называется опероном (рис. 7). Три гена,

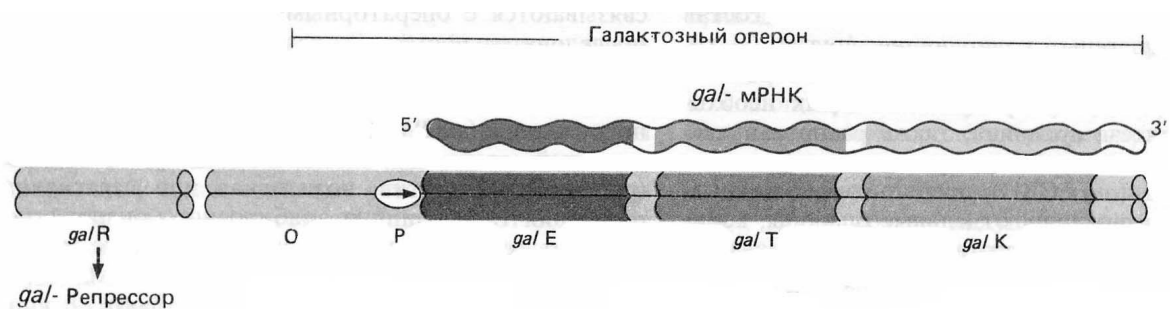


Рис. 7. Галактозный оперон *E. coli*

кодирующие ферменты, ответственные за метаболизм галактозы у *E. coli*, организованы в оперон с промотором (P) и примыкающим к нему регуляторным сегментом – оператором (O) на 5'-конце транскрибируемой последовательности.

Как правило, отдельные опероны, кодирующие родственные функции, имеют одинаковые или сходные регуляторные последовательности и поэтому реагируют на определенный регуляторный сигнал сходным образом.

2.3.б. Позитивная и негативная регуляция.

Активность многих промоторов регулируется с помощью особых белков-регуляторов, которые присоединяются к определенным участкам ДНК и либо мешают, либо помогают РНК-полимеразе инициировать синтез РНК. В первом случае говорят о негативной, а во втором – о позитивной регуляции активности промотора.

Белки, осуществляющие негативную регуляцию, называются репрессорами. Места их связывания на ДНК называются операторами (рис.5). Способность многих репрессоров связываться со своими операторами зависит от низкомолекулярных лигандов – эффекторов. Эффекторы, снижающие сродство репрессора к оператору, называются индукторами. В отсутствие индуктора репрессор связывается с оператором и мешает РНК-полимеразе начинать синтез РНК с промотора (промотор репрессирован). В комплексе с индуктором репрессор теряет способность связываться с оператором, в результате чего промотор активируется (индуцируется). Другие репрессоры, наоборот, могут связываться с оператором только в комплексе с эффектором (который в этом случае называется корепрессором). В присутствии корепрессора промотор неактивен (репрессирован), в отсутствие корепрессора активируется (дерепрессируется).

Белки, осуществляющие позитивную регуляцию, называются активаторами. Ряд белков-регуляторов могут выступать как в роли репрессора, так и в роли активатора.

Простейший механизм репрессии заключается в стерическом блокировании репрессором присоединения РНК-полимеразы к промотору. Такой механизм имеет место в тех промоторах, в которых участок связывания репрессора перекрывается с участком связывания РНК-полимеразы. Простейший механизм активации заключается в том, что белок-активатор присоединяется к промотору рядом с РНК-полимеразой и за счет непосредственного контакта с ней облегчает образование открытого промоторного комплекса.

2.4. Геном эукариот.

Точно так же, как различается строение эукариотических генов и генов прокариот, различается и организация геномов этих двух типов организмов. В бактериальном геноме гены почти непрерывно следуют один за другим по всей длине молекулы ДНК, а в некоторых случаях даже перекрываются. Гены, кодирующие ферменты одного метаболического пути, часто образуют одну единицу транскрипции (оперон). Это способствует наиболее эффективному использованию нуклеотидной последовательности ДНК. Но, по-видимому, для эволюции эукариот принцип экономии был не столь важен, как для эволюции прокариот. Не говоря уже о том, что большую часть ДНК занимают интроны, эукариотические гены разделены длинными некодирующими участками. Большое число генов в одной единице транскрипции встречается редко. Эукариотические геномы содержат гораздо больше ДНК, чем это представляется необходимым. В основном геномы млекопитающих и растений содержат в 20 – 50 раз больше ДНК, чем необходимо для кодирования генов. Существование «избыточной» ДНК отчасти можно объяснить тем, что в геноме имеются интроны и протяженные участки ДНК между генами – межгенные спейсеры.

Большой размер генома эукариот может объясняться и тем, что некоторые гены встречаются в геноме много раз. Свой вклад в «избыточную» ДНК вносят также нефункциональные копии генов, называемые псевдогенами.

Большой размер эукариотических геномов обусловлен также наличием в них множества повторяющихся последовательностей ДНК с неизвестными функциями. На их долю приходится обычно 10%, а в некоторых случаях почти 50% генома. При помощи кинетического анализа реассоциации денатурированной эукариотической ДНК было показано, что значительная часть ДНК ренатурирует гораздо быстрее, чем можно было бы ожидать для уникальных последовательностей ДНК. Высокая скорость реассоциации

говорит о том, что такие геномы содержат фрагменты, повторяющиеся от сотен тысяч до миллионов раз. В настоящее время с помощью молекулярного клонирования и секвенирования подтверждено существование таких последовательностей ДНК с большим числом повторов, которые могут располагаться либо тандемно, либо изолированно друг от друга среди неродственных геномных локусов.

