

Подписано электронной подписью:

Вержицкий Данил Григорьевич

Должность: Директор КГПИ ФГБОУ ВО «КемГУ»

Дата и время: 2024-02-21 06:00:00

471686fad2945b30e274c7284bc5661ab55c9d30210dc10e75e03a5b6fdf6436

А. Г. Жуклова, Н. В. Кизиченко,

А. Г. Горохова

Молекулярная биология

Учебник с упражнениями и задачами

Утверждено Ученым советом ЕГФ НФИ КемГУ

(протокол Ученого совета факультета № 6 от 11.01.2018)

Одобрено на заседании методической комиссии

(протокол методической комиссии ЕГФ № 2 от 30.11.2017)

Одобрено на заседании кафедры естественнонаучных дисциплин

и методики преподавания (протокол № 3 от 29.03.2017)



Москва
Берлин
2018

УДК 577.2(075)

ББК 28.070я73

Ж86

Рецензенты:

Сазонтова Т. Г. – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории адаптационной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;
Михайлова Надежда Николаевна – доктор биологических наук, профессор, зав. кафедры естественнонаучных дисциплин и методики преподавания НФИ КемГУ

Жукова, А. Г.

Ж86 Молекулярная биология : учебник с упражнениями и задачами / А. Г. Жукова, Н. В. Кизиченко, А. Г. Горохова. – Москва ; Берлин : Директ-Медиа, 2018. – 268 с.

ISBN 978-5-4475-9674-3

В учебнике рассмотрены основные положения современной молекулярной биологии, приведены сведения о структурных и функциональных аспектах матричного биосинтеза нуклеиновых кислот и белков. Изложены современные представления о молекулярных механизмах регуляции клеточного цикла, фолдинге белков и программируемой клеточной гибели. В учебник введены задачи по молекулярной биологии и тесты, обеспечивающие студентам активное изучение материала.

Учебник предназначен для студентов естественно-географического факультета учреждений высшего образования. Может быть полезен аспирантам, магистрантам и преподавателям вузов.

УДК 577.2(075)

ББК 28.070я73

ISBN 978-5-4475-9674-3

© Жукова А. Г., Кизиченко Н. В., Горохова А. Г., текст, 2018
© Издательство «Директ-Медиа», оформление, 2018

Предисловие

Учебник «Молекулярная биология» предназначен для студентов естественно-географического факультета, изучающих дисциплину «Молекулярная биология и генетика» вариативной части федерального цикла ООП по направлению подготовки 44.03.01 и 44.03.05 – педагогическое образование по профилям «Биология», «Биология и химия» и «География и биология».

Учебник составлен в соответствии с государственным образовательным стандартом высшего образования и учебной программой по дисциплине «Молекулярная биология и генетика» для педагогических вузов.

В учебнике рассмотрены основные положения современной молекулярной биологии, приведены сведения о структурных и функциональных аспектах матричного биосинтеза нуклеиновых кислот и белков. Изложены современные представления о молекулярных основах регуляции клеточного цикла и программируемой клеточной гибели.

В учебник введены рубрики: «Задания для аудиторной работы», «Задания для внеаудиторной работы», «Основные термины и понятия», «Задания для самоконтроля» и ответы к ним. Каждая из рубрик играет важную роль в усвоении материала. «Задания для аудиторной работы» дают возможность под контролем преподавателя решать задачи по молекулярной биологии, что является важным мотивирующим фактором для изучения данной дисциплины. «Задания для внеаудиторной» работы помогают студентам самостоятельно разобраться в теоретическом материале по молекулярной биологии. В рубрике «Основные термины и понятия» обращается внимание обучающегося на главные и новые для него термины, и понятия, которые далее будут использоваться при изучении молекулярной биологии и других дисциплин естественнонаучного цикла, в частности генетики, генетики человека, эволюционной теории.

В каждой главе учебника имеются схемы и иллюстрации, которые облегчают понимание молекулярных механизмов изучаемых процессов.

Глава 1

Структура и функции нуклеиновых кислот

Самые крупные из молекул, образуемых живыми организмами, являются нуклеиновые кислоты – **ДНК** и **РНК**. О функциях ДНК и РНК ничего не знали до начала 1940-х годов. Однако в **1940** году бельгийский биолог Жан Браше (1909–1998), показал, что чем активнее в тех или иных клетках идёт белковый синтез, тем больше в ней РНК [Багоцкий С. В., 2016].

1.1. Основные достижения молекулярной биологии. Доказательства генетической роли нуклеиновых кислот

Термин «молекулярная биология» принадлежит Фрэнсису Крику. Однако этот термин был впервые употреблён в 1938 году Уорреном Уивером, который отметил, что «в тех пограничных областях, где физика и химия пересекаются, возникает новый раздел науки – **молекулярная биология**, начинающая приоткрывать завесы над многими тайнами живой клетки».

Молекулярная биология – это наука о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации, о структуре и функциях таких биополимеров, как нуклеиновые кислоты и белки.

Молекулярная биология изучает связь между генетической информацией и признаками организма, которые реализуются с помощью белков. Основными процессами, которые исследуются в молекулярной биологии, являются репликация, транскрипция и трансляция. Именно благодаря им происходит передача и реализация наследственной информации, и потомки получают те же признаки, что и родители.

Важнейшие достижения молекулярной биологии

1868 г. – первым исследовал ДНК шведский химик Фридрих Мишер. Из суспензии клеточных ядер он выделил кислое вещество, которое назвал **нуклеином**.

1927 г. – Кольцов Н. К. предположил, что наследственные признаки передаются с помощью «гигантской наследственной молекулы, построенной, возможно, из двух зеркальных цепей».

1927 г. – Г. Мёллер показал, что тончайшие наследственные структуры хромосом могут скачкообразно изменяться под действием рентгеновских лучей: таким образом возникают превращения одних генов в другие.

1939 г. – в работе Торбьёрна Касперссона (*Torbjörn Caspersson*), Жана Брачета (*Jean Brachet*) и Джека Шульца (*Jack Schultz*) была предсказана определяющая роль РНК в синтезе белка.

1944 г. Доказательство генетической роли ДНК – Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод, Маклин Мак-Карти.

1953 г. Установление структуры ДНК – Д. Уотсон, Ф. Крик.

1956–1957 гг. – А. Н. Белозерский и А. С. Спирин независимо доказали существование мРНК, а также выяснили, что основную массу РНК в клетке составляет рибосомальная РНК (рРНК).

1961 г. Открытие генетической регуляции синтеза ферментов – Андре Львов, Франсуа Жакоб, Жак Моно.

1966 г. Расшифровка генетического кода – М. Ниренберг, С. Очоа, Г. Корана.

1967 г. Синтез *in vitro* биологически активной ДНК – Артур Корнберг (1918) – американский биохимик, открыл фермент ДНК-полимеразу, с помощью которого синтезировал биологически активную ДНК.

1970 г. Химический синтез гена – Г. Корана (1922) – американский биохимик, впервые синтезировал ген аланиновой тРНК.

1970 г. Открытие фермента обратной транскриптазы и явления обратной транскрипции – Говард Тимин, Дэвид Балтимор, Ренато Дульбеко.

1974 г. Открытие ферментов рестрикции – рестриктаз – Гамильтон Смит, Даниэль Натанс, Вернер Арбер.

1978 г. Открытие сплайсинга – Филипп Шарп.

1990 г. Стартовал международный проект «Геном человека». В этом проекте участвовали учёные из США, Великобритании, Франции, Германии, Японии и Китая. Эти страны образовали Международный консорциум по секвенированию генома человека.

В нашей стране с идеей секвенирования генома человека выступил в **1988** г. академик Александр Александрович Баев (1903–1994), и в **1989** г. был организован Научный совет по программе «Геном человека». В **1990** г. была создана Международная организация по изучению генома человека (HUGO), вице-президентом которой в течение нескольких лет был академик Андрей Дарьевич Мирзабеков (1937–2003). С самого начала работ по геномному проекту учёные договорились об открытости и доступности всей получаемой информации для его участников независимо от их вклада и государственной принадлежности. Работа над всеми 23 хромосомами человека была поделена между странами-участницами. Российские учёные должны были исследовать структуру 3-й и 19-й хромосом. К **2001** г. было секвенировано примерно 90 % генома, но значительная часть всей последовательности оставалась всё ещё в виде фрагментов длиной в несколько тысяч пар нуклеотидов. В апреле **2003** г. было объявлено о завершении расшифровки практически всей последовательности генома человека – около 99 % районов, содержащих гены, были секвенированы с точностью 99,99 %.

1993 г. При изучении ретровирусов обнаружена и описана микроРНК – это конечная двухцепочечная молекула РНК, функция которой связываться с зрелой мРНК при участии комплекса ферментов. В настоящее время у человека описано 738 микроРНК.

1998 г. Крэйг Мэллоу и Эндрю Файер открыли явление РНК-интерференции – в результате связывания микроРНК с мРНК происходит частичная или полная приостановка трансляции белка с мРНК, или же полный распад молекулы мРНК при участии РНКаз цитоплазмы. В **2006** г. Эндрю Файер и Крэйг Мэллоу получили Нобелевскую премию за открытие явления РНК-интерференции.

Доказательства генетической роли нуклеиновых кислот

Самый первый и наиболее яркий пример, демонстрирующий роль ДНК как вещества наследственности, относится

к 1928 г. Явление, получившее название **трансформации**, впервые было обнаружено бактериологом Фредериком Гриффитом при изучении пневмококковой инфекции у мышей (рис. 1.1). Гриффит брал два штамма пневмококков – капсульный и бескапсульный. Капсульный – это патогенный (вирулентный) штамм, при инфицировании таким штаммом мыши погибают. Бескапсульный – непатогенный штамм, бескапсульные клетки легко фагоцитируются в организме мышей и поэтому непатогенны для животных. Если же животных инфицировать смесью живых бескапсульных неvirulentных и инактивированных (убитых) нагреванием капсульных клеток, то животные погибают от пневмококковой инфекции. В лёгких погибших животных были обнаружены вирулентные клетки. На основании полученных результатов Гриффит сделал вывод, что в убитых нагреванием патогенных клетках присутствует **трансформирующий фактор**, превращающий непатогенные живые клетки в вирулентные. Это изменение было стабильным – трансформированные пневмококки давали патогенное потомство.

Обнаруженное явление Гриффит интерпретировал как трансформацию. **Трансформация** – это приобретение одним организмом некоторых признаков другого организма за счет захвата части его генетической информации.

Это открытие Ф. Гриффита положило начало исследованиям, направленным на установление химической природы трансформирующего фактора.

В 1944 г. этот эксперимент был повторен Освальдом Эйвери, Колином Мак-Леодом и Маклином Мак-Карти. Им удалось выделить трансформирующий фактор и показать, что это молекула ДНК (рис. 1.2). Они смешивали неvirulentные пневмококки с взятыми от вирулентных пневмококков белками, липидами, углеводами, РНК и ДНК. В результате этого эксперимента была выявлена природа трансформирующего фактора.

Трансформирующим фактором оказалась ДНК!

