

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Методические указания к практическим занятиям

\

Новосибирск 2022

УДК 577.21+ 612.6.05 + 575.1
ББК 58
С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

Составитель: Себежко О.И., к.б.н., доц.

Рецензент: Зайко О.А., к.б.н.,

Молекулярная генетика: метод. Указания к практическим занятиям / сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос.аграр. ун-т. Биолого-технолог. Ин-т.– Новосибирск, 2022. –41 с.

Методические рекомендации предназначены для студентов Биолого-технологического института, обучающихся по специальности 36.04.02 «Зоотехния».

Изложены основные разделы курса «Молекулярная генетика», которые студенты изучают на практических занятиях. Приведены глоссарий, библиографический список, тесты и вопросы для самоконтроля и подготовки к зачёту.

Методические указания утверждены и рекомендованы к изданию на заседании учебно-методического совета БТФ (протокол № 7 от 29 09. 2022г.).

©Новосибирский государственный аграрный университет, 2022

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Дисциплина “Молекулярная генетика” (Б1.В.0.3.) относится к дисциплинам части, формируемой участниками образовательных отношений 36.04.02 «Зоотехния», программа «Генетика и биотехнология в животноводстве».

Функция ДНК как наследственного материала.

Запись и хранение наследственного материала. Биологический код и его характеристика. Разнообразие белковых молекул определяется набором и порядком расположения аминокислот в полипептидных цепях. Именно эта последовательность аминокислот в пептидных цепях, определяя свойства белка, зашифрована в молекуле ДНК с помощью биологического кода. Уникальность молекул ДНК достигается различной последовательностью четырех нуклеотидов на нити ДНК. Как было установлено в эксперименте, кодирование отдельной аминокислоты осуществляется с помощью трех рядом стоящих нуклеотидов (триплетов) в полинуклеотидной цепи ДНК. Число возможных триплетов, которые образуются четырьмя нуклеотидами, соответствует $4^3 = 64$. Такого количества триплетов вполне достаточно, чтобы зашифровать 20 наиболее распространенных в природе аминокислот, входящих в состав белка. В работах Ниренберга и Очоа (1961 -1964 гг.), посвященных расшифровке биологического кода, было установлено, что из 64 триплетов 61 кодирует аминокислоты. Избыток кодирующих триплетов объясняется тем, что большинство аминокислот шифруется более чем одним (от 2 до 6) триплетом. Таким образом, расшифровка биологического кода показала, что он:

- Триплетен (одна аминокислота кодируется тремя рядом стоящими нуклеотидами);
- Специфичен (один и тот же триплет кодирует только одну определенную аминокислоту).
- Универсален (он применим для всех живых организмов);

- Вырожден (то есть одна и та же аминокислота может кодироваться несколькими различными триплетами);
- Однонаправлен (считывание информации происходит только в одном направлении);
- Неперекрываем (то есть каждый нуклеотид входит в состав только одного триплета и занимает в нем строго определенное место).

Редупликация (репликация) наследственного материала.

Одним из свойств наследственного материала является способность ДНК к самовоспроизведению (самоудвоению, авторепродукции). Для репликации ДНК требуется участие множества белков, которые быстро движутся вдоль ДНК и согласованно осуществляют процесс репликации с высокой точностью. Репликация включает несколько этапов:

1. Разрыв водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями двух полинуклеотидных цепей осуществляет фермент ДНК-геликаза, расплетая двойную спираль ДНК.
2. ДНК-топоизомераза разрывает фосфодиэфирную связь в одной из полинуклеотидных цепей ДНК, снимая напряжение, вызываемое расплетением спирали и расхождение цепей в репликационной вилке.
3. Дестабилизирующие белки выпрямляют участок ДНК, растягивают цепи ДНК, не позволяя им сомкнуться, и делают азотистые основания свободными для связывания с комплементарными нуклеотидами.
4. В области репликационной вилки действуют ферменты ДНК-полимеразы: на ведущей (лидирующей) и отстающей (запаздывающей) цепях. На ведущей цепи ДНК-полимераза работает непрерывно, а на отстающей фермент время от времени прерывает и вновь возобновляет свою работу, используя короткие молекулы РНК-затравки, синтезируемые ферментом ДНК-праймазой.
5. ДНК-праймаза синтезирует одну РНК-затравку ("праймер") для лидирующей цепи и для каждого фрагмента ДНК (фрагмента Оказаки)

в запаздывающей, У прокариот фрагменты Оказаки содержат от 1000-2000 нуклеотидов. У эукариот значительно короче - 100-200 нуклеотидов. Молекула ДНК-праймазы непосредственно связана с ДНК-геликазой, образуя структуру, называемую *праймосомой*, которая движется в направлении раскрытия репликационной вилки и по ходу движения синтезирует РНК-затравку для фрагментов Оказаки. В этом же направлении движется ДНК-полимераза ведущей цепи и ДНК-полимераза отстающей цепи. Для этого, как полагают, последняя накладывает цепь ДНК, которая служит ей матрицей, саму на себя, что и обеспечивает разворот ДНК-полимеразы отстающей цепи на 180° . Согласованное движение двух ДНК-полимераз обеспечивает координированную репликацию обеих нитей. Репликация происходит путем непрерывного роста обеих новых цепей по мере перемещения репликационной вилки, при этом, так как две цепи в спирали ДНК антипараллельны, одна из дочерних цепей должна была бы расти в направлении $5' \rightarrow 3'$ концу, а другая - от $3' \rightarrow 5'$. В действительности, оказалось, что дочерние цепи растут только в направлении $5' \rightarrow 3'$, то есть всегда удлиняется $3'$ - конец затравки, а матрица считывается ДНК-полимеразой в направлении $3' \rightarrow 5'$.

6. РНК-затравка, не обладающая корректирующей активностью, отличается от новосинтезированной цепи ДНК, поскольку состоит из рибонуклеотидов и в дальнейшем удаляется с помощью специфической рибонуклеазы. Образовавшиеся бреши достраиваются комплементарными участками ДНК.
7. Соединение синтезированных фрагментов ДНК (фрагментов Оказаки) происходит с помощью фермента ДНК-лигазы в запаздывающей нити ДНК.

В процессе репликации синтез новых полинуклеотидных цепей осуществляется в соответствии с принципами комплементарности и

антипараллельности. На каждой из двух ранее существовавших материнских полинуклеотидных цепей синтезируется комплементарная ей полинуклеотидная цепь. В результате репликации в дочерних молекулах ДНК одна полинуклеотидная цепь является вновь синтезированной, а другая - ранее входила в состав материнской молекулы ДНК. Такой способ синтеза называется полуконсервативным. Благодаря ему, обеспечивается точное воспроизведение в дочерних молекулах ДНК той информации, которая была записана в материнской молекуле. Репликация осуществляется в синтетический период жизненного цикла клетки перед митозом и мейозом.

"Проблема концевой репликации" заключается в том, что все известные ДНК- полимеразы, являющиеся ключевыми ферментами сложного репликативного белкового комплекса, неспособны полностью реплицировать концы линейных молекул ДНК. Для того чтобы клетки не теряли при делении часть генетического материала, 3'-концы ДНК хромосом эукариот наращиваются перед каждым раундом репликации короткими повторяющимися последовательностями. Это осуществляется ферментами — *теломеразами*.

Генетический материал живых организмов имеет огромные размеры и реплицируется с высокой точностью. В среднем в процессе воспроизведения генома млекопитающего, состоящего из ДНК длиной 3 млрд. пар нуклеотидов, возникает не более трех ошибок. При этом ДНК синтезируется очень быстро (скорость ее полимеризации колеблется в пределах от 500 нуклеотидов/с. у бактерий, до 50 нуклеотидов/с. у млекопитающих). Высокая точность репликации, наряду с ее высокой скоростью, обеспечивается наличием специальных механизмов, осуществляющих коррекцию, т. е. устраняющих ошибки. Суть механизма коррекции заключается в том, что ДНК-полимеразы дважды проверяют соответствие каждого нуклеотида матрице: один раз перед включением его

в состав растущей цепи и второй раз перед тем, как включить следующий нуклеотид. Очередная фосфодиэфирная связь синтезируется лишь в том случае, если последний (3'-концевой) нуклеотид растущей цепи ДНК образовал правильную уотсон-криковскую пару с соответствующим нуклеотидом матрицы.