По скорости реассоциации ДНК эукариот разделяется на три фракции: быстро реассоциирующие (к ним относится высокоповторяющаяся или сателлитная ДНК), фракции со средней скоростью реассоциации (умеренно повторяющаяся ДНК) и медленно реассоциирующая ДНК (уникальные последовательности).

Фракция ДНК, включающая высокоповторяющиеся геномные последовательности, функционально и структурно обособленная часть генома, представленная сателлитными ДНК. В их составе имеются повторы из нескольких нуклеотидов. Главная повторяющаяся единица сателлитных ДНК называется базовой последовательностью и может состоять из 3 – 7 или даже из нескольких сотен нуклеотидов.

К классу умеренно повторяющихся относят последовательности, представленные в геноме десятками и сотнями копий. К ним относятся семейства генов, построенные из сгруппированных тандемно повторяющихся копий. Это гены гистонов, тРНК и рРНК. В целом они составляют несколько процентов от всей геномной РНК. К ним также относятся мобильные генетические элементы (МГЭ) разной природы. На их долю приходится значительная часть генома – 10-20%.

Уникальные последовательности генома содержат не только гены, кодирующие белки, но и последовательности ДНК, расположенные между генами и интроны.

2.5. Геномы органелл.

Отличительная особенность клеток эукариот состоит в том, что часть генетической информации у них заключена в молекулах, находящихся вне

хромосом, локализованных в ядрах. Существуют два типа таких цитоплазматических ДНК: один находится в митохондриях эукариот, другие – в хлоропластах зеленых растений и водорослей. Как и все цитоплазматические элементы, они наследуются по материнской линии, а не по законам Менделя.

Большинство белков, из которых построены функциональные и структурные компоненты митохондрий и хлоропластов, кодируются хромосомной ДНК, синтезируются на рибосомах в цитоплазме и транспортируются в соответствующие органеллы. Однако несколько белков кодируются неядерной ДНК и синтезируются на особых рибосомах органелл.

Многие митохондриальные геномы представляют собой замкнутые кольцевые сверхспиральные дуплексные ДНК. Митохондрии некоторых грибов и простейших имеют линейные геномы.

Геномы митохондрий существенно различаются по размеру. У животных они относительно малы и обычно не превышают 20 т.п.н. Однако дрожжевые митохондриальные ДНК состоят из примерно 80 т.п.н. Митохондриальные ДНК млекопитающих организованы весьма рационально, и между генами почти нет промежутков.

Митохондриальная ДНК эволюционирует гораздо быстрее, чем ядерная, и мутации в ней происходят в десять раз чаще. В результате возникает широкий внутривидовой полиморфизм. У млекопитающих большинство генов, кодирующих РНК или белки, разделены одним или более тРНК-генами. Промежутки между генами, как правило, не превышают 25 п.н. Обе цепи всего митохондриального генома транскрибируются с образованием одной молекулы РНК специфической митохондриальной РНК-полимеразой. Ни один из генов не содержит интронов.

Особенность трансляции у митохондрий состоит в использовании необычных кодонов для инициации и терминации трансляции, а также для кодирования некоторых аминокислот. Необычному генетическому коду соответствует специфическое семейство тРНК.

Еще одной необычной особенностью митохондриальных геномов является наличие рибонуклеотидов вместо дезоксирибонуклеотидов. Возможно, это остатки РНК-праймеров. Т.о. синтез митохондриальной ДНК некорректен.

Геном хлоропластов в чем-то сходен с геномом митохондрий. Он представляет собой кольцевую ДНК и имеет достаточно большую длину: как правило, 120-180 т.п.н. При этом каждый хлоропласт может содержать десятки копий хлоропластного генома. Структура ДНК хлоропластов в пределах вида остается довольно консервативной. Скорость эволюции кодирующих последовательностей хлоропластных генов значительно ниже скорости эволюции ядерных генов. Всего хлоропластная ДНК кодирует примерно 100 полипептидов и 35 РНК. ДНК хлоропластов использует универсальный генетический код. Гены содержат интроны.

Глава III

Мобильные генетические элементы.

Изменчивость как эу-, так и прокариотических организмов связана не только с точечными мутациями, хромосомными перестройками или рекомбинационными событиями, но и с мобильными генетическими элементами (МГЭ) – сравнительно автономными сегментами ДНК, способными встраиваться в геном клетки-хозяина и вырезаться из него. К МГЭ можно отнести и некоторые вирусы – в этом случае возможно перемещение не только в пределах генетического материала одной клетки, но и между клетками.

3.1. Мобильные генетические элементы прокариот.

У бактерий перенос генетической информации между клетками могут осуществлять не только вирусы, но и плазмиды, многие из которых могут встраиваться в различные участки генома клетки-хозяина и поэтому тоже могут быть отнесены к МГЭ. Плазмиды – это двухцепочечные кольцевые ДНК размером от 5 до 0,1% размера хромосомы, несущие гены, не обязательные для клетки-хозяина, или гены, необходимые лишь в определенной среде. Для своей репликации плазмиды используют репликативную систему клетки-хозяина, однако репликация плазмид зачастую происходит независимо от хромосомы. Каждая плазида является самостоятельным репликоном, сама контролирует собственную репликацию и поддерживается в клетке в определенном, характерном для нее числе копий.

Некоторые бактериальные плазмиды способны передаваться из одной клетки в другую, иногда даже в клетку другого вида.

Еще одним типом бактериальных МГЭ являются IS-элементы. Это сегменты ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка локализации в другой. IS-элементы содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения – транспозиции. Кроме того, IS-элементы имеют особую последовательность на концах, как правило,

инвертированные повторы. При встраивании в новую последовательность ДНК IS-элементы вызывают небольшую дупликацию.