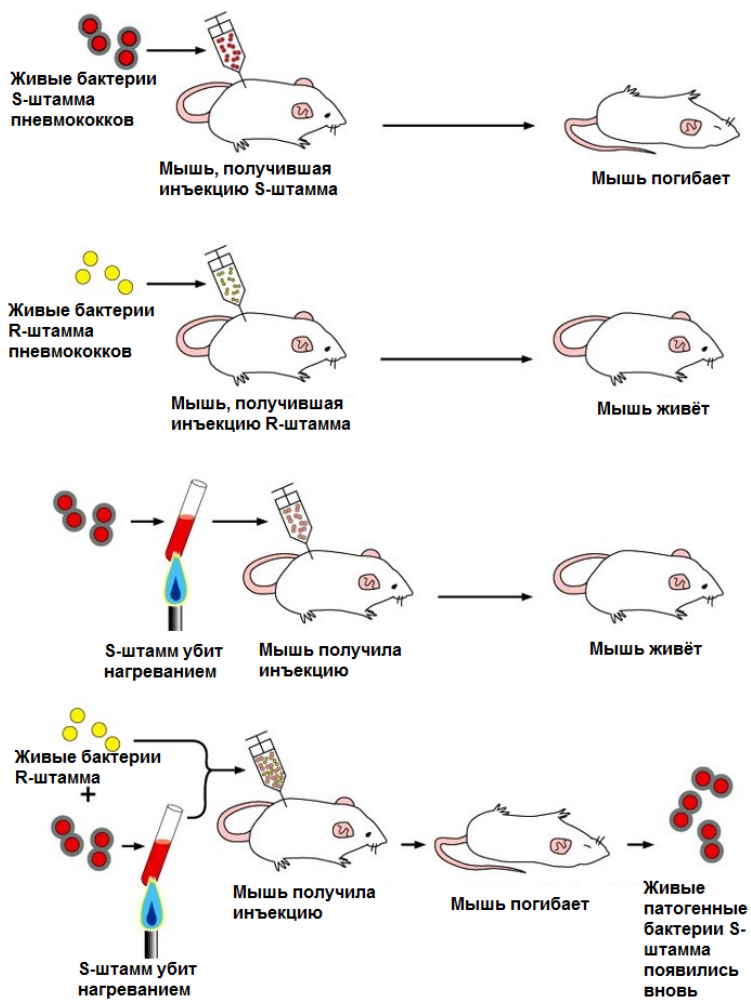


Рис. 1.1. Гриффит показал, что убитые нагреванием бактерии могут вызывать трансформацию живых бактерий (по Албертсу Б. с соавт., 2015)

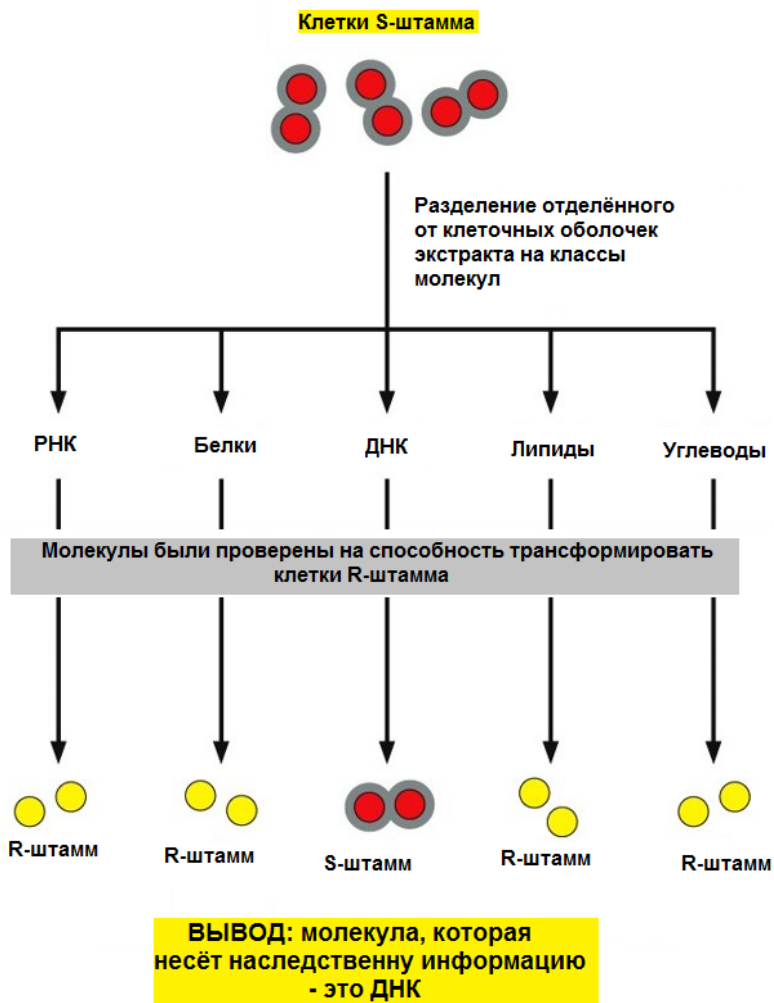


Рис. 1.2. О. Эйвери, К. Мак-Леод и М. Маккарти показали, что ДНК – это носитель генетической информации (по Албертсу Б. с соавт., 2015)

Экспериментальное доказательство того, что трансформирующий фактор – это ДНК, сводилось к следующим положениям:

1) элементный химический состав очищенного трансформирующего фактора был близок к рассчитанному элементному составу для ДНК;

2) оптические, электрофоретические свойства, поведение при ультрацентрифугировании соответствовали свойствам ДНК;

3) экстракция белков и липидов не вызывали потери трансформирующей активности;

4) обработка препарата трипсином и химотрипсином не влияла на трансформирующую активность;

5) обработка препарата РНКазой не влияла на трансформирующее начало;

6) только обработка препарата ДНКазой приводила к потере трансформирующей активности.

Таким образом, было показано, что в результате трансформации бескапсульных пневмококков, именно ДНК определяет появление соединения, отличного по химической природе от самой нуклеиновой кислоты, а именно синтез капсульного полисахарида. Однако даже после таких достаточно убедительных экспериментальных данных долгое время считали, что ДНК может определять биосинтез только полисахаридов и только у бактерий, но не является веществом наследственности вообще.

Следующее доказательство генетической роли ДНК было получено в **1952** г в экспериментах, проведённых на совершенно другой системе (рис. 1.3). Альфред Херши и Марта Чейз инфицировали клетки кишечной палочки (*E. coli*) фагом T_2 (фаги или бактериофаги – это вирусы, размножающиеся в бактериях), у которого белковая оболочка была мечена радиоактивной серой (S^{35}), а ДНК – радиоактивным фосфором (P^{32}). Затем полученную смесь встряхивали в блендере, чтобы отделить заражённых бактерий от пустых вирусных оболочек. Когда исследователи измерили радиоактивность, они обнаружили, что большая часть помеченной P^{32} ДНК попала внутрь бактериальных клеток, тогда как большая часть помеченных S^{35}

белков осталась в растворе с пустыми оболочками вирусов. Эксперимент доказал, что вирусная ДНК попадает внутрь бактериальных клеток, а вирусные белки – нет. Значит, генетический материал в вирусах представлен ДНК. В совокупности с исследованиями, проведёнными Эйвери, Мак-Леодом и Маккарти, этот эксперимент окончательно доказал, что носитель генетической информации – ДНК.

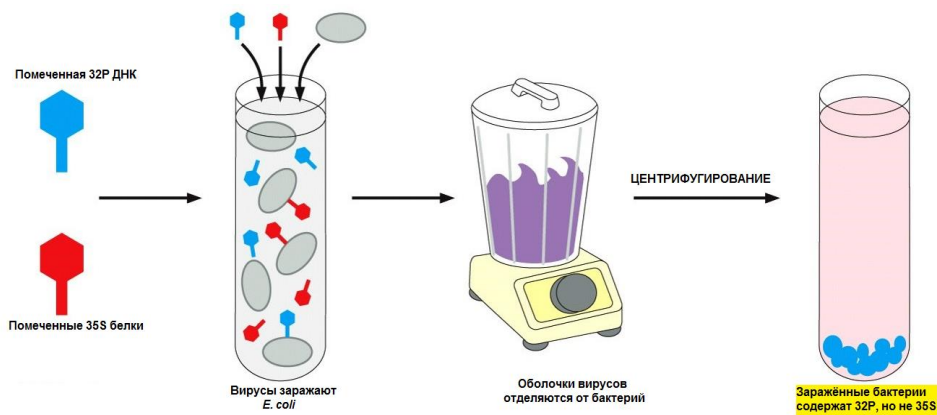


Рис. 1.3. А. Херши и М. Чейз однозначно показали, что гены состоят из ДНК
(по Алберту Б. с соавт., 2015)

На сегодняшний день существует сотни тысяч доказательств генетической роли нуклеиновых кислот. Приведённые три являются классическими.

1.2. Структура и функции нуклеиновых кислот

1861 г. – швейцарский врач И. Ф. Мишлер выделил из ядер лейкоцитов вещество кислой природы, которое назвал **нуклеином**; позже это вещество начали называть нуклеиновой кислотой.

1889 г. – нуклеин разделён на нуклеиновую кислоту и белок. Появился термин «нуклеиновая кислота». Рихард Альтман.

1891 г. – благодаря работам А. Косселя стал известен состав нуклеиновых кислот. После гидролиза в них обнаружили сахар, фосфат и азотистые основания: пуриновые и пиримидиновые.

Долгое время РНК считалась компонентом растений, включая грибы, а ДНК рассматривалась как типичный компонент животных клеток. Затем оказалось, что ДНК наряду с РНК, широко распространена у растений. В 1930-х гг. благодаря работам А. Н. Белозерского установилось окончательное понимание того, что и РНК, и ДНК – два универсальных типа нуклеиновых кислот, присущих всем царствам живого мира.

В 1940-х гг. на основе цитологических и биохимических исследований стало складываться представление, что ДНК, постоянно локализующаяся в ядрах клеток, в их хромосомах, самым тесным образом связана с аппаратом наследственности, а РНК – это обязательный компонент клеточной цитоплазмы, ответственный за биосинтез белка.

Было установлено, что:

1. Содержание ДНК в любой клетке организма постоянно и не зависит от условий внешней среды.

2. Количество ДНК увеличивается по мере нарастания сложности клетки.

3. Каждый вид имеет свой специфический нуклеотидный состав ДНК.

4. Каждый организм содержит участки ДНК, сходные с участками ДНК его родителей, но ДНК каждого индивидуального живого организма уникальна.

В конце 1940-х годов Эрвин Чаргафф (1905–2002) показал, что при разложении самых разных образцов ДНК образуется столько же молей тимина, сколько и аденина, а количество молей цитозина равно количеству молей гуанина. Однако соотношение тимина и цитозина в ДНК разных организмов неодинаково. Установленные им закономерности получили название **«правила Чаргаффа»**.