Если же на предыдущей стадии реакции произошло ошибочное спаривание оснований, то дальнейшая полимеризация останавливается до тех пор, пока ошибка не будет исправлена. Для этого фермент перемещается в обратном направлении и вырезает последнее добавленное звено, после чего его место может занять правильный нуклеотид - предшественник.

Репаративный синтез ДНК.

В процессе жизнедеятельности под действием различных факторов в ДНК возникают повреждения, некоторые из них могут ликвидироваться благодаря репарации ДНК. Механизм репарации ДНК изучен на кишечной палочке. При воздействии на культуру кишечной палочки ультрафиолетовыми лучами на нити ДНК возникают повреждения - димеры (цитозин-цитозин, цитозинтимин, чаще всего возникают димеры тимина, соединенные через атомы углерода и представляющие собой наиболее стойкие соединения).

Димеры тимина приводят культуру кишечной палочки к гибели, если ее поместить в темноту. На свету димеры тимина расщепляются под действием фермента на два тимина, тем самым, восстанавливая структуру ДНК, это явление называется световая фотореактивация. Исправляются повреждения, возникшие под действием ультрафиолетовых лучей.

Повреждения, возникшие под влиянием других факторов (ионизирующая радиация, химические вещества и др.) исправляется в результате темновой фазы репарации. Она осуществляется в 5 этапов:

1. Фермент эндонуклеаза надрезает цепочку ДНК в месте возникновения повреждения.

2. Фермент нуклеаза вырезает поврежденный участок.
3. Фермент экзонуклеаза расширяет брешь.
4. ДНК-полимераза латает брешь, синтезируя участок ДНК комплементарно неповрежденной цепочке.
5. Ферменты лигазы сшивают вновь построенный участок со старым, и целостность ДНК восстанавливается.

Темновая репарация происходит во всех клетках на всех фазах жизненного цикла. У бактерий восстанавливается до 95% повреждений.

Темновая репарация обнаружена у высших организмов в культуре тканей. У человека известны заболевания, связанные с возникновением мутаций в генах, детерминирующих ферменты темновой репарации. В настоящее время известно около 10 наследственных заболеваний с нарушением репарационных процессов в ДНК.

Пигментная ксеродерма - группа заболеваний, при которых отмечается повышенная чувствительность кожи к солнечным лучам (покраснение, пигментация, изъязвления, злокачественные образования). Это рецессивноаутосомное заболевание. Фибробласты кожи больных людей более чувствительны к ультрафиолетовым лучам, чем фибробласты здоровых людей. Это связано с тем, что они обладают пониженной способностью выщеплять димеры тимина, следовательно, имеет место нарушение репарации на первом ее этапе, то есть произошла мутация в гене, кодирующем синтез ультрафиолетовой специфической эндонуклеазы. Возможны нарушения и на других этапах репарации ДНК или даже на нескольких этапах.

Атаксия - телеангиоэктазия (синдром Луи Бара) - прогрессирующая атаксия мозжечка с нарушением координации движений, телеангиоэктазия склер. В этом случае сильно запаздывает второй этап репарации - удаление поврежденных оснований молекулы ДНК. Панцитопения при гипо- и апластических анемиях. Поражены все ростки костного мозга. При этом

заболевании нарушен третий этап темновой репарации - синтез экзонуклеазы, завершающей вырезание поврежденного участка ДНК.

Синдром Блума - сочетание недоразвития скелета, гипофизарной карликовости, гипогонадизма с врожденной телеангиоэктатической эритемой лица, участками гиперкератоза и гиперпигментации на туловище. Эти аномалии связаны с нарушением пострепликативного восстановления - 4, 5 этапов репарации.

На нити ДНК в структуре гена могут возникнуть и нерепарируемые изменения - генные или точковые мутации:

1. Миссенс-мутация. Связаны с заменой одного нуклеотида на другой. В результате такой мутации возникло заболевание серповидноклеточная анемия. У гомозиготных носителей этого гена в эритроцитах содержится гемоглобин S, отличающийся от нормального гемоглобина. А только одной аминокислотой, потерявшей способность легко связываться с кислородом.
2. Нонсенс-мутация. Связана с образованием бессмысленных кодонов (УАА, УАГ, УГА).
3. Мутация со "сдвигом рамки". Наблюдаются при вставке или выпадении одного нуклеотида.

Выявлены механизмы, снижающие частоту фенотипического проявления мутаций и биологические антимутагенные факторы:

1. триплетность и вырожденность генетического кода;
2. диплоидность (гетерозиготность) генотипа. Мутации чаще всего рецессивные и проявляются только в гомозиготном состоянии;
3. повторы генов на нити ДНК;
4. репаративные процессы;
5. метилирование ДНК (присоединение метильной группы СН₃ под действием фермента метилазы) предохраняет ДНК от действия рестриктаз (ферментов, расщепляющих ДНК). С возрастом процесс метилирования усиливается.

Обеспечение реализации наследственной информации. Роль РНК.

Наследственная информация, записанная с помощью генетического кода, хранится в молекуле ДНК. Процессы жизнедеятельности осуществляются в клетке на основе полученной информации, однако в этих процессах принимает участие не сама ДНК, а РНК, выполняющая роль посредника.

Рибонуклеиновые кислоты (РНК), присутствующие в клетках как прокариот, так и эукариот, бывают трех основных типов: информационная (матричная - мРНК), транспортная (тРНК) и рибосомальная (рРНК). В ядре клеток эукариот содержится РНК четвертого типа - гетерогенная ядерная РНК (гЯРНК). В отличие от молекулы ДНК, РНК представляет собой одну полинуклеотидную цепь, включающую 4 разновидности нуклеотидов, содержащих остаток фосфорной кислоты, сахар-рибозу и одно из четырех азотистых оснований - аденин, гуанин, цитозин и урацил.

Рибосомальная РНК (рРНК) входит в комплексе с белками в состав рибосом, функции которых непосредственно связаны с реализацией генетической информации при синтезе пептидных связей. Р-РНК образуется на матрице ДНК, в особых локусах - генах, отвечающих за ее синтез; тРНК - короткая (70-80 нуклеотидов) полинуклеотидная цепь, осуществляющая функцию транспорта аминокислот к месту сборки пептидной цепи - к рибосоме. Эти молекулы также синтезируются на матрице ДНК. Особенностью тРНК является пространственная конфигурация. Благодаря образованию водородных связей между комплементарными последовательностями нуклеотидов молекула образует три петли. Средняя петля несет три нуклеотида (антикодон) комплементарных определенному кодону в молекуле иРНК, шифрующему данную аминокислоту. Так как один из нуклеотидов антикодона содержит нетипичное основание, которое

может комплементировать с любым основанием кодона, то одна и та же тРНК способна узнавать несколько кодонов, различающихся по одну (главным образом третьему) основанию. В связи с этим в цитоплазме встречается около 40 видов различных тРНК, способных переносить 20 аминокислот. К 3' концу молекулы тРНК прикрепляется определенная молекула аминокислоты. Все тРНК начинаются с фосфорилированного 5' - конца; первым основанием обычно является G. На 3' -конце всегда присутствуют три основания -ЦЦА и концевая гидроксильная группа (-ОН) - акцепторный конец. К этому концу присоединяется остаток аминокислоты. Прежде чем соединиться с тРНК, аминокислоты активируются. Активация аминокислот происходит при их взаимодействии с АТФ и образованием аминоациладенилата (активированная форма аминокислоты), который представляет собой смешанный ангидрид, образованный остатком фосфорной кислоты, АМФ и карбоксильной группой аминокислоты. С аминоациладенилата остаток аминокислоты переносится на тРНК, специфичную для каждой аминокислоты, и в виде аминоацил -тРНК поступает в рибосомы. Эти реакции катализируются ферментом аминоацил-тРНК-синтетазой, строго специфичным для каждой аминокислоты и каждой тРНК. и-РНК- молекула, на которую переписывается по принципу комплементарности информация с определенного участка молекулы ДНК. Списанная информация поступает в виде иРНК в цитоплазму и является инструкцией для сборки пептидной цепи на рибосоме. Таким образом, молекула ДНК при участии различных видов РНК обеспечивает специфический синтез в клетке.