Транспозонами называют сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но содержащие гены, не имеющие непосредственного отношения к транспозиции. Транспозоны могут нести гены устойчивости к антибиотикам, гены токсинов или гены дополнительных ферментов клеточного метаболизма. Транспозон может быть устроен также, как IS-элемент, но с дополнительным геном. Но часто два IS-элемента, оказавшиеся поблизости друг от друга, способны перемещаться вместе, одновременно перенося заключенный между ними сегмент ДНК. Таким образом, два расположенных рядом IS-элемента могут образовать транспозон.

Транспозоны и IS-элементы ответственны за целый ряд генетических явлений у бактерий. Встраивание МГЭ в какой-либо ген может привести к его инактивации. Кроме того, некоторые из них вызывают генетическую нестабильность поблизости от места своей локализации. МГЭ способны также вызывать транслокации, делеции и инверсии.

И плазмиды, и МГЭ обладают сравнительной автономией от основной массы генетического материала, и поэтому их можно рассматривать как своего рода организмы, обитающие в особой, генетической среде. Таким образом, плазмиды, IS-элементы и транспозоны можно рассматривать как «эгоистическую» ДНК, обеспечивающую в первую очередь собственное размножение. В этом смысле они непосредственно примыкают к вирусам, «эгоистические» тенденции которых очевидны.

Хотя многие свойства МГЭ и плазмид разумно рассматривать с точки зрения концепции эгоистичной ДНК, они играют существенную позитивную роль в жизни бактерий-хозяев, даже если они не приносят непосредственной пользы. Дело в том, что они служат важнейшими факторами генетической изменчивости и эволюции бактерий.

3.2. Мобильные генетические элементы эукариот.

Существенную часть генома эукариот (10-20%) составляют повторяющиеся последовательности ДНК (см. гл. II). Критерием для отнесения фрагментов генома к числу подвижных часто служит лишь локализация по их флангам коротких прямых повторов из нескольких пар нуклеотидов, появляющиеся в результате их транспозиции. Функциональная роль их неясна, но, во всяком случае, они в значительной степени определяют, как и у прокариот, изменчивость генома и, следовательно, могут играть большую роль в эволюции генома.

Многие спонтанные мутации эукариот обусловлены внедрением МГЭ. Частота таких перемещений невелика – 10^{-4} - 10^{-5} в расчете на ген в одном поколении. Положение мобильного элемента может сохраняться неизменным в данном сайте генома, в таком случае их можно рассматривать как мобильные лишь в эволюционном масштабе времени. Однако в клетке могут возникать условия, определяемые как внутренними генетическими факторами, так и внешней средой, когда может резко увеличиться частота транспозиций. Это может приводить к существенным геномным перестройкам, которые могут сказываться на эволюционной судьбе организмов.

Выделяют ряд классов подвижных элементов эукариот на основе различий их молекулярной структуры и способности к перемещениям.

Существенная часть генома эукариот, особенно млекопитающих (до 10%), образовалась в результате интеграции в геном фрагментов ДНК, синтезированных на РНК-матрицах в результате обратной транскрипции. В геноме млекопитающих, птиц, амфибий и насекомых обнаруживаются ретропозоны, представляющие собой внедрившиеся в геном ДНК-копии, синтезированные на разных типах клеточных РНК как на матрицах. Таким образом, наряду с переносом информации от ДНК к РНК, осуществляется и обратный процесс – возвращение ее в геном в виде ретропозонов. К ретропозонам относятся и псевдогены – испорченные копии нормальных генов, лишенные регуляторных последовательностей и интронов, что

говорит о том, что они были копией процессированной мРНК внедрившейся в геном. Псевдогены представлены в геноме разным числом копий, они ограничены короткими прямыми повторами, появившимися в результате их внедрения в ДНК.

Основная масса повторяющихся элементов позвоночных представлена огромным числом копий – десятками или сотнями тысяч, образовалась в результате ретропозиции ДНК-копий клеточных РНК, матрицами для которых послужили полиаденилированные РНК, кодирующие белки неизвестной природы, а также аномально процессированные клеточные транскрипты тРНК, 7SPНК и UРНК. Особенно богаты такими повторами геномы высших эукариот – млекопитающих.

Другой большой класс подвижных элементов составляют ретротранспозоны, сходные по своей структуре с проретровирусами, которые внедряются в геном, используя механизмы обратной транскрипции. Эти элементы содержат «тело» размером 5-8 т.п.н., ограниченное прямыми длинными концевыми повторами. Число копий таких элементов, принадлежащих к одному семейству, достаточно постоянно для вида, но варьирует от нескольких копий до сотен тысяч копий в зависимости от типа ретротранспозона. Ретротранспозоны обычно ведут себя как стабильно наследуемые гены, однако определенные воздействия окружающей среды могут индуцировать их перемещения.

Есть в геномах эукариот и подвижные элементы, сходные с транспозонами прокариот. Их отличительной особенностью является наличие инвертированных повторов на флангах. Примерами их могут служить Р-элементы дрозофилы и Ас-элементы кукурузы.

В целом МГЭ эукариот представляют собой чрезвычайно разнородную популяцию с самыми разными функциями. Однако существует представление о том, что они не несут никакой функции, т.е., как правило, не влияют на фенотип организма и размножаются в геноме лишь благодаря особенностям своей структуры, в результате чего они постепенно заселяют

геном. Предполагается, что они составляют фракцию эгоистичной ДНК, размножение которой ограничивается естественным отбором.

3.3. Вирусы.

Некоторые вирусы в определенной степени также можно рассматривать как подвижные элементы, способные к самостоятельному существованию. Вирусная частица состоит из молекулы нуклеиновой кислоты, заключенной в белковую оболочку (капсид). У некоторых более сложных вирионов капсид окружен липидным бислоем с погруженными в него белками. После того как вирион проникает в клетку, он утрачивает белковую оболочку, и начинается направляемый вирусным геномом процесс образования новых вирусных частиц.