В 1938 году Уильям Астбери (1898–1961) получил первые картины дифракции на образцах ДНК. На основании их анализа он сделал вывод, что азотистые основания в ДНК расположены стопками друг над другом и расстояние между соседними основаниями постоянно.

Фактическим материалом для расшифровки структуры ДНК стали рентгенограммы, сделанные в Королевском колледже

Лондонского университета, в отделении биофизики, которым руководил сэр Джон Рэндалл [Багоцкий С. В., 2016].

Знаменитую «фотографию 51» (рис. 1.4), полученную молодой исследовательницей Розалиндой Франклин (1920–1958), Джеймсу Уотсону показал Моррис Уилкинс.

Дифракционные данные указывали на то, что ДНК имеет спиральную структуру, но другие особенности строения оставались пока непонятными. Д. Уотсону и Ф. Крику было известно, что:

- 1) молекула ДНК – это спираль;
- 2) согласно «правилу Чаргаффа» аденинов в ДНК должно быть поровну с тиминами, а гуанинов – с цитозинами;
- 3) гидрофильные фосфаты находятся снаружи молекулы, существующей в водном растворе, а гидрофобные азотистые основания – внутри. Этого не учёл знаменитый американский химик Лайнус Полинг (1901–1994), незадолго до этого установивший структуру α -спирали белка – в предложенной им модели, оказавшейся ошибочной, азотистые основания располагались снаружи.



Розалинд Франклин,
1920–1958



Морис Уилкинс,
1916–2004

Рис. 1.4. Рентгенограмма ДНК

Примечание: пятна образуют крест в центре различной спиральной структуры. Тёмные полосы по бокам образованы повторяющимися основаниями.

В конце **1952** года Фрэнсис Крик задумался о возможности образования нековалентных водородных связей между двумя

азотистыми связями. Джон Гриффит (химик-теоретик) рассчитал энергию этих связей, отражающую их прочность. Из расчётов было видно, что наиболее прочные связи образуются между аденином и тиминном, а также между гуанином и цитозином [Багоцкий С. В., 2016].

Идея о том, как может быть устроена ДНК, пришла в голову Джеймсу Уотсону **28 февраля 1953 года**. Из этой идеи стало принципиально понятно, каким образом ДНК может самокопироваться и воспроизводить свою структуру из поколения в поколение. Проверка показала, что расчётные рентгенограммы такой модели совпадают с реальными.

Таким образом, по Уотсону и Крику ДНК – это полимер, состоящий из двух цепей, соединённых множеством водородных связей. Эти связи образуются между азотистыми основаниями, причём аденин всегда связан с тиминном, а гуанин с цитозином.

В конце **1953** года Ф. Крик и Д. Уотсон публикуют ещё одну статью в журнале «Nature», где высказывают мнение о том, что в последовательности азотистых оснований в молекулах ДНК закодированы последовательности аминокислот в белках – тем самым все наследственные признаки живых организмов.

В **1894** г. в сообщении «О химической природе микроорганизмов» (опубликовано после 9-го Всероссийского съезда естествоиспытателей и врачей, который проходил в декабре 1893 г. в Москве) профессор Александр Андреевич Колли попытался вычислить сколько молекул помещается в клетке. И пришёл к выводу – **очень мало!** Получается парадокс: признаков, передаваемых по наследству очень много, а молекул (без которых нельзя передавать признаки) мало... Колли ошибался в расчётах. Однако, этот парадокс – малое число молекул и множество признаков – впечатался в сознание Н. К. Кольцова. Он думал о нём многие годы, пытаясь разрешить разными способами. Н. К. Кольцов опубликовал своё решение в **1927** г. в докладе на 3-м Всесоюзном съезде зоологов, анатомов и гистологов – **признаки, передаваемые по наследству, определяются линейным расположением мономеров в полимерных**

молекулах (Кольцов думал, что это последовательность аминокислот в полипептидах). **Эти гигантские полимерные молекулы** (их в самом деле мало в клетке) **размножаются по принципу матриц...** Эта идея матричного синтеза была забыта не понявшими её современниками [Шноль С. Э., 2012].



Николай Константинович Кольцов

В 1925 г. учеников Н. К. Кольцова и С. С. Четверикова – супругов Тимофеевых-Ресовских (по рекомендации Н. К. Кольцова и Н. А. Семашко) Советское правительство командировало для работы в Германию в институте профессора Фогта. Н. В. Тимофеев-Ресовский рассказывал об идее матричного синтеза на своих, ставших знаменитыми семинарах в Берлин-Бухе, в своих многочисленных докладах на конференциях, съездах в разных странах, в том числе на семинарах Нильса

Бора в Копенгагене. Он не только излагал и развивал идеи Н. К. Кольцова, но и проводил экспериментальные исследования. Так была выполнена знаменитая работа трёх авторов Н. В. Тимофеева-Ресовского, немецкого физика К. Г. Циммера и М. Дельбрюка. В этой работе они определяли частоту мутаций у дрожжей в зависимости от интенсивности радиоактивного облучения. В результате был оценён размер гена – **ген оказался молекулярных размеров, его длина порядка трёх ангстрем** [Шноль С. Э., 2012].

И эта идея (матричного синтеза), за которую Кольцова высмеивали, быстро стала общепринятой настолько, что никто уже не может указать авторства. Это, возможно, единственный в истории науки на земле пример, когда абстрактная сначала идея была воплощена вся, до мелких деталей, и все сформулированные задачи нашли решение [Шноль С. Э., 2016].

ДНК и **РНК** это полимерные макромолекулы, участвующие в хранении и переносе генетической информации. Они построены из мономерных звеньев – **нуклеотидов**. Нуклеотиды присутствуют во всех без исключения живых клетках, выполняя целый ряд важных функций. В их числе:

- 1) построение нуклеиновых кислот;
- 2) перенос энергии (АТФ);
- 3) образование коферментов (НАДН);
- 4) участие в роли акцепторов в окислительном фосфорилировании (АДФ);

- 5) выступают в качестве аллостерических регуляторов активности ряда ферментов и «вторичных посредников» (цАМФ и цГМФ).

Нуклеотид состоит из трёх частей – азотистого основания, моносахарида и одной или нескольких фосфатных групп. В составе ДНК и РНК к нуклеотидам присоединена одна фосфатная группа. **Сахар**, входящий в состав нуклеотида – это **пентоза**, которая может присутствовать в одной из двух форм: β -D-рибозы и β -D-2-дезоксирибозы. Азотистые основания представляют собой производные одного из двух соединений – пурина или пиримидина. В нуклеиновых кислотах в основном

присутствуют **два пуриновых** производных – аденин и гуанин и **три пиримидиновых** – цитозин, тимин и урацил (рис. 1.5). Некоторые названия азотистых оснований отражают историю их открытия. Так, гуанин изначально был выделен из гуано (птичьего помёта), а тимин – из тимуса.

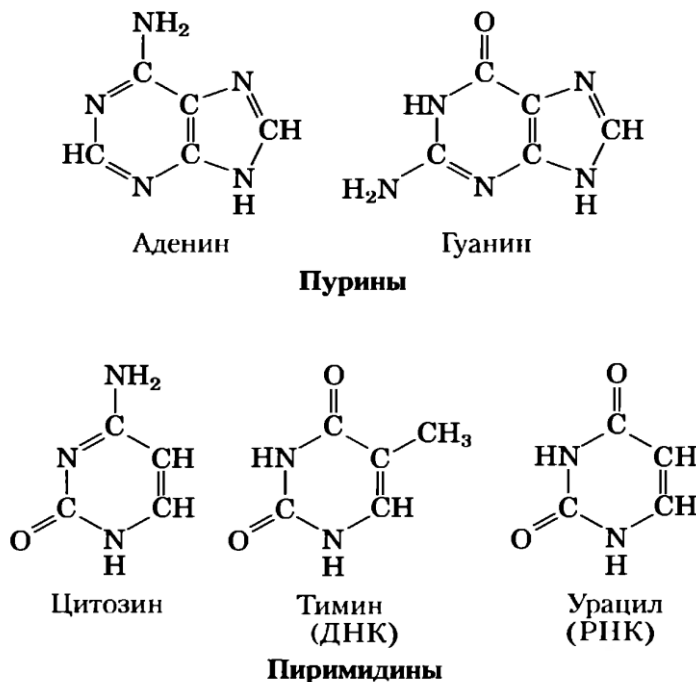


Рис. 1.5. Основные пуриновые и пиримидиновые основания нуклеиновых кислот

В рибонуклеиновых кислотах используются основания А, Г, С и У, а в дезоксирибонуклеиновых – А, Г, С и Т. Основание присоединяется к сахару с помощью β -N-гликозидной связи, соединяющей С₁-атом пентозы с N₁-атомом пиримидина или с N₉-атомом пурина.

РНК и ДНК построены из ковалентно связанных рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов, соответственно. Нуклеотиды соединяются между собой с помощью фосфодиэфирных

ДНК

5'-конец

Фосфодиэфирная связь

5'

3'

РНК

5'-конец

3'-конец

3'-конец

18

Молекула ДНК представляет собой двойную спираль, которая удерживается за счёт двух типов сил – водородных связей между парами оснований и стэкинг-взаимодействий между параллельными плоскостями соседних оснований (рис. 1.7).

Водородные связи между основаниями строго специфичны, и этот факт имеет очень большое значение, как для структуры ДНК, так и для её биологической функции. Эти связи были открыты и изучены Э. Чаргаффом в 1945 г. и получили название **принципа комплементарности**, а особенности образования водородных связей между основаниями называются **правилами Чаргаффа**.

Независимо от видовых различий, во всех ДНК:

1) молярное соотношение аденина к тимину равно 1 ($A=T$, или $A/T=1$);

2) молярное соотношение гуанина к цитозину равно 1 ($G\equiv C$, или $G/C=1$);

3) сумма пуриновых нуклеотидов равна сумме пиримидиновых нуклеотидов;

4) в ДНК из разных источников отношение $G+C/A+T$, называемое коэффициентом специфичности, неодинаково.

Определённые последовательности ДНК могут иметь необычное пространственное строение. Так, в спиралях ДНК встречаются изгибы везде, где расположены подряд четыре или более остатков аденозина. Шесть аденозинов подряд образуют изгиб под углом $\sim 18^\circ$. Такая кривизна, образуемая этой или другой последовательностью, играет важную роль при связывании ДНК с некоторыми белками.

Достаточно распространённый тип последовательности ДНК – это так называемый **палиндром**. Палиндром – это слово, фраза или предложение, которое звучит одинаково при чтении слева направо и справа на лево, например, КАЗАК; ПОТОП; А РОЗА УПАЛА НА ЛАПУ АЗОРА; МЁД ЖДЁМ; НЕСУ РАЗНОЕ НЕ СУРАЗНОЕ. Этот термин применяется для обозначения участков ДНК с инвертированными

повторами последовательностей оснований, которые имеют симметрию второго порядка для двух цепей ДНК (рис. 1.8).