Реализация наследственной информации. Реализация у прокариот.

В связи с тем, что у прокариот геном организован в виде кольцевидной молекулы ДНК, расположенной непосредственно в цитоплазме клетки, различные этапы реализации наследственной

информации практически не разобщены ни во времени, ни в пространстве. Транскрипция и сборка пептидной цепи - трансляция протекают практически одновременно. По мере освобождения начала молекулы иРНК от матрицы ДНК к ней присоединяются рибосомы и начинается синтез пептидных цепей.

Особенности реализации наследственной информации у эукариот.

Геном эукариот организован сложнее, чем у прокариот. Для него характерен хромосомный уровень организации. В хромосомах ДНК находится в окружении белков. В геноме эукариот имеется много избыточной ДНК. В конце 70-х годов было высказано предположение о наличии в генетическом материале эукариот неинформативных участков - интронов, которые вставлены между информативными - экзонами. Интронноэкзонная организация генов у эукариот определяет необходимость преобразования первичного транскрипта (преинформационной РНК - продукта транскрипции) в зрелую иРНК. Она должна быть освобождена от неинформативных участков и защищена против разрушающего воздействия ферментов цитоплазмы.

Кроме того, у эукариот появляется ядерная мембрана, которая пространственно разобщает место хранения генетической информации (хромосомы в ядре) и место синтеза пептидной цепи (рибосомы). Иными словами, у эукариот процессы транскрипции и трансляции разобщены как пространство (ядерной оболочкой), так и во времени (процессами созревания иРНК).

Таким образом, в ходе реализации наследственной информации у эукариот выделяют следующие этапы:

1. Транскрипция;
2. Посттранскрипционные процессы (процессинг);
3. Трансляция;

4. Посттрансляционные процессы

1. Транскрипция - осуществляется с помощью РНК-полимераз.

РНКполимераза I синтезирует пре-рРНК. РНК-полимераза II синтезирует преиРНК. РНК-полимераза III -пре- тРНК. Раньше считали, что транскрипция происходит по 1 из 2-х расплетаемых нитей ДНК. Сейчас установлено, что транскрипция идет по обеим нитям в 2-х направлениях. Одна нить ДНК несет наследственную информацию (смысловая), другая, комплементарная ей - антисмысловая. В клетке антисмысловая иРНК играет роль в управлении дифференцировкой и иногда - в регуляции синтеза белка. Если образуется комплекс (дуплекс иРНК + антисмысловая иРНК), тогда невозможен перенос иРНК из ядра в цитоплазму, следовательно, нет трансляции на рибосомах.

В участке ДНК, соответствующем отдельному гену перед структурной частью, в которой зашифрована последовательность аминокислот в пептиде, обязательно располагается последовательность нуклеотидов, узнаваемая РНК-полимеразой. Такая последовательность называется промотором.

РНК-полимераза находит промотор, взаимодействует с ним и после этого, двигаясь вдоль молекулы ДНК, обеспечивает постепенную сборку молекулы иРНК в соответствии с принципом комплементарности и антипараллельности. В конце структурной части гена расположен участок с особой последовательностью нуклеотидов - терминатор. Он обязательно включает один из нонсенс-триплетов, не кодирующих аминокислоты. В результате транскрипции синтезируется молекула преинформационной РНК.

Посттранскрипционные процессы (процессинг)

Это превращения, происходящие с первичным транскриптом, направленные на образование зрелой, стабилизированной иРНК, способной выполнять функцию матрицы при трансляции и защищенной от разрушающего действия специфических ферментов цитоплазмы.

Основные стадии процессинга:

1. отщепление концевых участков первичного транскрипта (спейсеров);
2. формирование на 5' конце колпачка, состоящего из особой последовательности нуклеотидов;
3. формирование на 3' конце полиадениловой последовательности нуклеотидов АААА:
4. метилирование некоторых внутренних азотистых оснований в транскрипте, стабилизирующее молекулу РНК;
5. вырезание неинформативных участков, соответствующих нитронам ДНК, и сшивание (сплайсинг) участков, соответствующих экзонам. Вырезание интронов происходит с участием сплайсосом. Некодирующие последовательности - интроны превращаются в малую ядерную РНК (мяРНК). Выделено до 30 мяРНК, они участвуют в сплайсинге и ядерно- цитоплазматическом транспорте белков.

В результате процессинга у эукариот зрелая иРНК характеризуется следующими особенностями строения:

Кэп - особая последовательность нуклеотидов с метилированными основаниями, которая обеспечивает узнавание малых субъединиц рибосом;

Лидер - вводная последовательность нуклеотидов, комплементарная последовательности в молекуле рРНК малой субъединицы рибосом, которая обеспечивает прикрепление иРНК к малой субъединице.

Стартовый кодон - триплет нуклеотидов, кодирующий в большинстве случаев аминокислоту формилметионин (АУГ).

Кодирующая часть - последовательность кодонов, шифрующих определенную последовательность аминокислот в соответствующей пептидной цепи.

Поли А-хвост - концевая часть молекулы иРНК, включающая нонсенскодон и поли-А последовательность.

Трансляция - процесс сборки пептидной цепи, происходящей в цитоплазме на рибосомах на основании программы, содержащейся в иРНК. Основные фазы трансляции: 1) инициация; 2) элонгация; 3) терминация. Инициация трансляция предполагает следующие события:

- с помощью колпачка иРНК находит в цитоплазме малую субъединицу рибосомы;
- с помощью лидерной последовательности устанавливается связь с комплементарным участком определенной фракции рРНК и иРНК прикрепляется к малой субъединице;
- к стартовому кодону (АУГ) присоединяется тРНК, несущая формилметионин;
- малая субъединица ассоциируется с большой субъединицей в аминоацильном центре (АЦ), в которой располагается формилметионин.

Таким образом, фаза инициация завершается формированием комплекса иРНК и рибосомы с подстановкой начальной для всех пептидных цепей аминокислоты - формилметионин.

Фаза элонгации, т.е. наращивание пептидной цепи. Осуществляется путем постепенной подстановки аминокислоты в соответствии с очередным кодовым иРНК, который встает против аминоацильного центра. К этому кодону присоединяется соответствующая тРНК, имеющая комплементарный ему антикодон. Она несет определенную аминокислоту, которая располагается в аминоацильном центре (АЦ), тРНК, соединенная с предыдущим кодовым оказывается в пептидилном центре (ПЦ где располагает свою аминокислоту (цепочку АК). Между двумя

аминокислотами, расположенными в пептидильном и аминоацильном центре, при участии имеющихся здесь ферментов возникает пептидная связь:

После установления пептидной связи предыдущая тРНК отделяется от своей аминокислоты и своего кодона и уходит в цитоплазму, а последняя тРНК, нагруженная цепочкой аминокислот, переходит в ПЦ, заставляя иРНК перемещаться вдоль рибосомы и устанавливать новый кодон против аминоацильного центра. После прохождения через рибосому всей кодирующей части иРНК на рибосоме собирается пептидная цепь с определенной последовательностью аминокислот. Фаза терминации наступает, когда в контакт с рибосомой приходит концевой участок иРНК, который включает нонсенс-кодон, не кодирующий никакой аминокислоты. На этом сборка пептидной цепи заканчивается. По мере освобождения 5'/конца иРНК колпачок может находить новые малые субъединицы рибосом и процесс трансляции может повторно осуществляться на новых рибосомах. Комплекс рибосом, находящихся в контакте с одной молекулой иРНК и синтезирующих одинаковые пептидные цепи, называется полирибосомой (полисомой).