Вирусный геном может быть представлен молекулами ДНК или РНК, линейными либо кольцевыми. У разных ДНК-содержащих вирусов геном может иметь молекулы разных типов. Это кольцевые дву- и однонитевые молекулы, линейные двухнитевые. Геномы почти всех известных РНК-содержащих вирусов – это линейные молекулы, которые в среднем короче вирусных ДНК-геномов. Самые крупные могут достигать длины до 28 т.н. Известные двухнитевые РНК-геномы всегда сегментированы, т.е. состоят из нескольких разных молекул.

Одни вирусы, реплицируясь в хозяйских клетках, приводят к их гибели. Другие встраиваются в ДНК клетки-хозяина, трансформируя клетку, и постоянно присутствуют в таком виде в инфицированной клетке и в ее потомках.

Ретровирусы – это обширная группа вирусов, представители которой различаются как по биологическим свойствам, так и по морфологии. Тем не менее, их геномы имеют следующие общие черты. 1. Вирусная РНК – одноцепочечная молекула длиной до десяти тысяч нуклеотидов. 2. В молекулах РНК есть прямой концевой повтор длиной несколько десятков

нуклеотидов. 3. В вирусной РНК записана информация для синтеза трех групп специфических белков: структурных белков сердцевины вириона, ферментативных белков, принимающих участие в обратной транскрипции и интеграции вирусного генома, и белков, входящих в состав наружной оболочки вируса.

Особый интерес представляют так называемые онкогенные вирусы. Это РНК-содержащие ретровирусы. Геном многих онкогенных вирусов содержит сегменты, отличные от обычных вирусных генов. Эти сегменты представляют собой модифицированные клеточные гены, которые обуславливают способность многих ретровирусов индуцировать образование опухолей. Они называются вирусными онкогенами (v-onc). Каждый v-onc кодирует белки, которые в том случае, когда они синтезируются в клетке, обуславливают ее опухолевый фенотип. Нормальные клеточные гены, от которых произошли v-onc, называются протоонкогенами. Обычно протоонкогены не приводят к образованию раковых клеток. Другое дело, если при включении в вирусный геном происходит их модификация.

Глава IV

Ферменты.

Основная роль в функционировании нуклеиновых кислот принадлежит ферментам. В зависимости от выполняемых функций ферменты делятся на ряд групп.

Полимеразы. ДНК-полимераза осуществляет копирование матрицы в процессе репликации. Первый фермент этого типа был открыт в 1956 г. ДНК-полимеразы ведут синтез ДНК на одноцепочечной матрице, если имеется затравка – комплементарный матрице фрагмент растущей цепи. ДНК-полимеразы последовательно наращивают конец затравки, присоединяя к нему следующие нуклеотиды по принципу комплементарности. Для того, чтобы обеспечить высокую точность наряду с высокой скоростью репликации, природе пришлось прибегнуть к специальным механизмам, один из которых – механизм коррекции.

ДНК-полимеразы проверяют комплементарность каждого нуклеотида дважды: один раз перед включением его в состав растущей цепи и второй раз перед тем, как включить следующий нуклеотид. Очередной нуклеотид присоединяется лишь в том случае, если последний нуклеотид затравки комплементарен матрице. Если же на предыдущей стадии произошла ошибка, то репликация останавливается до тех пор, пока неправильный нуклеотид не будет удален. Т.о. ДНК-полимеразы не способны инициировать новые цепи, они могут лишь достраивать уже имеющуюся затравку.

Новосинтезированные цепи ДНК всегда содержат на 5'-конце несколько рибонуклеотидов, т.е. синтез ДНК начинается с синтеза РНК. РНК-затравку для синтеза ДНК образует специальный фермент, называемый

праймазой . Праймаза может быть отдельным ферментом или входить в качестве субъединицы в ДНК-полимеразу.

Транскрипцию генов рРНК, тРНК и большинства генов, кодирующих белки, обеспечивают молекулы **РНК-полимеразы**. У прокариот имеется только одна РНК-полимераза, а у эукариот – три разных РНК-полимеразы в соответствие с тремя классами генов (см. гл. II). РНК-полимеразы – это сложные молекулы, состоящие из нескольких субъединиц. Наибольшей сложностью отличаются эукариотические РНК-полимеразы. Особые РНК-полимеразы обеспечивают транскрипцию клеточных органелл эукариот – митохондрий и хлоропластов.

Обратные транскриптазы (РНК-зависимые ДНК-полимеразы). Эти ферменты были выделены из РНК-содержащих онкогенных вирусов. Они позволяют синтезировать ДНК на РНК-матрице. Реакция, катализируемая обратными транскриптазами, аналогична стандартным реакциям с участием ДНК-полимераз и нуждается в затравке. В качестве матрицы обычно используется одна цепь РНК, на которой синтезируется комплементарная цепь ДНК. В результате образуется гибридная молекула ДНК-РНК.

Терминальная трансфераза. Катализирует синтез одноцепочечной ДНК. Подобно ДНК-полимеразам, она не способна инициировать синтез новой цепи и нуждается в затравке. Однако в отличие от истинных ДНК-полимераз она не нуждается в матрице и не способна что-либо копировать вообще. Продукт полимеризации соответствует использованному субстрату. Продуктом ее синтеза является одноцепочечный полимер.

Poly(A)-полимераза подобно терминальной трансферазе присоединяет нуклеотидные остатки к 3'-концу цепи без участия матрицы. Однако она проявляет специфичность в отношении РНК. Субстратом является только АТФ.