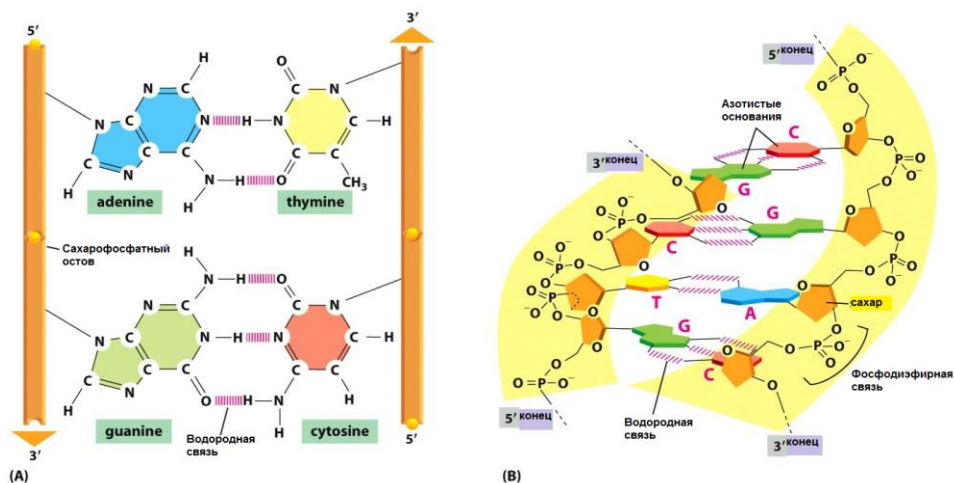


Рис. 1.7. Две цепи двойной спирали ДНК удерживаются вместе при помощи водородных связей между комплементарными парами азотистых оснований (по Альбертсу Б. с соавт., 2015)

Примечание: А – форма и химическое строение азотистых оснований делают возможным образование устойчивых водородных связей только между аденином и тиминном и между гуанином и цитозином, в которых атомы, способные образовывать водородные связи, оказываются близко друг к другу без деформации двойной спирали; В – короткий участок ДНК, вид сбоку. Нуклеотиды соединены между собой ковалентными фосфодиэфирными связями между 3'-гидроксильной ($-OH$) группой одного сахара и 5'-фосфатной ($-PO_4$) группой следующего за ним сахара. Такая связь придаёт каждой полинуклеотидной цепи направленность, а два конца одной цепи отличаются друг от друга по своему химическому строению: 3'-конец несёт свободную OH -группу, присоединённую к 3'-атому дезоксирибозы, 5'-конец несёт свободную фосфатную группу, присоединённую к 5'-атому дезоксирибозы.

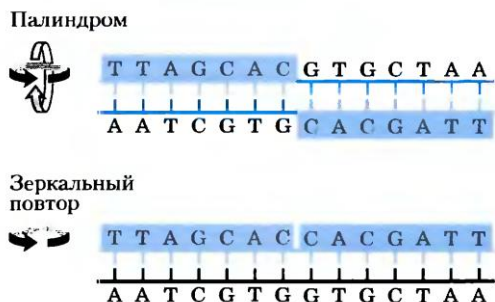


Рис. 1.8. Палиндромы и зеркальные повторы (по Нельсон Д., Кокс М., 2012)

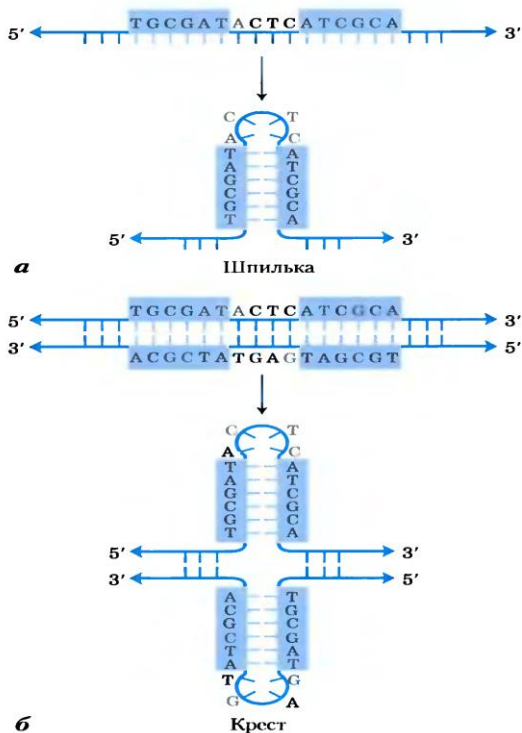


Рис. 1.9. Шпильки и кресты (по Нельсон Д., Кокс М., 2012)

Примечание: палиндромные последовательности ДНК (или РНК) могут по-разному сворачиваться с образованием пар между основаниями внутри цепи; а) шпилька – в образовании структуры участвует

только одна последовательность ДНК (или РНК); б) крест – вторичная структура из палиндромных последовательностей, образованная при участии двух нитей ДНК. Синим закрашены асимметричные участки ДНК, которые комплементарны последовательностям в той же или в другой цепи.

Такая последовательность комплементарна самой себе, и поэтому может образовывать структуры типа **шпилька** или **креста** (две симметричные шпильки (рис. 1.9)). Если инвертированные повторы встречаются в одной цепи ДНК, такие последовательности называют **зеркальными повторами**. Зеркальные повторы не являются комплементарными последовательностями для самих себя и не способны образовывать шпильки и крестообразные структуры.

Некоторые необычные структуры ДНК образуются из трёх или более цепей ДНК. Нуклеотиды, участвующие в образовании уотсон-криковских пар (рис. 1.7), могут иметь ряд дополнительных водородных связей, особенно с функциональными группами, расположенными в большой бороздке. Например, остаток цитидина (протонированный) может связываться с остатком гуанозина, участвующим в образовании нуклеотидной пары $G \equiv C$, а тимидин – с аденозином $A = T$ пары (рис. 1.10). Атомы N^7 , O^6 и N^6 пуринов могут участвовать в образовании водородных связей в триплексе ДНК. Эти атомы называются **хугстиновскими положениями**, а не-уотсон-криковские пары – **хугстиновскими парами**, по имени Карста Хугстина, который в 1963 г. первым указал на возможность существования такого необычного способа образования пар [Нельсон Д., Кокс М., 2012]. Благодаря этим нетипичным водородным связям формируется трёхцепочечная ДНК (триплекс). Некоторые трёхцепочечные структуры ДНК содержат две пиримидиновые цепи и одну пуриновую; другие состоят из двух пуриновых и одной пиримидиновой.

Четыре цепи ДНК также могут связываться друг с другом, образуя четырёхцепочечную структуру (тетраплекс или квадруплекс), но это происходит только между цепочками ДНК с высоким содержанием гуанозиновых остатков (**G-тетраплекс**).

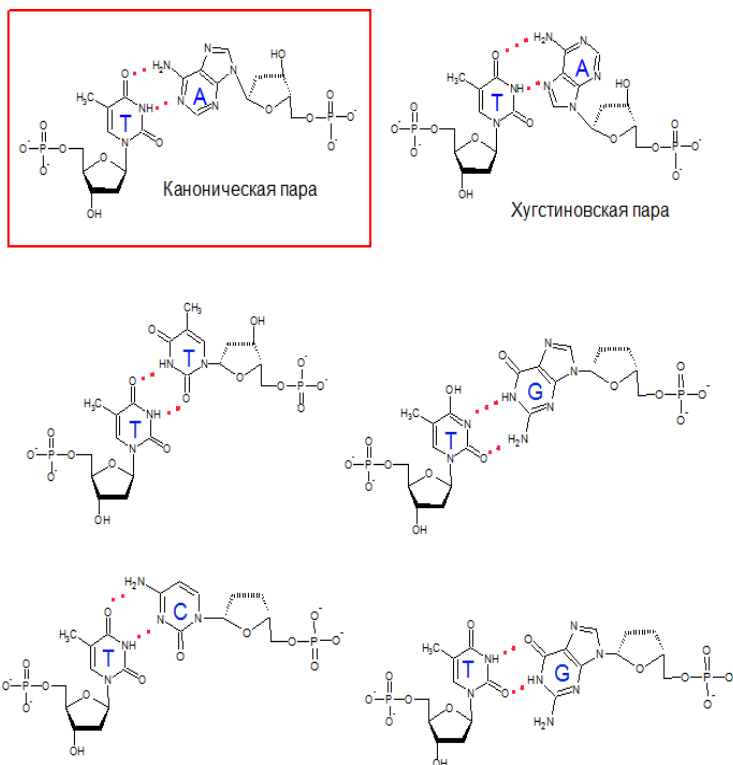


Рис. 1.10. Образование хугстиновских пар в ДНК

В ДНК живой клетки сайты узнавания многих специфических ДНК-связывающих белков представлены палиндромами, а полипиримидины и полипурины, которые могут образовывать тройные спирали или даже четырёхцепочечные (Н-ДНК), найдены в регионах, участвующих в регуляции или экспрессии некоторых эукариотических генов [Нельсон Д., Кокс М., 2012].

Функции ДНК.

1. ДНК является носителем генетической информации. Функция обеспечивается фактом существования **генетического кода**.

2. Воспроизведение и передача генетической информации в поколениях клеток и организмов. Функция обеспечивается процессом **репликации**.

3. Реализация генетической информации в виде белков, а также любых других соединений, образующихся с помощью белков-ферментов. Функция обеспечивается процессами *транскрипции* и *трансляции*.

Рибонуклеиновые кислоты

РНК повсеместно распространены в живой природе. Биологическая функция РНК обусловлена тем, что они обеспечивают реализацию в клетке наследственной информации, которая передаётся с помощью ДНК.

В клетке существует три главных типа РНК: информационная (матричная) РНК (иРНК или мРНК), рибосомальная РНК (рРНК) и транспортная РНК (тРНК). Рибосомальная РНК составляет около 80–82 % от содержания суммарной клеточной РНК, тРНК – 15–16 % и иРНК – 2–10 %. Все типы РНК принимают участие в синтезе белка.

Как и ДНК, РНК представляют собой линейные полинуклеотиды с тем же принципом организации:

- состоят из четырёх видов нуклеотидов, каждый из которых включает азотистое основание, пентозу и фосфатный остаток;
- нуклеотиды связаны в цепь с помощью 5',3'-фосфодиэфирных связей;
- полинуклеотидные цепи полярны, то есть имеют 5'- и 3'-концы.

Единственная нить РНК принимает, как правило, правозакрученную конформацию благодаря стекингovým взаимодействиям между основаниями (рис. 1.11), причём они намного сильнее между двумя пуринами, чем между пурином и пиримидином или двумя пиримидинами.

Но имеются и отличия от ДНК:

1) В отличие от ДНК молекулы всех трёх типов РНК одноцепочечные, что является одной из важных особенностей РНК. Кроме того, отличительной особенностью РНК является то, что для неё не характерно устойчивое спиральное строение.

2) Пентоза в РНК представлена рибозой, имеющей во втором положении углеродного атома гидроксильную группу. Последняя делает двухцепочечную структуру менее компактной.

3) В РНК содержатся 4 азотистых основания – аденин, цитозин, гуанин и урацил, отличающийся от тимина лишь отсутствием метильной группы в 5-м положении.