Регуляция генной активности

Реализация наследственной информации в живых системах - это сложный процесс, требующий очень тонкой регуляции для того, чтобы обеспечить в определенных клетках в определенное время синтез определенных белков в необходимом количестве. Все клетки организма, возникая путем митоза, получают полноценный набор генетической информации, образуемый при оплодотворении родительских гамет. Несмотря на это, они отличаются по своим морфологическим, биохимическим и функциональным свойствам друг от друга. В основе этих

различий лежит активное функционирование в разных клетках разных частей генома.

Большая часть генома в клетках организма находится в неактивном репрессивном состоянии в только около 10% генов дерепрессированы, т. е. активно транскрибируются. Спектр транскрибируемых генов зависит от тканевой принадлежности клетки, от периода ее жизнедеятельности и периода индивидуального развития организма. Регуляция активности генов может осуществляться на всех этапах реализации генетической информации, но наиболее экономически выгодной является регуляция на стадии транскрипции.

Основная масса генов, активно функционирующих в большинстве клеток организма на протяжении онтогенеза, - это гены, которые обеспечивают синтез белков общего назначения (белки рибосом, хромосом, мембран и т. д.), тРНК и рРНК. Транскрибирование этих структурных генов обеспечивается соединением РНК-полимеразы с их промоторами и не подчиняется каким-либо другим регулирующим воздействиям. Такие гены называются конститутивными. Другая группа структурных генов, обеспечивающих синтез некоторых белков-ферментов, в своем функционировании зависит различных регулирующих факторов и называется регулируемыми генами. Их активное функционирование, скорость и продолжительность транскрибирования могут регулироваться как генетическими факторами, так и факторами негенетической природы.

Генетическими факторами регуляции транскрипции являются гены-регуляторы и операторы. Гены-регуляторы определяют синтез белков-регуляторов, способных в активном состоянии соединяться с оператором, включающим или выключающим транскрипцию структурных генов. В зависимости от свойств белка-регулятора различают негативный и позитивный контроль транскрипции со стороны гена-регулятора. При негативном контроле белок-регулятор, соединяясь с оператором,

прекращает (выключает) транскрипцию. Такой белок называется репрессором. При позитивном контроле белок-регулятор, соединяясь с оператором, включает транскрипцию. В таком случае продукт гена-регулятора называется апоиндуктором .

Таким образом, наряду со структурными генами в геноме имеются гены-регуляторы, которые, обеспечивая репрессию или депрессию структурных генов, регулируют процессы синтеза белка в клетке.

Наряду с генетическими факторами в регуляции экспрессии генов важная роль принадлежат факторам негенетической природы - эффекторам. К ним относятся вещества небелковой природы, расщепляемые или синтезируемые в клетке при участии различных ферментов.

В зависимости от того, как эффектор воздействует на активность генов, различают индукторы, включающие транскрипцию генов, и корепрессоры, выключающие ее. Действие эффектора заключается в его взаимодействии с белком-регулятором, при котором он либо активируется и может соединяться с оператором, либо инактивируется и теряет способность соединяться с оператором.

Таким образом, экспрессия генов является результатом регулирующего воздействия на процессы транскрипции как со стороны самого генома (гены-регуляторы и операторы), так и со стороны факторов негенетической природы.

Регуляция транскрипции у прокариот

Изучение регуляции экспрессии генов на стадии транскрипции у прокариот привело к созданию в 1961 г. модели оперона (Жакоб и Мано). Оперон -это тесно связанная последовательность структурных генов, определяющих синтез группы ферментов для какой-либо одной из биохимических реакций.

Особенностью прокариот является транскрибирование иРНК со всех структурных генов оперона. Такая полицистронная иРНК в дальнейшем

разрезается на фрагменты, соответствующие матрицам для синтеза отдельных ферментов. Цепи структурных генов оперона всегда предшествует промотор, узнаваемый РНК-полимеразой. У конститутивных генов этого достаточно для осуществления транскрипции. У регулируемых генов между промотором и структурными генами располагается оператор - последовательность нуклеотидов, которая узнается белком-регулятором (репрессором), находящимся в активном состоянии. Белок-репрессор представляет собой аллостерический белок, способный изменять свои биологические свойства при соединении с различными специфическими молекулами и обладает двумя высокочувствительными группами; одной из них он распознает оператор, другой - специфично связывает индуктор. Одновременно быть связанным с двумя молекулами он не может. Индуктор представляет низкомолекулярное вещество, которое связывается с репрессором и переводит его в неактивную форму, неспособную более связываться с оператором. Так, в Лас-системе индуктором является лактоза, после ассоциации с которой репрессор отсоединяется от оператора.

При отсутствии в среде лактозы активный репрессор, взаимодействуя с оператором, репрессирует гены А, В, С - транскрипции нет. Появление в среде лактозы инактивирует репрессор, он не соединяется с оператором и осуществляется транскрипция генов А, В, С, отвечающих за синтез ферментов, которые расщепляют лактозу. Уменьшение содержания лактозы в результате ее ферментативного расщепления приводит к соединению активного репрессора с оператором и выключению транскрипции генов А, В, С.

Регуляция экспрессии генов у эукариот

У эукариот не установлено оперенной организации генов. Гены, определяющие синтез ферментов одной цепи биохимических реакций, могут быть рассеяны в геноме и очевидно не имеют, как у прокариот, единой регулирующей системы. В связи с этим синтезируемые мРНК у

эукариот моноцистронны, т.е. являются матрицами для отдельных пептидных цепей.

В настоящее время механизмы регуляции активности эукариотических генов интенсивно изучаются. Установлено, что регуляция транскрипции у эукариот является комбинационной, т. е. активность каждого гена регулируется большим спектром генов- регуляторов. У многих эукариотических генов, кодирующих белки и транскрибируемых РНКполимеразой II, в ДНК имеется несколько областей, которые узнаются разными белками-регуляторами. Одной из них является область, расположенная вблизи промотора. Она включает около 100 пар нуклеотидов, в том числе ТАТА-блок, располагающийся на расстоянии 25 пар нуклеотидов от точки начала транскрипции. Установлено, что для успешного присоединения РНК-полимеразы II к промотору необходимо предварительное соединение с ТАТА-блоком особого белка - фактора транскрипции - с образованием стабильного транскрипционного комплекса. Именно этот комплекс ДНК с белком узнается РНК-полимеразой II.

Другая область, играющая важную роль в регуляции активности эукариотических генов, располагается на большом расстоянии от промотора (до нескольких тысяч пар нуклеотидов) и называется ЭНХАНСЕРОМ (от англ. enhance - усиливать). И энхансер, и препромоторный элемент эукариотических генов - это короткие последовательности нуклеотидов, которые связываются с соответствующими регуляторными белками. В результате взаимодействия этих белков происходит включение или выключение генов.

Особенностью регуляции экспрессии эукариотических генов является также существование белков-регуляторов, которые способны контролировать транскрипцию многих генов, кодирующих, возможно, другие белки-регуляторы. В связи с этим некоторые (главные) белки-

регуляторы обладают координирующим влиянием на активность многих генов и их действие характеризуется плейотропным эффектом.

Ввиду того, что в геноме эукариот имеется много избыточных ДНК, а в каждой клетке организма транскрибируется всего 7-10% генов, логично предположение о том, что у них преобладает позитивный генетический контроль, при котором активация небольшой части генома оказывается более экономичной, нежели репрессия основной массы генов.