Теломераза. Этот фермент может строить теломеры, при этом родительская ДНК не используется в качестве матрицы. Теломераза – это крупный рибонуклеопротеиновый комплекс; для проявления

ферментативной активности необходимы как РНК, так и белки. Теломеразная РНК служит матрицей для синтеза ДНК теломер. Белковый компонент выступает как обратная транскриптаза.

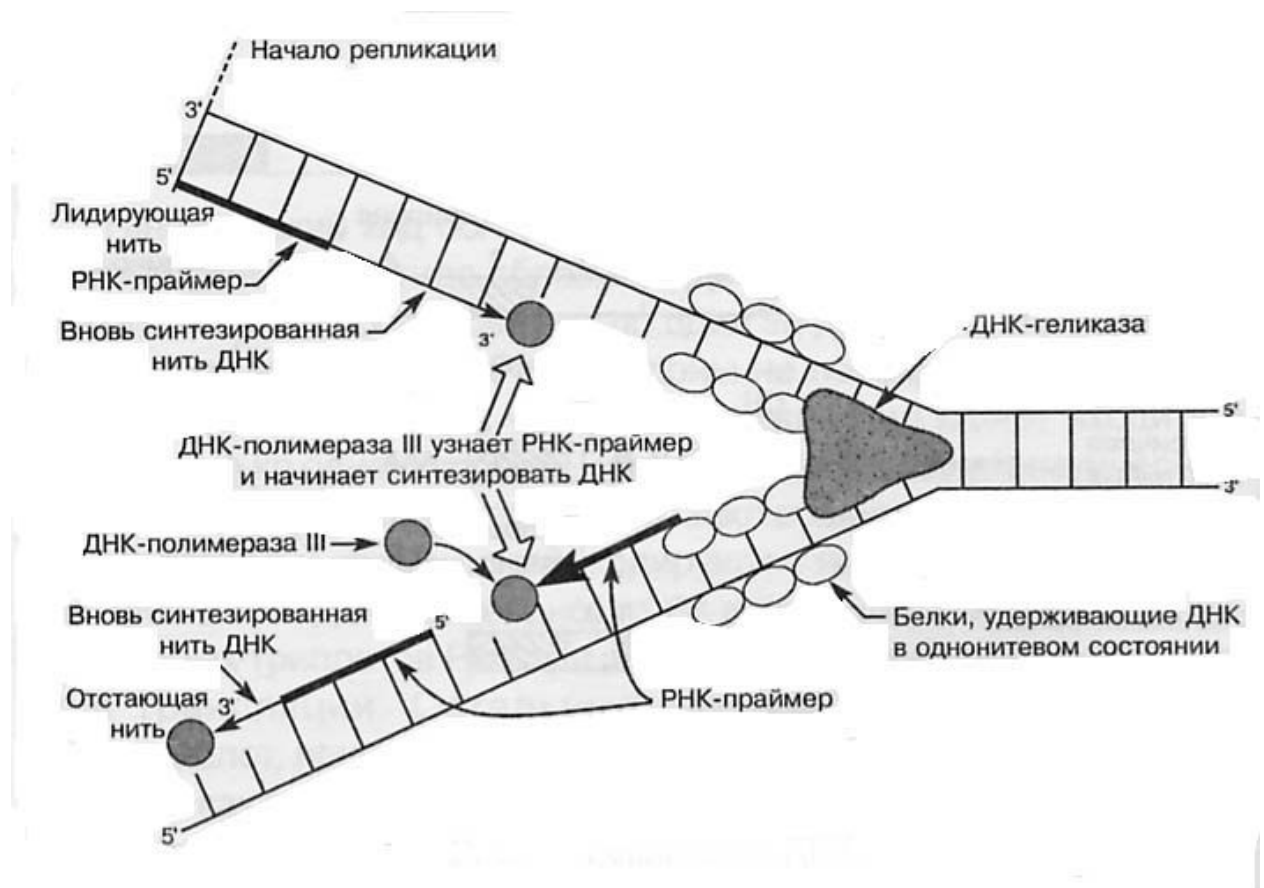
Нуклеазы. Эти ферменты позволяют специфическим образом модифицировать молекулы ДНК и РНК и расщеплять их. Нуклеазы специфичны в отношении субстрата, могут действовать и на одноцепочечные, и на двухцепочечные молекулы. Нуклеазы делятся на **эксонуклеазы** и **эндонуклеазы**. Экзонуклеазы расщепляют полинуклеотидные субстраты, имеющие свободные концы. Эндонуклеазам свободные концы не требуются, поэтому данные ферменты могут гидролизовать кольцевые молекулы. Разрезание осуществляется по внутренним фосфодиэфирным связям, при этом образуются фрагменты разной длины.

Лигаза производит ковалентное сшивание молекул ДНК и/или РНК, катализируя образование фосфодиэфирных связей. ДНК-лигаза фага Т4 способна сшивать и двухцепочечные молекулы.

ДНК-топоизомеразы – эти ферменты изменяют степень сверхспирализации и тип сверхспирали. Они создают условия для непрерывного движения репликативной вилки, обеспечивают разделение сцепленных кольцевых ДНК и устранение узлов и спутанных клубков из длинной линейной ДНК путем внесения одноцепочечного разрыва. Топоизомеразы являются также неотъемлемыми участниками некоторых рекомбинационных процессов. 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. Одиночная цепь спонтанно проходит через разрез.

Глава V. Репликация.

Модель ДНК Уотсона и Крика сразу же позволила понять принцип удвоения ДНК. Поскольку каждая из цепей ДНК содержит последовательность нуклеотидов, комплементарную другой цепи, то при удвоении ДНК цепи расходятся, а затем каждая цепь служит матрицей, на которой выстраивается комплементарная ей новая цепь ДНК. В результате образуются два дуплекса ДНК, каждый из которых состоит из одной цепи исходной родительской молекулы ДНК и одной новосинтезированной цепи. Это полуконсервативный способ репликации. Несмотря на простоту



основного принципа, процесс репликации сложно организован и требует участия множества белков.