4) В РНК (особенно в тРНК) высоко содержание минорных оснований и нуклеозидов. Среди них – дигидроуридин (в урациле нет одной двойной связи), псевдоуридин, диметиладенин и диметилгуанин и многие другие.



*Рис. 1.11. Типичный правозакрученный
фрагмент одноцепочечной РНК
(по Нельсон Д., Коке М., 2012)*

Примечание: основания показаны серым, атомы фосфора жёлтым, остатки рибозы и атомы кислорода фосфатных групп – зелёным цветом.

Показано, что:

1) РНК могут формировать вторичную структуру – набор коротких спиральных участков, которые образуются за счёт антипараллельного комплементарного спаривания смежных отрезков цепи (рис. 1.12).

2) РНК способны образовывать третичную структуру за счёт дальних комплементарных взаимодействий внутри цепи и межспиральных взаимодействий (рис. 1.13).

3) Высокополимерные РНК способны сворачиваться в компактные частицы.

4) РНК обладают значительной конформационной подвижностью.

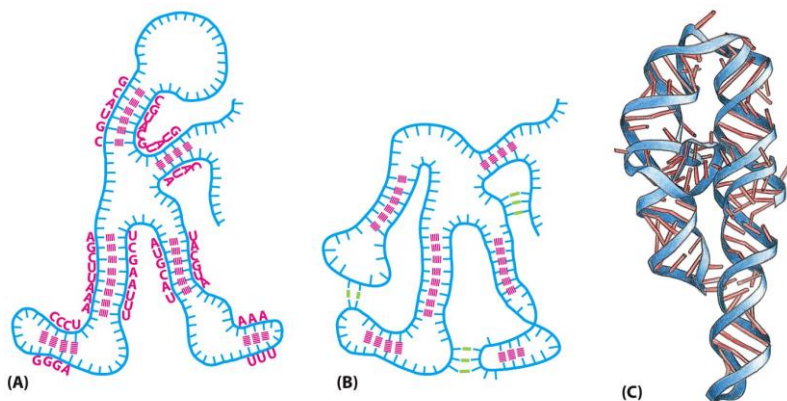


Рис. 1.12. Структуры двойных спиралей в РНК

Примечание: РНК представляет собой одноцепочечную молекулу, однако часто небольшие последовательности нуклеотидов образуют комплементарные пары с нуклеотидами той же цепочки. Такие взаимодействия наряду с «неканоническими» парами позволяют РНК сворачиваться в сложные трёхмерные структуры, специфичные для данной последовательности нуклеотидов. А – структура условной молекулы РНК, обусловленная «каноническими» (уотсон-криковскими) взаимодействиями нуклеотидов; В – такая же структура, но с участием не только «канонических» (красный цвет), но и «неканонических» (например, А-Г) связей между основаниями (зелёный цвет).

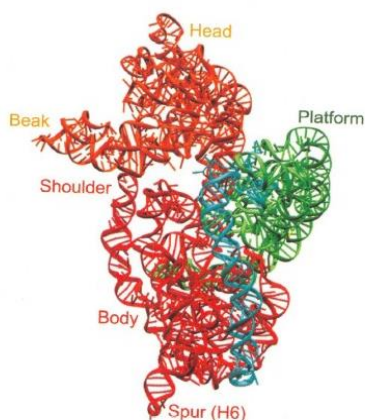


Рис. 1.13. Третьичная структура рибосомной 16S РНК

Специфические функции РНК.

Долгое время за нуклеиновыми кислотами, и в том числе за РНК, признавалась лишь генетическая функция [Спирин А. С., 2011].

1. РНК, как и ДНК могут служить матрицей для собственно-го воспроизведения через комплементарные цепи РНК – репликация РНК на матрице РНК – была показана на примере репликативного цикла ряда РНК-содержащих вирусов [Baltimore D. et al., 1966; Spiegelman S., Naruna I., 1966]. Кроме того, РНК могут служить матрицей для синтеза ДНК – явление обратная транскрипция, открытое в 1970 г. [Temine H. M., Baltimore D.].

2. Кодирующая функция – программирование белкового синтеза (мРНК) линейными последовательностями нуклеотидов. Кодирующие РНК составляют лишь малую долю клеточных РНК, а основная часть РНК представлена некодирующими РНК, куда относятся в первую очередь рибосомные РНК

3. Структурная функция – полинуклеотидные цепи РНК, как и полипептидные цепи белков, способны самосворачиваться в компактные структуры с образованием специфических третичных структур.

4. Функция молекулярного узнавания. Способность РНК к формированию компактных трёхмерных структур даёт основу для специфического взаимодействия с другими молекулами – как макромолекулами, так и малыми лигандами. Например, тРНК – среднего размера компактно свёрнутые молекулы поочередно и очень избирательно взаимодействуют сначала с аминоацил-тРНК-синтетазой и соответствующей аминокислотой, затем с фактором элонгации трансляции EF1, вместе с которым она поступает в рибосому.

5. Каталитическая функция РНК [Cech T. R. et al., 1982] – РНК может быть специфическим катализатором биохимических реакций (энзимы – рибозимы). Показано, что природные и искусственные рибозимы обладают следующими активностями [Cech T. R., Golden B. L., 1999]:

– гидролиз фосфоэфирных связей;

- трансэтерификации;
- лигирование и полимеризация нуклеотидов, в том числе на матрице ДНК или РНК;
- алкилирование и аминоацилирование нуклеотидов;
- синтез амидных (пептидных) связей между аминокислотами;
- транспептидация;
- синтез углерод-углеродных связей.

Таким образом, РНК является уникальным биополимером, которому свойственны как функции ДНК, так и функции белков.

Особенности строения мРНК [Овчинников Л. П., 1998].

Линейная цепь мРНК содержит несколько областей с различной функциональной ролью (рис. 1.14):

1) На 5'-конце находится кэп («шапочка») – участок из одного-четырёх модифицированных нуклеотидов, например, 7-метилгуанин. Такая необычная структура необходима для защиты 5'-конца мРНК от экзонуклеаз.

2) За кэпом идёт 5'-нетранслируемая область (НТО) – последовательность из нескольких десятков нуклеотидов. Эта область комплементарна одному из участков рРНК, входящей в малую субъединицу рибосомы. За счёт этого 5'-НТО служит для первичного связывания мРНК с рибосомой, но сама не транслируется.

3) Считывание мРНК начинается всегда с так называемого иницирующего кодона. Во всех мРНК это – AUG, который кодирует аминокислоту метионин.

4) За иницирующим кодоном в мРНК следует транслируемая область, в которой и содержится информация о последовательности аминокислот в белке.

5) По окончании этой области находится кодон терминации (UAA, UAG или UGA), который сигнализирует об остановке синтеза белка.

6) За этим кодоном следует 3'-НТО, значительно превышающая по длине 5'-НТО.

7) Почти все зрелые мРНК эукариот на 3'-конце содержат поли(А)-фрагмент из 150–200 адениловых нуклеотидов.

И 3'-НТО, и поли(А)-фрагмент играют важную роль в регуляции продолжительности жизни мРНК.

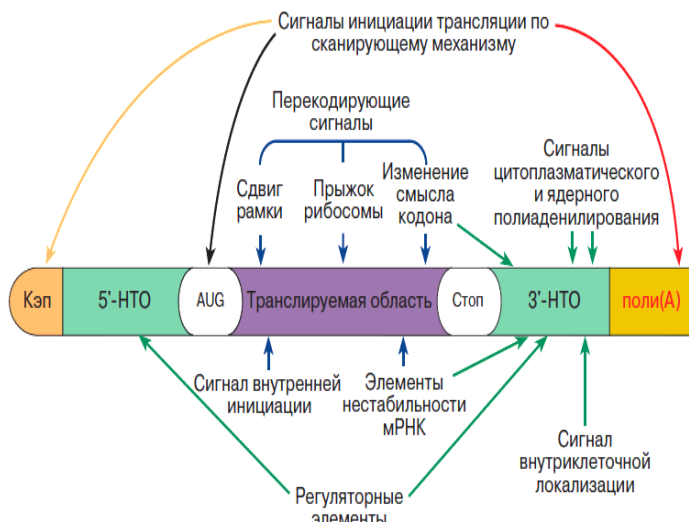


Рис. 1.14. Особенности строения мРНК (по Овчинникову А. П., 1998)

Особенности строения тРНК [Фаворова О. О., 1998].

Транспортные РНК – относительно небольшие молекулы, длина их цепей варьирует от 74 до 95 нуклеотидных остатков. Среди них высоко содержание минорных, или модифицированных, нуклеотидов: дигидроуридин и псевдоуридин; инозин, метилинозин, метилгуанин и диметилгуанин; метилуридин.

Благодаря образованию нескольких «шпилек», цепь тРНК всегда приобретает характерную структуру «клеверного листа» (рис. 1.15). В этой структуре – 4 двухцепочечных и 5 одноцепочечных участков.

Акцепторная ветвь – участок на 3'-конце из трёх нуклеотидов – ЦЦА. К А ковалентно присоединяется аминокислота.

Антикодоновая петля – участок из 7 нуклеотидов в середине цепи. Три из этих нуклеотидов выполняют функции антикодона, который комплементарно взаимодействует с соответствующим кодоном в цепи мРНК.

Дигидроуридиловая и имеющаяся не всегда дополнительная петля – способствует формированию специфичной для данной тРНК третичной структуры.

Наличие стабильной третичной структуры – ещё одна особенность тРНК: 4 двухцепочечных участка, попарно сближаясь, образуют примерно два витка двойной спирали, расположенные почти перпендикулярно друг другу, в результате молекула приобретает G-образную форму.

Основной функцией тРНК является транспорт аминокислоты на соответствующий участок мРНК в рибосомах.

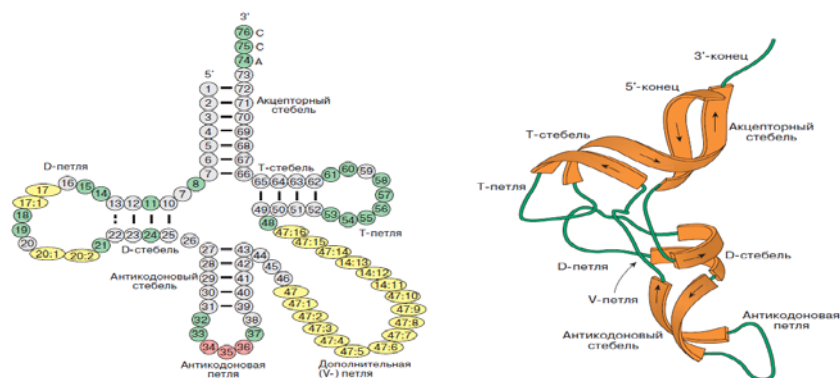


Рис. 1.15. Особенности строения тРНК (по Фаворовой О. О., 1998)

Особенности строения рРНК.