Несомненной особенностью регуляции транскрипции у эукариот является подчиненность этих процессов регулирующим влияниям со стороны гормонов организма. Последние часто играют роль индукторов транскрипции. Примером участия гормонов в регуляции активности определенных генов может служить влияние тестостерона на развитие тканей организма по мужскому типу при наличии специфического белка-рецептора. Отсутствие последнего при мутации соответствующего гена не дает возможности гормону проникнуть в ядра клеток-мишеней и обеспечить включение определенного набора генов: развивается синдром тестикулярной феминизации или синдром Морриса: особь с кариотипом ХУ, но внешне более сходна с женщиной, не способна иметь потомство, т.к. ее половые железы (семенники) недоразвиты, их выводные протоки часто формируются по женскому типу, вторичные половые признаки также характерно для женского пола. Следующая особенность регуляции генной активности у эукариот связан: с образованием комплекса ДНК с белками - хроматином. Ведущая роль в компактизации ДНК принадлежит гистонам, поэтому они несомненно участвуют и в процессах регуляции генной активности. Непременным условием для осуществления транскрипции у эукариот является предварительная декомпактизация хроматина на соответствующем участке, где временно утрачивается связь с Н1-гистонами и несколько ослабляется связь с нуклеосомными гистонами. Правда, нуклеосомная организация хроматина не утрачивается даже в ходе

транскрипции, однако контакт ДНК и негистоновых белков становится возможным и происходит дерепрессия гена.

Для эффективной регуляции экспрессии генов у эукариот существуют механизмы, работающие не только на стадии транскрипции, но и на других этапах этого процесса. Связанная с экзон-интронной организацией генов необходимость процессинга, в том числе сплайсинга, делает возможным регуляцию этих процессов в ядре: используя один и тот же первичный транскрипт, можно обеспечить образование матриц для разных пептидов, вырезая из них разные последовательности или изменяя последовательности на 5' и 3' концах мРНК.

Транспорт зрелых мРНК из ядра в цитоплазму также регулируется: лишь небольшая часть РНК, транскрибируемая с генов, после сплайсинга покидает ядро. Значительное количество ее деградирует.

Существуют механизмы, обеспечивающие регуляцию процессов синтеза пептидных цепей. Они менее экономичны, но отличаются быстротой реагирования на изменения потребностей клетки в данном белке. Регуляция трансляции осуществляется на стадии инициации, когда блокируется присоединение к малой субъединице рибосомы тРНК, несущей формилметионин. В результате при наличии в цитоплазме иРНК трансляции на ней не происходит. Такая ситуация наблюдается, например, при отсутствии в цитоплазме гена, что ведет к выключению трансляции глобиновых цепей гемоглобина. Регуляция процесса реализации наследственной информации может осуществляться и на стадии посттрансляционных изменений, когда происходит задержка в формировании активных молекул белка при наличии пептидных цепей. Например, для формирования активной формы инсулина из проинсулина должны вырезаться две субъединицы. Торможение этих процессов уменьшает выход конечного активного продукта.

Практическое применение молекулярной генетики

Основные достижения молекулярной генетики, особо отразились в бурном развитии генной инженерии. Генетическая (генная) инженерия - область молекулярной биологии и генетики, ставящая своей задачей конструирование генетических структур по заранее намеченному плану, создание организмов с новой генетической программой. Основные методы генной инженерии были разработаны в 60-70-х годах нашего века. Они включают три основных этапа:

- получение генетического материала (искусственный синтез гена или выделение природных генов);
- включение этих генов в автономно реплицирующуюся генетическую структуру (векторную молекулу) и создание рекомбинантной молекулы ДНК;
- введение векторной молекулы (с включенным в нее геном) в клетку-

реципиент, где она встраивается в хромосомный аппарат.

Экспериментальный перенос генов в другой геном называется *трансгенозом*.

В настоящее время раскрыта тонкая структура гена. Известно, что ген содержит информацию на первичную структуру одного полипептида. Число кодонов в гене не может быть меньше числа аминокислот в белке. Средний размер гена 1000-1200 нуклеотидов. Существуют разные подходы выявления последовательности нуклеотидов в гене.

Принципиально возможно познание структуры гена путем изучения последовательности аминокислот в белке. Но это длинный путь, если учесть, что одна и та же аминокислота может кодироваться несколькими триплетами.

Другой подход более реальный: путем анализа последовательностей нуклеотидов в информационных РНК, которые какое-то время существуют в цитоплазме и могут быть выделены.

Гены для пересадки могут быть либо искусственно синтезированы, либо выделены из ДНК прокариот и хромосом эукариот. В настоящее время выделение высокомолекулярной ДНК проводят на ультрацентрифугах в градиенте плотности хлористого цезия. Известно два пути искусственного синтеза гена: химический и ферментативный. Для *химического синтеза* необходимо иметь полностью расшифрованную последовательность нуклеотидов. Впервые в 1970 году индийским ученым Корана Г. (США) был осуществлен искусственный синтез гена. Он синтезировал последовательность нуклеотидов в ДНК, специфическую для структуры гена транспортной аланиновой РНК в клетках пекарских дрожжей. Более двух лет затратили на этот синтез гена.

Последовательность нуклеотидов в нити ДНК определялась по информационной РНК. Но этот ген был не способен работать *in vitro*. Причиной являлся синтез только структурной части гена, в нем не было регуляторных участков. Для транскрипции необходимо, чтобы фермент РНК-полимераза "узнавала" место промотора, где локализована точка инициации синтеза, и в этом месте "садилась" на матрицу. В 1976 г, в той же лаборатории был синтезирован ген тирозиновой тРНК бактерии кишечной палочки, состоящий не только из структурного участка (126 нуклеотидных пар), но и регуляторных частей - промотора и терминатора. Этот искусственно созданный по специальной программе ген был выведен в бактериальную клетку и функционировал как природный.

Другим примером химического синтеза гена является синтез гена, кодирующего фермент, расщепляющий лактозу. Синтезированный ген в пробирке был встроен в плазмиду и введен в бактерию; кишечная палочка приобрела способность усваивать лактозу. Однако, химическим путем можно синтезировать небольшие по размеру гены прокариот, синтез сложных генов эукариот, состоящих из тысячи и более нуклеотидов, путем химического синтеза пока создать не удастся.

Кроме того, химический синтез очень трудоемкий и в настоящее время практически не используется. Наиболее успешным оказался ферментативный синтез гена.

Центральная догма молекулярной генетики утверждает, что считка информации происходит в направлении: ДНК→РНК→белок. Но ряд авторов, начиная с 1948 года, выступали с соображениями, что РНК может быть предшественником ДНК. Подобное наблюдается у онкогенных РНК - содержащих вирусов. С РНК-вируса, попавшего в клетку, синтезируется провирус (ДНК - копия РНК) с помощью фермента обратная транскриптаза (ревертаза), а сам процесс называется обратной транскрипцией. Этот фермент был открыт в 1970 году Теминым, Мазутани, Балтимором. Клонирование (размножение) кДНК по известной иРНК было разработано Г.Бойером, С.Коэном и П.Бергом в 1973 году. На 1 этапе на основе иРНК по принципу комплементарности синтезируют односпиральную кДНК. На 2-3 этапах удаляют иРНК и достраивают вторую часть кДНК. Деполимеризацию исходной РНК-цепочки осуществляют путем щелочного гидролиза. Цепи ДНК устойчивы к обработке щелочью, а РНК полностью деполимеризуется. Двухцепочечную кДНК получают путем достраивания одноцепочечной кДНК под действием фермента ДНК-полимеразы. После такой обработки кДНК можно встраивать в вектор. Такая кДНК не имеет вставок - интронов, т. е. схема ее строения в этом смысле не отличается от бактериального гена. Ген, полученный путем ферментативного синтеза, может функционировать в бактериальной клетке, на нем синтезируется иРНК, а затем белок. Таким путем под руководством академика В. А.Энгельгардта был получен ген, определяющей синтез фермента галактозидазы, введенный в фаг. При размножении фага в клетке получили множество копий, что обеспечило синтез большого количества фермента. Это имеет не только теоретическое, но и практическое значение, так как галактозидаза применяется в пищевой промышленности.