Поскольку ДНК двухспиральна, то перед репликацией цепи родительской молекулы должны быть расплетены. Эту реакцию осуществляют белки хеликазы и SSB- белки (рис. 8). SSB-белки расправляют и удерживают ДНК в одноцепочечном состоянии.

Т.к. цепи ДНК в дуплексе антипараллельны, то очевидно, что направление расплетания двойной цепи спирали при репликации совпадает с направлением синтеза ДНК лишь для одной матричной цепи. Это значит, что лишь на одной из матричных цепей синтез может происходить непрерывно. На второй матрице ДНК синтезируется сравнительно короткими фрагментами, называемыми фрагментами Оказаки. Новосинтезированная цепь, которая синтезируется непрерывно, называется ведущей, другая цепь называется запаздывающей. Каждый фрагмент Оказаки имеет на своем 5'-конце затравку. У бактерий фрагмент Оказаки имеет длину около 1000 нуклеотидов, у эукариот они короче, порядка 100 нуклеотидов. Через некоторое время после синтеза затравки удаляются, бреши застраиваются ДНК-полимеразой, а фрагменты сшиваются в одну непрерывную цепь ДНК специальной лигазой. Синтез второй цепи ДНК всегда ведут ДНК-полимеразы.

Начавшийся процесс репликации хромосомы бактерий продолжается до тех пор, пока не удвоится вся ДНК. В этом смысле бактериальная хромосома представляет собой единицу репликации – репликон. Репликация каждого репликона начинается в одной избранной области ДНК, называемой *ori*-сайтом, или сайтом начала репликации. Этот сайт имеет определенную последовательность ДНК. В результате инициации раунда репликации образуются одна или две репликативные вилки. Если возникают две репликативные вилки, то идет двунаправленная репликация.

Последовательность *ori*-сайта способствует необходимому для начала синтеза ДНК расплетанию двойной спирали и служит участком сборки, «посадки» на ДНК активного комплекса белков, осуществляющих репликацию.

Эукариотические геномы, как правило, значительно больше бактериальных, а скорость синтеза ДНК у эукариот, напротив, существенно ниже (несколько десятков нуклеотидов в секунду). Видимо, по этой причине инициация синтеза ДНК у эукариот происходит во многих разных точках хромосомы, т.е. эукариотические хромосомы имеют полирепликонную организацию. Характерный размер репликона высших эукариот – около 100 000 п.о. Инициация также происходит на специфических *ori*-сайтах.

Инициация репликации строго регулируется. Полирепликонная организация требует, чтобы в каждом цикле клеточного деления каждый *ori*-сайт «сработал» только один раз, в противном случае на хромосоме образуются разветвленные структуры. У высших эукариот достаточно протяженные участки хромосом, содержащие несколько соседних репликонов, начинают синтез ДНК в S-фазе приблизительно одновременно, но каждый такой участок имеет характерное для него время инициации репликации: одни активируются в начале S-фазы, другие – позже, третьи – в конце. В этом случае особенно ясно видно, что существует запрет на повторную инициацию репликации в том же цикле клеточного деления, хотя одновременно может происходить инициация на других, не сработавших ранее точках начала репликации. Возможно, что подобный запрет снимается в ходе митоза. Нарушение запрета на повторную инициацию, которая очень редко, но все же происходит, приводит к амплификации того или иного участка хромосомы.

Глава VI

Репарация. Рекомбинация.

Видимо, уже на ранних стадиях эволюции ДНК заменила РНК в качестве носителя генетической информации. Этому должны были

способствовать большая химическая устойчивость ДНК, связанная с заменой рибозы на дезоксирибозу, и двухцепочечное строение, «скрывающее» целый ряд реакционноспособных группировок. Но, несмотря на свои «преимущества», ДНК постоянно подвергается химическим изменениям, как спонтанным, так и индуцированным мутагенами и даже клеточными метаболитами. Еще одна обычная причина повреждений ДНК – радиация и ультрафиолетовое облучение. Большинство происходящих с ДНК изменений недопустимы: они либо приводят к вредным мутациям, либо блокируют репликацию ДНК и вызывают гибель клеток. Поэтому все клетки имеют специальные системы исправления повреждений, репарации ДНК. Нарушение этих систем губительно.

Принципы репарации ДНК у различных организмов сходны. Ряд повреждений клетка удаляет из ДНК путем **прямой реактивации**. Таким образом исправляются алкилированные азотистые основания. К этому же типу репарации относится и удаление тиминовых димеров на свету. Другие виды репарации ультрафиолетовых повреждений ДНК называют **темновой репарацией**, чтобы отличить от прямой фотореактивации.

Если невозможна прямая реактивация, работают механизмы **эксцизионной репарации**, удаляющие из ДНК нарушенные участки. При этом типе репарации специальные эндонуклеазы производят разрез одной цепи ДНК вблизи места повреждения. Далее экзонуклеазы удаляют поврежденный участок. Образовавшуюся брешь заполняет ДНК-полимераза, а остающийся разрыв сшивает ДНК-лигаза. Видно, что эксцизионная репарация всегда использует один и тот же принцип: нарушенный участок ДНК удаляется, а затем восстанавливается на матрице ненарушенной комплементарной цепи ДНК.

Индукцируемая репарация. В условиях, увеличивающих количество повреждений ДНК, происходит индукция дополнительных репаративных ресурсов клетки. У бактерий индуцируемая репарация используется лишь в тех случаях, когда повреждений в ДНК становится настолько много, что это

начинает угрожать клетке гибелью. Поэтому индуцируемая система репарации называется **SOS-репарацией**. Степень индукции SOS-системы определяется количеством повреждений. Степень индукции SOS-системы в определенном смысле отражает «благополучие» клетки и ее шансы на выживание. Поэтому некоторые умеренные бактериофаги используют индукцию SOS-системы в качестве сигнала для размножения и уничтожения клетки-хозяина.