Рибосомальные РНК – основа формирования субъединиц рибосом. Малая субъединица содержит 1 молекулу 18S рРНК и около 30 молекул различных белков. Большая субъединица включает три разные молекулы рРНК: 28S рРНК, 5,8 и 5S рРНК, а также 45 белковых молекул. Все рРНК обладают развитой вторичной структурой: около 70% нуклеотидов собрано в шпильки. Кроме того, рРНК в значительной степени метилированы (CH₃-группа во втором положении рибозы, а также в азотистых основаниях).

Выделяют несколько функций, которые выполняют рРНК.

1) Рибосомальная РНК выполняет структурную функцию в рибосомах.

2) Показано, что рРНК выступает в роли своеобразного якоря, за который цепляется мРНК. В молекуле мРНК и в молекуле рРНК имеются специфические комплементарные участки. За счёт этих участков осуществляется первоначальное связывание мРНК и рибосомы.

3) Ещё одной функцией рРНК является формирование активного центра рибосомы. В активном центре происходит образование пептидных связей между молекулами аминокислот в процессе синтеза белка.

Основные термины и понятия

Антикодон

Вторичная структура нуклеиновых кислот

Килобаза

Кодон

Нуклеозид

Нуклеотид

Палиндром

Первичная структура нуклеиновых кислот

Строение и функции мРНК, тРНК, рРНК

Шпилька

Задания для аудиторной работы

Тема: Строение нуклеиновых кислот.

Анализ нуклеотидного состава нуклеиновых кислот

Задача 1. Какие типы нуклеиновых кислот Вы знаете? Какова их роль в процессах жизнедеятельности клетки?

Задача 2. Определите, какие из перечисленных соединений входят в состав молекулы ДНК: 1) рибоза; 2) дезоксирибоза; 3) остаток фосфорной кислоты; 4) тимин; 5) урацил; 6) гуанин; 7) аденин; 8) цитозин.

Задача 3. Изучите структуру трёх фрагментов двухцепочечных молекул ДНК (А, Б, В), каждый из которых содержит по 14 пар нуклеотидов.

А
5'-AATCGAGTCTTAGA-3'
3'-TTAGCTCAGAATCT-5'

Б
5'-AGTACCTAGACTAG-3'
3'-TCATGGATCTGATC-5'

В
5'-CTAAGCTAGGCATT-3'
3'-GATTCGATCCGTAA-5'

а) Подсчитайте общее число каждого из четырёх типов нуклеотидов (А, Т, G, С) и число пар $A \equiv T$ и $G \equiv C$, имеющих в составе фрагментов А, Б и В. Определите для каждого фрагмента количественные соотношения: A/T , G/C и $(A+T)/(G+C)$.

б) Фрагменты **Б** и **В** имеют одинаковый суммарный нуклеотидный состав (сравните общее число нуклеотидов и число пар $A \equiv T$ и $G \equiv C$ в этих фрагментах). Вместе с тем они различаются специфичностью чередований отдельных нуклеотидов в своих цепочках (специфичностью нуклеотидных последовательностей). Следовательно, суммарный нуклеотидный состав и нуклеотидная последовательность – два совершенно различных свойства молекулы ДНК.

Задача 4. Если фрагмент одной нити молекулы ДНК читается как **5'-AGCGTA-3'**, то какова будет структура комплементарного фрагмента второй нити?

Задача 5. Изучите следующие нуклеотидные последовательности:

а)
5'-CGAAGCGCAGUUCAGC-3'
3'-GCUUCGCGUCAAGUCG-5'

б)
5'-AATGCAACGGTA-3'

в)
5'-CGATGCAGGCCT-3'
3'-GCTACGTCCGGA-5'

г)
3'-GGAUCGCGUCAAGUAG-5'

1) Что из вышеперечисленного является фрагментом молекулы ДНК? Поясните свой ответ.

2) Что из вышеперечисленного является фрагментом РНК? Поясните свой ответ.

3) Справа от нуклеотидных последовательностей напишите названия нуклеиновых кислот.

Задача 6. Во фрагменте одной нити ДНК нуклеотиды расположены в последовательности: **5'-AAGTCTACGTAT-3'**. Определите процентное содержание всех нуклеотидов в этом гене и его длину (длина одного нуклеотида равна 0,34 нм).

Задача 7. В молекуле ДНК на долю цитидиловых нуклеотидов приходится 18 %. Определите процентное содержание других нуклеотидов в этой ДНК.

Задача 8. В молекуле ДНК обнаружено 880 гуаниловых нуклеотидов, которые составляют 22 % от общего числа нуклеотидов в этой ДНК. Определите: **а)** сколько других нуклеотидов в этой ДНК? **б)** какова длина этого фрагмента?

Задача 9. Дана молекула ДНК с относительной молекулярной массой 69 000 (относительная молекулярная масса одного нуклеотида равна 345), из них 8625 приходится на долю адениловых нуклеотидов. Найдите количество всех нуклеотидов в этой ДНК. Определите длину этого фрагмента.

Задача 10. Молекулы ДНК представителей разных видов бактерий, животных и растений отличаются друг от друга количеством нуклеотидных остатков разного вида. Важным показателем различия является количественно соотношение **(A+T)/(G+C)**.

Один из фрагментов ДНК бактерии содержит следующие нуклеотидные последовательности:

5'-AAGCATTTGGCATTTACGGCCATTTTAACCGTGTTCATGC-3'

5'-TTCGTAACCGTAAATGCCGGTAAAAATTGGCACAGTACG-5'

Рассчитайте соотношение **(A+T)/(G+C)** для этого фрагмента ДНК.

Глава 2

Методы молекулярной биологии и генной инженерии

Успехи биохимии и молекулярной биологии привели к разработке методов, которые позволяют манипулировать генами с целью изменения генотипа, а, следовательно, и фенотипических признаков организма. Это направление исследований получило название **генной инженерии**. Основная цель таких исследований – научиться исправлять наследственные дефекты, то есть лечить наследственные болезни, а также создавать новые фенотипы путём прямой пересадки генов из одного организма в геном другого.

Среди методов молекулярной биологии и генной инженерии можно выделить пять основных:

- **рестрикция** (расщепление) **ДНК** – этот метод необходим для выделения генов и манипуляций с ними;

- **клонирование ДНК** – осуществляется путём введения фрагментов ДНК или их групп в быстро реплицирующиеся генетические элементы (плазмиды или вирусы), что даёт возможность размножать гены в клетках бактерий, дрожжей или зукарнот;

- **гибридизация нуклеиновых кислот** – благодаря способности нуклеиновых кислот связываться друг с другом по принципу комплементарности, можно выявлять специфические последовательности ДНК и РНК, а также совмещать различные генетические элементы;

- **определение нуклеотидных последовательностей** (секвенирование) в клонируемом фрагменте ДНК – этот метод позволяет определить структуру генов и аминокислотную последовательность кодируемых ими белков;

- **химико-ферментативный синтез нуклеотидов** – необходим для целенаправленной модификации генов и облегчения манипуляции с ними.

Благодаря этим методам стало возможным выделение отдельных генов, определение в них последовательности оснований, а также перенос генов от одного вида организмов к другому.

2.1. Рестрикционный анализ

Первый шаг при выделении гена заключается в разрезании (рестрикции) клеточной ДНК на определённые, достаточно малые фрагменты, с которыми можно дальше работать. Главную роль в этом методе играют специфические ферменты – **рестриктазы**. Они представляют собой эндонуклеазы бактериального происхождения, предназначенные для защиты клеток бактерий от чужеродной (вирусной) ДНК. Ферменты рестриктазы получают своё название по имени бактерий (или бактериальных штаммов), из которых они выделены, а римская нумерация используется в тех случаях, когда штаммы бактерий имеют несколько таких ферментов, например, *EcoRI* означает, что рестриктаза выделена из кишечной палочки штамма R первой по счёту (табл. 2.1).

Известно три типа эндонуклеаз рестрикции: I, II и III. Рестриктазы I и III типа обычно представляют собой большие, мультисубъединичные комплексы, обладающие как эндонуклеазной, так и метилазной активностью. Эндонуклеазы рестрикции I типа разрезают ДНК в произвольном месте, которое может быть удалено более чем на 1000 пар оснований (1000 п. н.) от распознаваемой последовательности нуклеотидов. Эндонуклеазы рестрикции III типа разрезают ДНК примерно на расстоянии 25 п. н. от распознаваемой нуклеотидной последовательности. Рестриктазы обоих типов двигаются вдоль ДНК благодаря реакции, которая требует энергии АТФ [Нельсон Д., Кокс М., 2012]. Эндонуклеазы рестрикции II типа (табл. 2.1), впервые полученные Хамилтоном Смитом в 1970 г., удобнее, поскольку не требуют АТФ и разрезают ДНК в пределах самой распознаваемой нуклеотидной последовательности.

Рестриктазы осуществляют разрывы межнуклеотидных (фосфодиэфирных) связей внутри полипептидных цепей ДНК. При этом эти ферменты гидролизуют ДНК не беспорядочно – каждый фермент узнаёт свою короткую специфическую последовательность оснований и производит разрез в точно

установленном месте. Главная особенность последовательностей оснований, расщепляемых рестриктазами, заключается в том, что они, как правило, являются палиндромами (это короткие участки ДНК, в которых запись нуклеотидов слева направо в одной цепи аналогична записи справа налево в другой цепи). У различных бактерий имеются ферменты рестрикции, узнающие разные последовательности в ДНК и, следовательно, осуществляющие разрезы в разных участках (сайтах рестрикции) (рис. 2.1).

Например, фермент из *Escherichia coli* – *EcoRI* – разрезает двухцепочечную ДНК у последовательности между точками G и A. Поэтому фрагменты ДНК, полученные при помощи этой рестриктазы, всегда несут на своих концах одноцепочечные участки AAT^{*}T и T^{*}TAA, комплементарные друг другу. Кроме того, эти последовательности имеют двойную симметрию, то есть при чтении обеих цепей в направлении 5'→3' последовательности оснований идентичны. Такие участки получили название «липкие концы», поскольку они позволяют любые фрагменты ДНК, полученные при помощи одной рестриктазы, соединять друг с другом.

Таблица 2.1. Нуклеотидные последовательности, распознаваемые некоторыми эндонуклеазами рестрикции II типа (по Нельсон Д., Кокс М., 2012)

<i>Bam</i> HI	$\downarrow^*$ 5'-GGATCC-3' CCTAGG $^*\uparrow$	<i>Hind</i> III	$\downarrow$ 5'-AAGCTT-3' TTCGAA $\uparrow$
<i>Gla</i> I	$\downarrow^*$ 5'-ATCGAT-3' TAGCTA $^*\uparrow$	<i>Not</i> I	$\downarrow$ 5'-GCGGCCGC-3' CGCCGGCG $\uparrow$
<i>Eco</i> RI	$\downarrow^*$ 5'-GAATTC-3' CTTAAG $^*\uparrow$	<i>Pst</i> I	$^*\downarrow$ 5'-CTGCAG-3' GACGTC $\uparrow^*$
<i>Eco</i> RV	$\downarrow$ 5'-GATATC-3' CTATAG $\uparrow$	<i>Pvu</i> II	$\downarrow$ 5'-CAGCTG-3' GTCGAC $\uparrow$

<i>Hae</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow * \\ 5'\text{-GGCC-}3' \\ \text{CCGG} \\ * \uparrow \end{array}$	<i>Tth</i> 111I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5'\text{-GACNNNGTC-}3' \\ \text{CTGNNNCAG} \\ \uparrow \end{array}$
----------------	---	-----------------	---

Примечание: стрелками указаны фосфодиэфирные связи, расщепляемые каждой эндонуклеазой рестрикции; звёздочки – основания, которые метилируются соответствующей метилазой (где это известно); N – произвольное основание. Название каждого фермента состоит из трёхбуквенной аббревиатуры (написано курсивом) бактериального вида, из которого он получен, например, *Bam*HI – означает, что это первая (I) эндонуклеаза рестрикции, полученная из штамма H бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*.