Следовательно, если иметь в пробирке выделенные молекулы иРНК, принадлежащие данному гену, то он может быть синтезирован с помощью фермента. Матрицей служит иРНК, ее выделяют, добавляют нуклеотиды, затравку, ферменты. На основе этих данных в 1972-1973 гг. во многих лабораториях мира были синтезированы гены глобина человека, кролика, голубя, мышцы, утки, гены митохондрии печени крыс и другие. Гены, синтезированные с помощью ревертазы, не имеют регулярной части и промотора. Отсутствие регуляторных участков препятствует функционированию этих искусственных генов в животных клетках. При переносе в микробную клетку к структурным генам присоединяют промотор, извлеченный из микробной клетки.

Ферментативный синтез гена имеет большие возможности: принципиально осуществимо проводить искусственный синтез любых индивидуальных генов путем транскрибирования их с соответствующих матричных РНК. Основным затруднением является синтез не структурных, а регуляторных генов, необходимых для их нормальной работы. Это в ряде случаев ограничивает использование искусственно синтезированных генов. Кроме этого, иРНК в клетках содержится в очень незначительном количестве и она обладает нестойкостью.

В настоящее время получают рекомбинативные (гибридные) молекулы ДНК путем гибридизации *in vitro* фрагментов ДНК вирусного, бактериального и в меньшей степени эукариотного происхождения.

Нахождение условий функционирования генов эукариот в бактерии позволяло бы решить проблему получения многих биологически активных веществ (гормонов). Одним из достижений является синтез гормона соматостатина, полученный в результате введения этого гена в кишечную палочку. Соматостатин регулирует поступление в кровь гормона роста, образуется он в гипоталамической области. Плазмиды, содержащие этот ген, были введены в бактерию и состыкованы с имеющимся в ее геноме

регуляторным геном бетагалактозидазы. Наличие регуляторного участка обеспечило процесс транскрипции и трансляции.

Однако создание искусственных генов, получение рекомбинантных молекул ДНК и введение их в клетки, в частности прокариот, может привести к появлению новых организмов с признаками, никогда ранее не имевшимися на Земле. Так, в США пересадили гены стафилококка кишечной палочки. В результате образовался гибридный штамм, обладающий свойствами обоих микроорганизмов. При манипуляции с геномом этой бактерии возникшие новые организмы могут приобрести патогенные свойства, быть устойчивыми к известным лекарственным препаратам и оказаться особо опасными для человека, поскольку в ходе предыдущей эволюции человеческий организм никогда не встречался с такими формами и может оказаться безоружным,

В связи с этим на Международной конференции в США в 1974 г. были выработаны определенные правила, обязательные при манипуляциях с генетическим материалом и предложен ряд мер, которые должны сделать практически невозможным случайный выход из лабораторий в природу патогенных рекомбинантных микроорганизмов.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Трансформацией называется перенос чистой ДНК из одних клеток в другие. Трансформация была открыта бактериологом Ф. Гриффитсом в 1928 г. в опытах с пневмококками.

У пневмококков известно два типа штаммов: S–и R–формы. S–форма характеризуется наличием полисахаридной капсулы, благодаря чему при искусственном культивировании она образует гладкие блестящие колонии; эта форма патогенна для мышей. R–форма не имеет капсулы, при искусственном культивировании она образует шероховатые колонии; эта форма непатогенна для мышей. Но если мышам одновременно ввести убитые S–клетки и живые R–клетки, то мыши погибают. Следовательно,

генетические свойства одного штамма влияют на генетические свойства другого штамма. В природных условиях внеклеточная чистая ДНК образуется при гибели (лизисе) прокариот.

Способность клетки к трансформации возможна при особом ее состоянии, которое называется компетентностью. У компетентных клеток изменяется состав клеточной стенки и плазмалеммы: стенка становится пористой, плазмалемма образует многочисленные впячивания, а на внешней поверхности появляются особые антигены – факторы компетентности. Как правило, трансформация происходит в пределах одного вида прокариот, но при наличии гомологичных генов наблюдается и межвидовая трансформация.

В лаборатории трансформацию используют для введения в клетки бактерий рекомбинантной плазмидной ДНК, в данном случае плазида реплицируется независимо от хромосомной ДНК и обеспечивает экспрессию целевых генов. Также можно вводить генетические конструкции, которые при рекомбинации с хромосомой способны встраиваться в нее и реплицироваться синхронно с ней (интегративные плазмиды), в таком случае на клетку приходится только одна копия гена. Также путем трансформации проводят нокаутирование генов – когда целевой ген заменяют на селективный маркерный ген, например, ген устойчивости к антибиотикам.

Огромное количество биологических исследований начинается с того, что в клетку вносится чужеродный генетический материал. Это действие называется генетической трансформацией. С его помощью можно получить генетически модифицированные организмы, включить и выключить отдельные гены, определить влияние какого-нибудь белка на какой-нибудь сложный процесс и так далее.

Примеры трансформированных животных

1. Получение трансгенных рыб: лосось, форель, голец. Получение осуществляется методом микроинъекций: ДНК вводится в икринки, когда они содержат одноклеточный зародыш (выживаемость эмбрионов 35-85%).

2. Перенос генов гормонов роста (двукратное увеличение «золотых рыбок»), введение генов устойчивости рыбам к определенным вирусным заболеваниям при искусственном разведении.

3. Первая трансгенная мышь получена в 1988 году путем микроинъекций пронуклеус зиготы. В последние годы широко ведутся работы по генетической инженерии у лягушек, крыс, мышей, кроликов, свиней (введены гены, ответственные за свертываемость крови, гены гормона роста, инсулина и др.).

Приведенные факты свидетельствуют о том, что в природе существуют механизмы переноса, стабильного наследования и экспрессии генов прокариот в клетках эукариотических организмов. На примере Ti-плазмид агробактерий можно наблюдать первый, но не единственный случай взаимодействия про- и эукариотической ДНК *in vivo*

Мутагенез

Одно из основных свойств кариотипа, ДНК и ее участков (генов) — сохранять постоянство внешнего и внутреннего строения.

Морфофункциональная устойчивость генетического материала обеспечивает передачу всей совокупности наследственных признаков каждой особи последующим поколениям и является основой для сохранения видовых признаков на протяжении многих сотен лет. Однако такая стабильность относительна. В силу действия внутренних и внешних факторов в генетическом материале возникают изменения — мутации, определяющие мутационную изменчивость.

Мутациями называют скачкообразные стойкие изменения в структуре ДНК и кариотипе. Этот термин впервые предложил ботаник Гуго де Фриз для обозначения внезапно возникающих наследуемых изменений у растений.

Мутации у животных происходят постоянно с определенной частотой и скоростью. Процесс их образования получил название *мутагенеза*. Факторы, вызывающие мутации, называются мутагенами. Мутагены первоначально воздействуют на генетический материал особи, вследствие чего может измениться фенотип.

Мутации, возникающие в естественных условиях, называют *спонтанными*, искусственно вызванные — *индуцированными*. Те и другие могут возникать как в генеративных, так и в соматических клетках. Мутации, возникающие в половых клетках (*генеративные мутации*), передаются в последующие поколения. *Соматические мутации* не наследуются. Они влияют только на признаки самого мутантного животного.

ПРИЧИНЫ И ФАКТОРЫ СПОНТАННОГО МУТАГЕНЕЗА

В обычных или естественных условиях среды возникновение мутаций носит как бы случайный характер. Действительно, и у самых опытных машинисток иногда обнаруживают ошибки при перепечатывании текстов, которые могут быть растиражированы в миллионах экземпляров газет или книг. Подобно этому не исключается «опечатка» при самокопировании или репликации ДНК в одной клетке, которая может стать достоянием целого клона дочерних клеток или, если мутантная клетка половая, унаследована всеми клетками потомка.