Дублирование информации в двух комплементарных цепях ДНК не позволяет безошибочно исправлять все типы повреждений. Описанные механизмы репарации не могут справиться с такими нарушениями структуры ДНК, как ковалентные межнитевые сшивки, которые могут возникать под действием ряда мутагенов, или двухцепочечные разрывы ДНК. Такие повреждения могут репарироваться только при наличии гомологичной неповрежденной молекулы ДНК, т.е. рекомбинационным путем.

Рекомбинация. Рекомбинацией в общем смысле слова можно назвать возникновение новых последовательностей ДНК за счет разрывов и перевоссоединений предсуществующих молекул. Различают несколько типов рекомбинации.

Общая или **гомологичная рекомбинация** характерна для всех живых организмов от вирусов и бактерий до многоклеточных эукариот. При гомологичной рекомбинации происходит обмен участками между гомологичными, т.е. очень похожими по последовательности, молекулами ДНК. К общей рекомбинации относится обмен между гомологичными участками хромосом в мейозе у эукариот. Гомологичная рекомбинация не создает принципиально новых последовательностей, а перетасовывает уже имеющиеся сходные варианты одной и той же последовательности.

Одна из ролей гомологичной рекомбинации состоит в репарации повреждений, с которыми не могут справиться описанные выше системы репарации. Такие повреждения возникают, например, когда репликативная вилка проезжает через поврежденный участок ДНК до того, как

репаративные системы успели устранить повреждение. В этом случае получается, что одна из цепей ДНК дефектна, а комплементарная цепь не могла быть синтезирована из-за дефекта в матрице и поэтому напротив поврежденного участка остается незастроенная брешь. Единственный способ безошибочной репарации такого повреждения – это использовать в качестве эталона второй, полученный при репликации дуплекс ДНК, т.е. использовать рекомбинацию для репарации повреждений. Такой способ репарации называется пострепликативной репарацией.

Сайт-специфическая рекомбинация – это рекомбинация, которая в отличие от гомологичной не требует протяженных участков гомологии, но для протекания которой необходимы строго определенные последовательности ДНК и специальный ферментативный аппарат. В каждом конкретном случае сайт-специфическая рекомбинация выполняет свою частную функцию, последовательности ДНК для каждого случая также различны, отличаются и ферменты. Но в общих чертах механизм сайт-специфической рекомбинации всегда одинаков. Эта рекомбинация используется при интеграции ряда вирусов в хромосому клетки-хозяина, та же система используется и рядом плазмид, рекомбинационный механизм используется и для переключения активности генов у бактерий, сборка переменных и константных частей функциональных генов иммуноглобулинов и рецепторов Т-клеток у эукариот происходит также с использованием сайт-специфической рекомбинации.

Рекомбинация играет важную роль в эволюции живой природы. Она обеспечивает комбинативную изменчивость, благодаря рекомбинации отдельные гены могут оказаться в новом генетическом окружении (эффект положения). Таким образом, рекомбинация обеспечивает саму возможность отбора высокоадаптивных генов.

Глава VII

Транскрипция.

Транскрипция является первой стадией реализации (считывания) генетической информации, на которой нуклеотидная последовательность ДНК копируется в виде нуклеотидной последовательности РНК. В основе механизма копирования при транскрипции лежит тот же структурный принцип комплементарного спаривания оснований, что и при репликации. Транскрипция осуществляется ферментами РНК-полимеразами, синтезирующими РНК на ДНК-матрице.

Синтез молекул РНК начинается в определенных местах ДНК, называемых промоторами, и завершается в терминаторах. Участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции – транскриптон. В пределах каждого транскриптона копируется только одна из двух нитей ДНК, которая называется значащей или матричной. Разбиение ДНК на множество транскриптонов обеспечивает возможность независимого считывания разных генов, их индивидуального включения и выключения.

Цикл транскрипции можно разделить на четыре основные стадии, каждая из которых состоит в свою очередь из многих элементарных этапов: 1) связывание с ДНК; 2) инициация цепи РНК; 3) рост (элонгация) цепи РНК; 4) терминация цепи РНК.

Цикл транскрипции начинается с присоединения РНК-полимеразы к промотору, с которого начинается синтез РНК. Оказавшись на промоторе, РНК-полимераза образует с ним так называемый закрытый промоторный комплекс, в котором ДНК сохраняет двухспиральную структуру. В закрытом комплексе РНК-полимераза еще не способна к синтезу РНК. Этот комплекс нестабилен и легко диссоциирует. Закрытый комплекс может обратимо превращаться в открытый, в котором РНК-полимераза расплетает примерно один виток двойной спирали ДНК в районе стартовой точки – нуклеотида, с которого начинается комплементарное копирование матрицы. В открытом

комплексе связь РНК-полимеразы с промотором становится значительно более прочной (рис 9).