Каждая рестриктаза узнаёт свою специфичную последовательность. Некоторые рестриктазы дают «липкие концы», другие – «тупые концы», действуя на связи, расположенные точно друг напротив друга. «Тупые концы» можно превратить в «липкие», присоединив искусственно синтезированные последовательности. Иногда к «тупым концам» присоединяют (с помощью фермента терминальная трансфераза) комплементарные «хвосты» – поли(A) и поли(T).

После расщепления длинной молекулы ДНК на более короткие фрагменты часто необходимо отделить их друг от друга [Альбертс Б. с соавт., 2015]. Обычно это делается с помощью гель-электрофореза, разделяющего фрагменты по их длине (рис. 2.2). Смесь фрагментов ДНК помещают на один конец пластинки агарозного или полиакриламидного геля, содержащего микроскопические поры. После этого к пластинке подводят напряжение. Вследствие того, что молекула ДНК отрицательно заряжена, фрагменты двигаются к положительно заряженному электроду; более длинные участки двигаются медленнее, поскольку их перемещение в большей степени затруднено агарозным матриком. Через несколько часов фрагменты ДНК оказываются распределёнными по гелю в последовательности, определяемой их размерами. Формируется набор полос, каждая из которых из молекул ДНК одинаковой длины (рис. 2.2А). Физически изолировать определённые фрагменты

из этой пластинки агарозы довольно просто: небольшой кусочек геля, содержащий необходимую полосу, можно вырезать с помощью скальпеля или бритвы, после чего из него можно выделить ДНК.

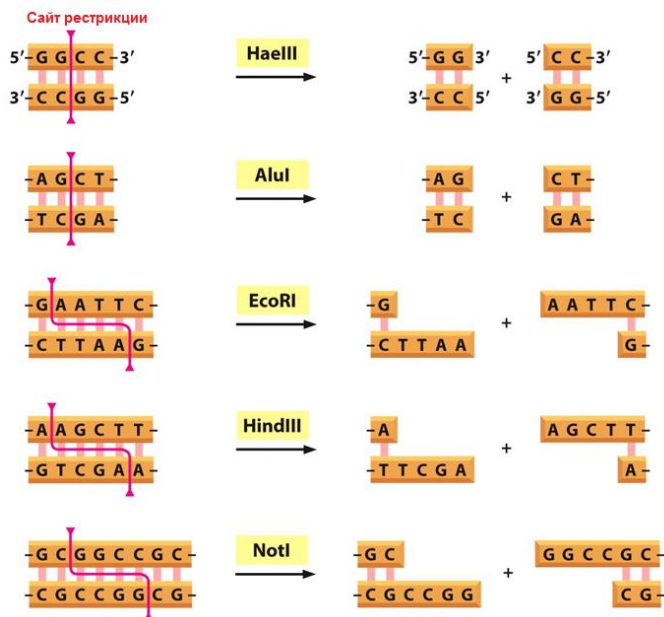


Рис. 2.1. Целевые последовательности рестриктаз различаются по частоте встречаемости в ДНК (по Альбертсу Б. и др., 2015)

Примечание: как показано на рисунке, фермент *HaeIII* разрезает ДНК по конкретной последовательности из четырёх пар нуклеотидов; эта последовательность должна в среднем встречаться чисто случайно на каждые 256 нуклеотидных пар (1 раз за 44). По тем же причинам фермент *NotI*, выбирающий мишенью последовательность из восьми пар нуклеотидов, должен в среднем разрезать ДНК через каждые 65536 пар нуклеотидов (1 раз за 48). Средние размеры фрагментов, создаваемые разными рестрикционными нуклеазами, могут сильно различаться. Эта их особенность позволяет разрезать ДНК на фрагменты наиболее удобной длины.

Полосы ДНК в агарозном или полиакриламидном геле невидимы, если ДНК не пометить или не покрасить каким-либо

способом. Один из чувствительных методов мечения ДНК – добавление к ней флуоресцентного красителя, светящегося в ультрафиолете только в присутствии ДНК (рис. 2.2В). Ещё более чувствительный метод детекции – предварительное включение в молекулы ДНК радиоизотопов перед электрофорезом; часто используется изотоп ^{32}P , поскольку его можно встроить в фосфаты ДНК и от излучает обладающие высокой энергией β -частицы, которые легко обнаружить с помощью метода автордиографии (рис. 2.2С).

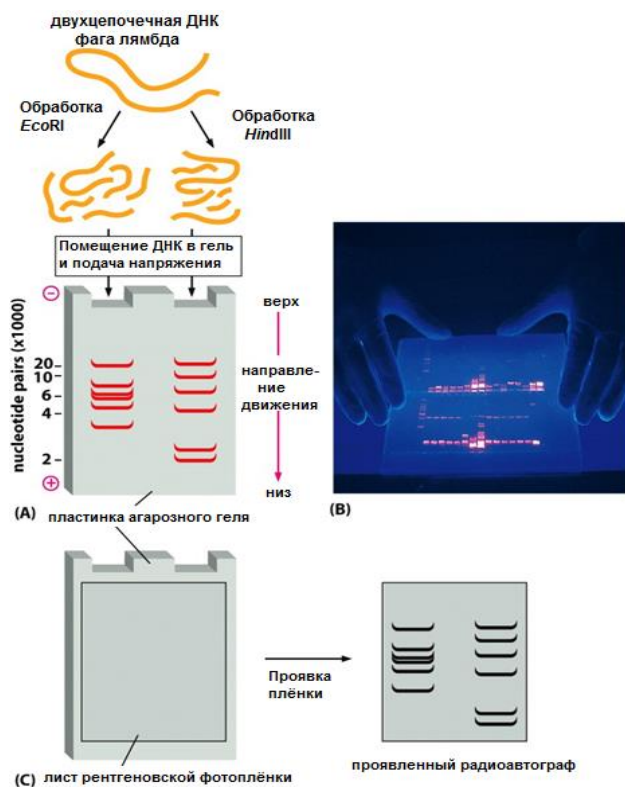


Рис. 2.2. Фрагменты молекулы ДНК можно разделить с помощью гель-электрофореза (по Альбертсу Б. и др., 2015)

Примечание: А – эта схема позволяет сравнить результаты разрезания молекулы ДНК с помощью двух разных рестриктаз: *EcoRI* (слева)

и *HindIII* (справа). Фрагменты разделяют с помощью электрофореза в геле. Поскольку длинные участки двигаются медленнее коротких, самые нижние полосы в геле содержат самые короткие фрагменты ДНК. **В** – для визуализации полос ДНК гель вымачивают в красителе, таком как бромистый этидий, который связывается с ДНК и ярко флуоресцирует в ультрафиолетовом свете. **С** – альтернативный метод визуализации полос ДНК – автордиография. Перед разрезанием с помощью рестриктаз ДНК можно пометить радионуклидом ^{32}P , заменив им часть нерадиоактивных атомов фосфора. Это можно сделать с помощью репликации вируса лямбда в присутствии ^{32}P . Поскольку β -частицы, испускаемые атомами ^{32}P , будут засвечивать фотографическую плёнку, лист плёнки, помещённый над агарозным гелем тёмной комнате, будет через некоторое время показывать положение всех полос ДНК.

2.2. Клонирование

Слово «клон» имеет греческое происхождение и означает побег или черенок, применяемый для размножения растения. Оно используется в двух смыслах. Во-первых, под термином **клонирование клеток** понимают образование группы генетически идентичных клеток, развившихся из одной клетки, например, линия иммунцитов, настроенных на синтез определённого типа антител. Под термином **молекулярное клонирование** или **клонирование генов** имеют ввиду образование множества идентичных копий гена, полученных в результате репликации одного гена, введённого в клетку-хозяина.

В настоящее время используют две схемы клонирования гена.

Согласно первой из них, геномную ДНК сначала расщепляют случайным образом с помощью ферментов рестриктаз на небольшие фрагменты примерно такой же длины, что и ген. Далее каждый фрагмент вводят с помощью **вектора** в клетку-хозяина, которая затем размножается, амплифицируя при этом ген или гены, содержащиеся в данном фрагменте.

Вектор – это молекула ДНК, способная переносить в клетку-хозяина чужеродную ДНК и обеспечивать там её амплификацию. Существует два основных типа векторов – бактериальные плазмиды и бактериофаги.

Плазмиды – это небольшие кольцевые двухцепочечные ДНК, присутствующие в цитоплазме большинства видов бактерий (рис. 2.3). В каждой плазмиде содержится от 2000 до 100 000 оснований. Плазмиды содержат несколько генов, которые реплицируются, транскрибируются и транслируются независимо от геномной ДНК бактерий. Кроме того, геном плазмид имеет систему контроля репликации, которая поддерживает их количество в бактериальной клетке на определённом уровне – обычно 20–30 плазмид.

Плазмиды обладают следующими свойствами, необходимыми для генетического манипулирования. **1.** Они могут переноситься от одной клетки к другой и даже от бактерии одного вида к бактерии другого (такие плазмиды называют **трансмиссивными**, трансмиссия – передача, перенос; у всех трансмиссивных плазмид имеются гены, отвечающие за синтез белка – пилина; именно этот белок слагает трубочки – пили, по которым ДНК при конъюгации переходит из клетки в клетку). **2.** В них можно достаточно легко встраивать чужеродные гены, которые затем переносятся в бактерии и становятся там частью генома клетки-хозяина. **3.** Плазмиды содержат гены, белковые продукты которых обеспечивают нечувствительность к тем или иным антибиотикам.

На первых этапах геной инженерии применяли естественные плазмиды бактерий. В настоящее время создают искусственные (рекомбинантные) плазмиды со стандартными свойствами, например, плаزمида pBR322 (рис. 2.4). Они обычно содержат один сайт рестрикции к какой-либо одной рестриктазе, несут два гена устойчивости к разным антибиотикам и имеют ослабленный контроль репликации. Ослабленный контроль репликации позволяет накапливать в клетке более 1000 плазмид.