Спонтанный мутационный процесс зависит как от внутренних, так и от внешних (абиотических и биотических) факторов. Среди абиотических факторов наибольшее значение имеют естественный фон радиации и различные химические соединения, попавшие в биосферу.

Замечено, что мутации чаще встречаются у растений и животных в районах с повышенной естественной и искусственной (техногенной) радиоактивностью.

Частота возникновения спонтанных мутаций зависит от генотипа, возраста, физиологического состояния организма и т. д. У старых самок ожидаются более частые случаи нерасхождения хромосом при созревании яйцеклеток. При длительном хранении гамет с большей частотой могут происходить изменения в ДНК. Это вероятно при нарушении сроков осеменения животных.

В процессе цитогенетического анализа можно выделить животных, не имеющих в кариотипе каких-либо изменений, и особей, у которых находят разрывы и пробелы хромосом, полиплоидные клетки, другие структурные и числовые аберрации. По специальным методикам у одних индивидуумов обнаруживают нарушения формирования синаптонемного комплекса в мейозе, повышенную частоту сестринских хроматидных обменов и высокий процент клеток с микроядрами. *Повышенная частота числовых и структурных аномалий хромосом, наблюдаемая у отдельных особей, определяется термином «хромосомная нестабильность».*

Гены-мутаторы. Исследования, проведенные на мухе-дрозофиле и других объектах, указывают на различия по частоте мутаций в разных хромосомах. По данным Н. П. Дубинина, частота возникновения летальных мутаций в Ххромосомах дрозофилы составляет в среднем 0,15 % за поколение; в Yхромосоме — 0,5 %. Мутация гена, обуславливающая желтый цвет мухи, возникает с частотой 0,29 на 10 тыс. гамет, а мутации вырезки на крыльях — 1,5. Таким образом, способность к мутациям у отдельных генов различна.

На дрозофиле, бактерии кишечной палочки и других организмах показано наличие генов, ускоряющих спонтанную частоту мутаций в других генах. Эти гены получили название генов-мутаторов. Впервые существование генамутатора широкого действия обнаружил у мухи-дрозофилы Г. Г.

Тиняков в 1939 г. Полагают, что гены-мутаторы воздействуют на определенные этапы репликации ДНК, например на нарушение нормального синтеза азотистых оснований, изменение свойств ДНК-полимеразы.

Индукцированный мутагенез

Раньше считали, что мутации возникают только под действием внутренних факторов (внутренней среды организма), имеющих место при синтезе ДНК, репродукции хромосом, делении клеток. Ошибки, или «опечатки», в строении генетического материала, казалось бы, не зависели от условий внешней среды. Действительно, первые попытки вызвать мутацию искусственно были безуспешными. Однако уже в 1925 г. Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов наблюдали широкий спектр мутаций у грибов, вызванных воздействием лучами радия.

Широкий интерес у биологов вызвали сообщения Г. Меллера (1927), обнаружившего мутационное действие рентгеновских лучей у дрозофилы. В дальнейшем у нее при облучении стали получать самые разнообразные мутации, что способствовало изучению строения генетического материала, взаимодействия мутантных генов и др. В начале 30-х годов В. В. Сахаров, М. Е. Лобашов открыли мутагенное действие отдельных химических веществ Л. А. Рапопорт в России и Ш. Ауэрбах в Англии обнаружили химические соединения с сильным мутагенным действием. В ряде работ, начало которых, очевидно, положено С. М. Гершензоном, открывшим мутагенный эффект при включении экзогенной ДНК в геном дрозофилы, показана возможность индуцирования генных и хромосомных мутаций у животных биологическими агентами, среди которых вирусы, бактерии и другие объекты.

Открытие явления индуцированного мутагенеза привело к обнаружению целого ряда факторов, веществ и агентов, способных изменять наследственный материал клеток. В соответствии с природой их

подразделяют на три класса мутагенов: физические, химические и биологические.

Физические мутагены

Основными мутагенами этого класса являются ионизирующие излучения, ультрафиолетовые лучи, повышенная температура, влажность и др. К группе ионизирующих излучений относят рентгеновские лучи, β -лучи и α -частицы, протоны, нейтроны и другие факторы.

Основные механизмы их действия:

- 1) нарушение структуры генов и хромосом;
- 2) образование свободных радикалов, которые вступают в химическое взаимодействие с ДНК;
- 3) разрывы нитей ахроматинового веретена деления; 4) образование димеров.

Одним из основных мутагенных факторов антропогенного воздействия является ионизирующее излучение. Для человека дозой, удваивающей частоту естественных структурных мутаций, является доза в 10 Бэр. Этот показатель был принят за максимально возможную дозу радиации комитетом ООН по радиации. Для зародышевых тканей подобный показатель колеблется в пределах от 10 до 150 Бэр. По данным Национальной академии США, минимальной дозой является доза в 20 Бэр, что составляет 170 МБэр в год (27000 новорожденных с различными наследственными дефектами).

Ионизирующие излучения, проникая в клетки, на своем пути вырывают электроны из молекул, что приводит к образованию положительно заряженных ионов. Освободившиеся электроны присоединяются к другим молекулам, которые становятся отрицательно заряженными. В результате облучения клеток образуются свободные радикалы водорода (H) и гидроксида (OH), которые тотчас дают новые соединения, в том числе активный пероксид водорода (H₂O₂). Такие превращения в молекулах ДНК и

кариотипе в итоге приводят к изменению функций генетического аппарата клеток, абберациям хромосом и возникновению точковых мутаций.

Экспериментально установлено, что частота мутаций, индуцированных ионизирующими излучениями, прямо пропорциональна дозе радиации. Под действием ионизирующих излучений чаще всего возникают структурные перестройки хромосом и реже — генные мутации. Так, при облучении морских свинок и домашних свиней И. Л. Гольдман и С. Фотиева обнаружили различный спектр аббераций хромосом.

Транслокации и инверсии наблюдали в соматических клетках поросят, полученных при осеменении свиноматок облученной спермой. Опыты показывают, что при облучении половых клеток часть их оказывается совсем нежизнеспособной или с умеренными нарушениями. Из последних образуются зиготы, которые обычно скоро отмирают вследствие сильных изменений в генотипе («доминантные летали»).

В опыте Фриса и Странцингера у свиноматок, осемененных облученной спермой при дозе 600 Р, было в среднем 7,7 поросят, а при дозе 800 Р — 5,4 против 9,7, полученных при осеменении нормальной спермой.

Ионизирующие облучения могут нарушить процессы деления в соматических клетках, вследствие чего возникают нарушения и злокачественные образования. Сильное облучение может вызвать смерть.

Химические мутагены

Это вещества химической природы, способные индуцировать мутации. К химическим мутагенам относятся:

- а) природные органические и неорганические вещества (нитриты, нитраты, алкалоиды, гормоны, ферменты и др.);
- б) продукты промышленной переработки природных соединений — угля, нефти, древесины, соединения тяжелых металлов, пищевые отходы и т.д.

в) синтетические вещества, ранее не встречавшиеся в природе (пестициды, инсектициды, пищевые консерванты и добавки, лекарственные вещества, промышленные отходы и синтетические соединения);

г) некоторые метаболиты организма человека.

Химические мутагены обладают большой проникающей способностью, вызывают преимущественно генные мутации и действуют в период репликации ДНК.

Механизмы их действия:

- 1) дезаминирование;
- 2) алкилирование;
- 3) замены азотистых оснований их аналогами;
- 4) ингибция синтеза предшественников нуклеиновых кислот.

Выраженными мутагенными свойствами обладают отдельные химические вещества, используемые в промышленности и сельском хозяйстве, к наиболее сильным из них относят алкилирующие соединения (диметил- и диэтилсульфат, иприт и его производные, нитрозоэтил- и нитрозоэтилмочевину, этилметансульфонат, фотрин, фосфемид).