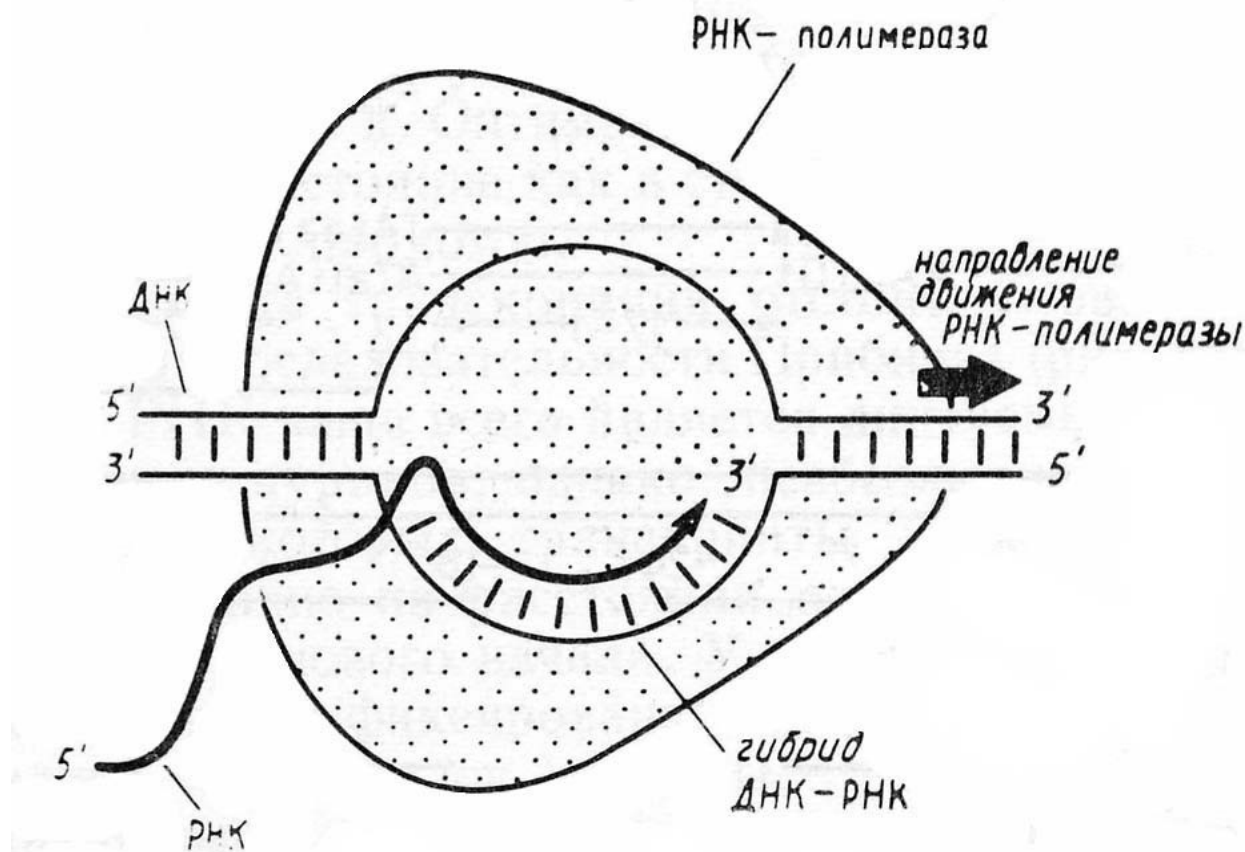


Рис.9. Схема процесса транскрипции

Следующая стадия, инициация, требует наличия субстратов РНК-полимеразы, нуклеотидтрифосфатов и заключается в образовании первых нескольких звеньев цепи РНК.

На стадии инициации РНК-продукт связан с матрицей и РНК-полимеразой непрочной и с высокой вероятностью может освободиться из комплекса. В этом случае РНК-полимераза, не покидая промотор, снова иницирует РНК. Когда РНК-продукт достигает критической длины (3-9 нуклеотидов), транскрибирующий комплекс стабилизируется и уже не распадается до тех пор, пока синтез молекулы РНК не будет доведен до конца. С этого момента начинается стадия элонгации.

На стадии элонгации в ДНК расплетено примерно 18 п.н. Примерно 12 нуклеотидов матричной нити ДНК образует гибридную спираль с растущим концом цепи РНК (рис 9). 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. Не исключено, что для предотвращения вращения комплекса двигающуюся по ДНК РНК-полимеразу сопровождают топоизомеразы.

На терминаторах прекращается синтез РНК. Первым из комплекса высвобождается РНК-продукт, а затем РНК-полимераза. В какой момент происходит схлопывание нитей ДНК, пока не известно. На этом этапе терминации и заканчивается процесс транскрипции.

Литература

1. Васильев Ю.М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. Соросовский образовательный журнал. 1997. № 5. стр.20-25.
2. Гайцхоки В.С. Взаимодействие генотип - фенотип как проблема молекулярной генетики наследственных болезней человека. Соросовский образовательный журнал. 1998. № 8. стр. 36-41.
3. Глазер В.М. Гомологичная генетическая рекомбинация. Соросовский образовательный журнал. 1998. № 7. стр. 13-21.
4. Глазер В.М. Генетическая рекомбинация без гомологии: процессы, ведущие к перестройке в геноме. Соросовский образовательный журнал. 1998. № 7. стр. 22-29.
5. Глазер В. М. Запрограммированные перестройки генетического материала в онтогенезе. Соросовский образовательный журнал. 1998. № 8. стр. 22-29.
6. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. С.-Петербург. Специальная литература. 1997.
7. Горбунова В. Н. Молекулярные основы медицинской генетики. С.-Петербург. Интермедика. 1999.
8. Горбунова В. Н. Что вы знаете о своем геноме? С.-Петербург. Интермедика. 2001.
9. Льюин Б. Гены. М. Мир. 1987.
10. Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология. М. Медицинское информационное агентство. 2003.
11. Роллер Э. Открытие основных законов жизни. М. Мир. 1978.
12. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии. Минск. Высшэйшая школа. 1986.
13. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2-х томах. М. Мир. 1998.
14. Спирин Л. С. Молекулярная биология. М. Высшая школа. 1990.

15. Шишкин С. С., Калинин В.Н. Медицинские аспекты биохимической и молекулярной генетики. М. 1992.