Мутагенный эффект алкилирующих соединений связан с введением в ДНК метиловых, этиловых, пропиловых и других радикалов, в результате чего происходят реакции метилирования, этилирования. Сильно выраженным мутагенным эффектом обладают аналоги азотистых оснований и нуклеиновых кислот (5-бромурацил, 5-бромдезоксимуридин, 5-фтордезоксимуридин, 8-азогуанин, аминопурин, кофеин и др.), акридиновые красители (акридин желтый и оранжевый, 5-аноакридин, профлавин и др.), а также азотистая кислота, гидроксилламин, формальдегид, пероксиды, уретан и т. д.

Мутагенным действием обладают пестициды, гербициды, используемые в агрономии для борьбы с вредными насекомыми и сорными растениями. Мутации могут быть индуцированы и минеральными удобрениями, прежде

всего нитратами, которые превращаются сначала в нитриты, а затем в активные нитрозоамины.

Химические мутагены индуцируют как генные, так и хромосомные мутации. Особенности этих мутагенов — аккумуляция и передача при делении клеток в последующей генерации, более высокая частота индуцирования генных мутаций, чем aberrаций хромосом. Химические мутагены дают широкий спектр видимых хромосомных aberrаций. Например, в экспериментах С. Ш. Исамухамедова по изучению действия фотрина, фосфемида и проспирина на кариотип свиней обнаружены хроматидные и изохроматидные делеции, а также хроматидные обмены и гэпы (бреши). *Гэн* — хромосомная aberrация, заключающаяся в частичном разрушении хроматиды и образовании ахроматического пробела, а также в отсутствии одного или нескольких нуклеотидов в одной из цепей ДНК.

Биологические мутагены.

К биологическим мутагенам относятся:

- а) вирусы (краснухи, кори, гриппа);
- б) невирусные паразитарные агенты (микоплазмы, бактерии, риккетсии, простейшие, гельминты).

Механизмы их действия:

- 1) вирусы встраивают свою ДНК в ДНК клеток хозяина;
- 2) продукты жизнедеятельности паразитов — возбудителей болезней — действуют как химические мутагены.

Простейшие живые организмы, вызывающие мутации у животных, составляют класс биологических мутагенов. К ним относятся вирусы, бактерии, а также гельминты, актиномицеты, растительные экстракты и др. Мутагенное действие вирусов открыто генетиком Н. И. Шапиро. Мутагенными свойствами обладают живые вакцины. Мутагенное действие этих организмов связано с проникновением в клетки чужеродной ДНК. Биологические мутагены вызывают широкий спектр мутаций в клетках

животных. Например, при изучении кариотипа клеток телят, ягнят и поросят, зараженных вирусом свиней лихорадки, были обнаружены различные типы aberrаций — делеции, хромосомные разрывы, фрагментация, пульверизация, полиплоидия и эндоредупликация хромосом. Установлено, что уровень aberrаций хромосом зависел от дозы и продолжительности действия вируса.

Исследования показывают, что многие лекарственные препараты, используемые в медицине и ветеринарии (сульфаниламиды, производные тиазинового ряда, нитрофураны и др.), обладают мутагенными свойствами. Такой же эффект возможен вследствие использования антибиотиков, а также некоторых кормовых добавок и консервантов, особенно при их передозировке.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В результате использования производственных процессов в промышленном и сельском хозяйстве в окружающей среде — воздухе, почве, воде — накапливаются огромные количества веществ, часть из которых обладает мутагенной и тератогенной активностью. Среди них особое значение имеют химические мутагены — ДДТ, гексахлорбензол и другие пестициды из класса хлорированных углеводородов, которые способны накапливаться в живых организмах. В районах интенсивного сельского хозяйства источником мутагенов являются нитраты.

Перевод животноводства на промышленные технологии в нашей стране сопровождался концентрацией поголовья животных на ограниченных территориях ферм и комплексов, что вызывает повышение концентрации микрофлоры, в том числе возбудителей различных болезней.

Вирусы, непосредственно внедряясь своим генетическим аппаратом в геном клеток животных или через свои биологические субстраты, обладающие антигенными свойствами, могут стать сильным фактором

индуцированного мутагенеза. Для профилактики и лечения бактериальных и вирусных инфекций, инвазий используют инаktivированные, а также животные вакцины, сыворотки, широкий арсенал синтезированных фармакологических средств, что, безусловно, даёт положительный эффект. Однако следует оценивать и побочные результаты ветеринарной терапии, что может проявляться в повышении частоты нарушений хромосом и ДНК в половых и соматических клетках самих животных, изменениях программы развития их эмбрионов. Вместо повышения жизнеспособности из-за такого рода мутаций будут происходить ослабление резистентности, снижение продуктивности животных и т. д.

Особенно серьезную опасность представляют химические загрязнения среды разведения животных. Если всего три десятилетия назад основным удобрением полей был перегнивший навоз, то сейчас в основном используют химические удобрения. Это приводит к концентрации в кормах нитритов и нитратов, вредное действие которых на организм известно. Второй фактор — борьба с вредителями полей, садов и огородов. Она основана также на применении химических соединений — пестицидов, гербицидов, инсектицидов, которые обладают очень сильными мутагенными свойствами. Их применение приводит к тому, что увеличивается до 40% и более частота встречаемости (у растений, возделываемых на обрабатываемых почвах) аберрантных клеток.

Отмечается, что большинство пестицидов устойчивы к химическому и биологическому разложению и имеют высокий уровень токсичности. Перечень вредных химических веществ, с которыми контактируют животные, огромен.

В этой связи важное значение имеет экологический мониторинг среды разведения животных, предусматривающий определение характера и уровня химических веществ в почве, воде, кормах и теле животных. Необходимо

создание экологических карт хозяйств и регионов, на которые наносится соответствующая информация.

Авария на Чернобыльской АЭС привела к радиоактивному загрязнению огромных территорий РФ, Украины и Белоруссии. Возникла глобальная проблема оценки генетических последствий этой катастрофы на различные биологические объекты, в том числе сельскохозяйственных животных.

В развитии повреждений генома от облучения ионизирующим излучением существенное значение имеют остаточные повреждения ДНК.

При первичном облучении небольшими дозами повреждения ДНК обычно незначительные и легко репарируются. При повторном (а тем более хроническом) облучении могут возникнуть нерепарируемые изменения в структуре ДНК. Некоторые исследователи говорят о стимулирующем воздействии на организм малых доз радиации.

При облучении увеличивается количество анеуплоидных клеток и хромосомных aberrаций (разрывы, фрагментация). Также очень часто (примерно в 70% случаев) встречаются генные мутации, которые не определяются цитогенетическими методами.

Радионуклиды сами по себе являются мощным фактором индукции мутаций, прежде всего повреждая целостность хромосом и вызывая aberrации. Но оказалось, что они при взаимодействии с химическими мутагенами способны усугублять ситуацию.

Молекулярно-генетические методы идентификации мутаций

Разработка молекулярных методов детекции мутаций основана на следующих основных принципах:

Комплементарность нуклеотидных оснований: аденин всегда гибридизуется с гуанином, а тимин с цитозином.

При нагревании происходит разъединение цепей ДНК (денатурация), т.е. нормальная двухцепочечная спираль ДНК расщепляется на две

одноцепочечные.

При охлаждении (ренатурации) происходит восстановление двухцепочечной структуры в соответствии с правилом комплементарности нуклеотидов;

Расщепление молекулы ДНК может быть достигнуто с помощью специальных бактериальных ферментов – эндонуклеаз, рестрицирующих молекулу ДНК в местах со строго определенной для каждой эндонуклеазы последовательностью нуклеотидов.

Фрагменты ДНК в акриламидном или агарозном гелях легко разделяются под действием электрического тока; положение фрагментов ДНК при электрофорезе определяется размерами ДНК фрагментов.

Составитель
Себежко Ольга Игоревна

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА

Методические указания к практическим занятиям

В авторской редакции
Компьютерная вёрстка О.И. Себежко

Формат 60x84 1/16..3,6 уч-изд. л.
4,0 усл. печ. л.