Разрыв ДНК плазмиды в сайте рестрикции превращает её в линейную молекулу. Если той же рестриктазой была разрезана и чужеродная ДНК для выделения нужного гена, то этот ген можно «сплечь» ДНК-лигазой с плазмидной ДНК по одинаковым «лишним концам» (рис. 2.5). Полученная гибридная плазмида представляет собой рекомбинантную ДНК и может

существовать в бактериальной клетке долгое время. Кроме того, рекомбинантная ДНК реплицируется так же, как и исходная плазмида.

Явление переноса генетической информации при помощи вирусов называется **трансдукцией** и встречается в природе. В генной инженерии для переноса чужеродного гена в бактерии, например, *Escherichia coli* широко применяется ДНК фага λ . Геном фага λ содержит область начала репликации (*ori*), гены белков головки и хвостового отростка, а также гены ферментов, необходимые для репликации фаговой ДНК, гены лизиса инфицируемых клеток. ДНК фага представляет собой линейную молекулу, поэтому один разрыв рестриктазой приводит к образованию двух фрагментов. Эти фрагменты сшиваются с чужеродной ДНК, в результате чего образуется рекомбинантный (химерный) фаг. Этот фаг должен пройти цикл литической инфекции для накопления достаточного количества встроенной ДНК. Фаг λ может принять фрагмент чужеродной ДНК длиной 15–20 тысяч пар нуклеотидов без ущерба для его репликации. Такой размер фрагмента удобен для большинства случаев геномного клонирования.

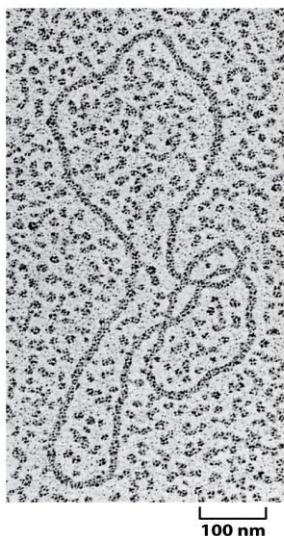


Рис. 2.3. Бактериальная плазмида — это кольцевая двухцепочечная молекула ДНК, состоящая из нескольких тысяч пар нуклеотидов (электронная микрофотография)

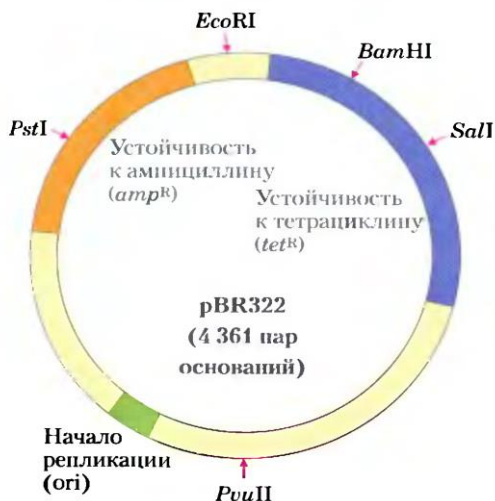


Рис. 2.4. Плазмида pBR322, созданная для *Escherichia coli* в 1977 г.

Примечание: важные преимущества плазмиды pBR322: **1.** Участок начала репликации (*ori*) – последовательность, где инициируется репликация клеточными ферментами. Эта последовательность требуется для размножения плазмиды и поддержания её в количестве 10–20 копий на одну клетку. **2.** Два гена устойчивости к различным антибиотикам (*tet^R*, *amp^R*), что позволяет идентифицировать клетки, содержащие интактную плазмиду или её рекомбинантный тип. **3.** Некоторые уникальные последовательности распознавания (*Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Pvu*II), которые являются мишенями различных эндонуклеаз рестрикции, предоставляя участки, где плазмида в дальнейшем может быть разрезана для вставки чужеродной ДНК. **4.** Малый размер (4361 п.н.), который способствует её проникновению в клетки и биохимическим манипуляциям с ДНК.

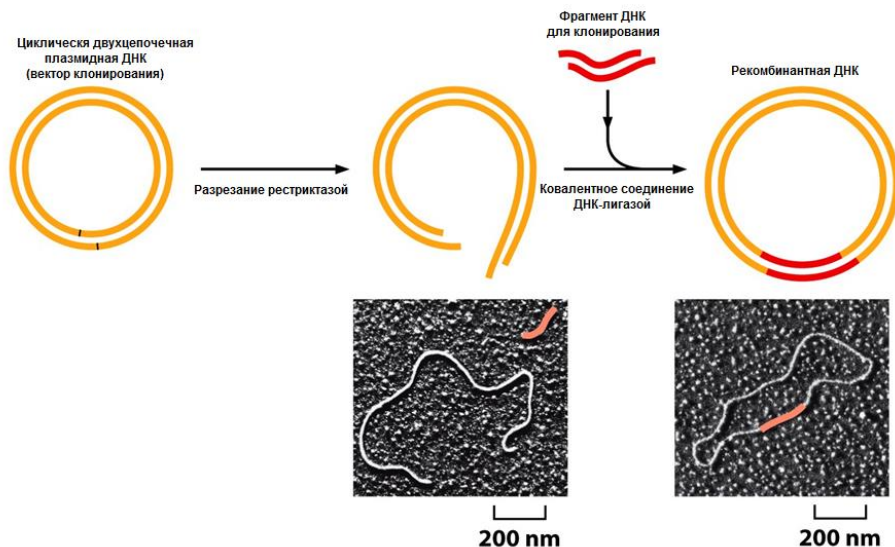


Рис. 2.5. Фрагмент ДНК вставляют в бактериальную плазмиду при помощи фермента ДНК-лигазы (по Альберту Б. и др., 2015)

Согласно второй схеме, с матричной РНК, выделяемой из одноклеточных клеток, снимают ДНК-копии (кДНК), которые затем вводят в бактериальные клетки, в среднем по одному гену на клетку, и амплифицируют тем же способом, что и в первом случае. Теперь рассмотрим подробнее вторую методику.

Матричную РНК выделяют из клеток или тканей, в которых экспрессируется искомый ген, например, для клонирования проинсулинового гена используют β -клетки поджелудочной железы. Длина молекулы мРНК для белка проинсулина составляет примерно 25 000 нуклеотидов. Затем с молекул мРНК происходит синтез копий ДНК с помощью фермента обратная транскриптаза, или ревертаза. Чтобы этот фермент начал работать, требуется короткая (около 10 нуклеотидов) одноцепочечная ДНК-затравка. Для этой цели, как правило, используют oligo(dT). Затравочная ДНК самопроизвольно образует двухцепочечный комплекс с отрезком poly(dA), который

всегда присутствует на 3'-конце молекул эукариотической мРНК. По завершении стадии копирования исходную цепь РНК разрушают либо путём щелочного гидролиза (цепи ДНК устойчивы к обработке щёлочью, а РНК полностью разрушается), либо с помощью фермента РНК-аза Н. Получившаяся ДНК является одноцепочечной, лишь на конце её молекулы образуется «шпилька» с небольшой петлёй (на 5'-конце большинства мРНК имеется последовательность, одна половина которой комплементарна другой – палиндром и эта последовательность в результате копирования оказывается и в кДНК). Двухцепочечную ДНК получают путём достраивания одноцепочечной ДНК с помощью фермента ДНК-полимераза I. Для того, чтобы этот фермент работал, также требуется затравочная ДНК. Однако здесь её заменяет короткий отрезок двойной спирали, образуемый «шпилькой». На одном из концов двухцепочечной кДНК остаётся одноцепочечная петля; она удаляется с помощью фермента нуклеазы S1. Этот фермент разрезает петлю и, кроме того, подравнивает цепочки ДНК, удаляя всю оставшуюся одноцепочечную ДНК. После такой обработки кДНК можно встраивать в вектор (рис. 2.6).

Собрание ДНК-клонов, объединённых вместе в качестве источника ДНК для секвенирования и идентификации гена или изучения его функций называется **библиотека ДНК**. Одной из самых больших библиотек ДНК является **геномная библиотека**; данные для неё получают при разрезании целого генома какого-то организма на тысячи фрагментов; все эти фрагменты клонируют путём их вставки в клонирующий вектор [Нельсон Д., Кокс М., 2012].

Существует несколько важных различий между клонами геномной ДНК и клонами кДНК (рис. 2.6). Геномные клоны – это случайный набор фрагментов ДНК генома данного организма. За редким исключением они содержат одинаковые последовательности вне зависимости от того, из каких клеток получена ДНК. Геномные клоны эукариот содержат большое количество повторяющихся последовательностей ДНК, интронов, регуляторных участков ДНК и спейсерной ДНК.

Последовательности, кодирующие белки, составляют лишь небольшую часть всей библиотеки (рис. 2.7).

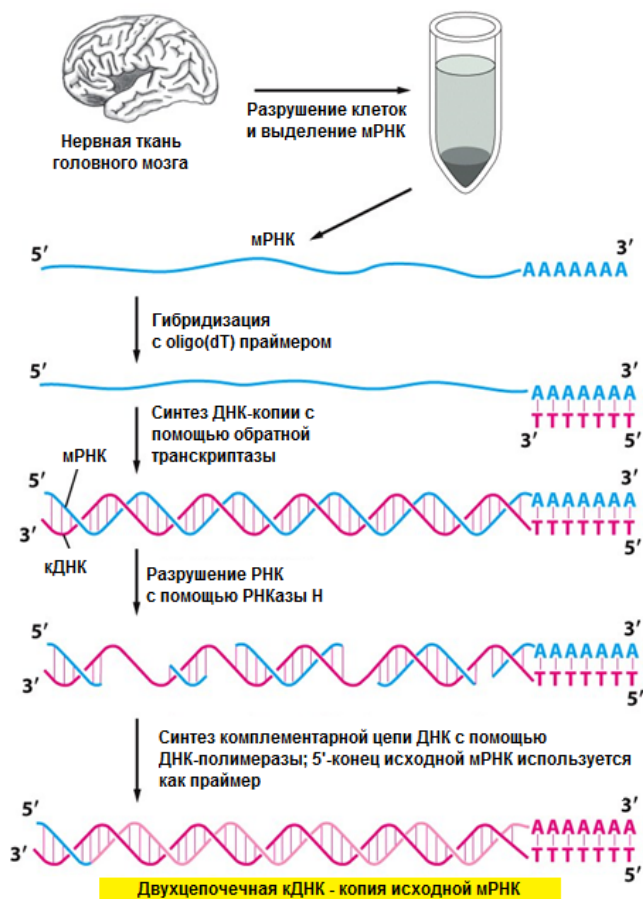


Рис. 2.6. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) на мРНК (по Альбертсу Б. и др., 2015)

Клоны кДНК отличаются тем, что несут в основном кодирующие последовательности, причём только тех генов, с которых в данной ткани считываются мРНК. Так как клетки разных тканей содержат разные наборы мРНК, из каждого типа ткани будет получена своя библиотек кДНК. Кроме того, характер

экспрессии генов меняется в ходе развития организма, так что будут различаться и библиотеки кДНК, полученные на разных стадиях развития [Альбертс Б. с соавт., 2015]. Наиболее важное преимущество клонов кДНК в том, что они содержат непрерывную кодирующую последовательность гена.

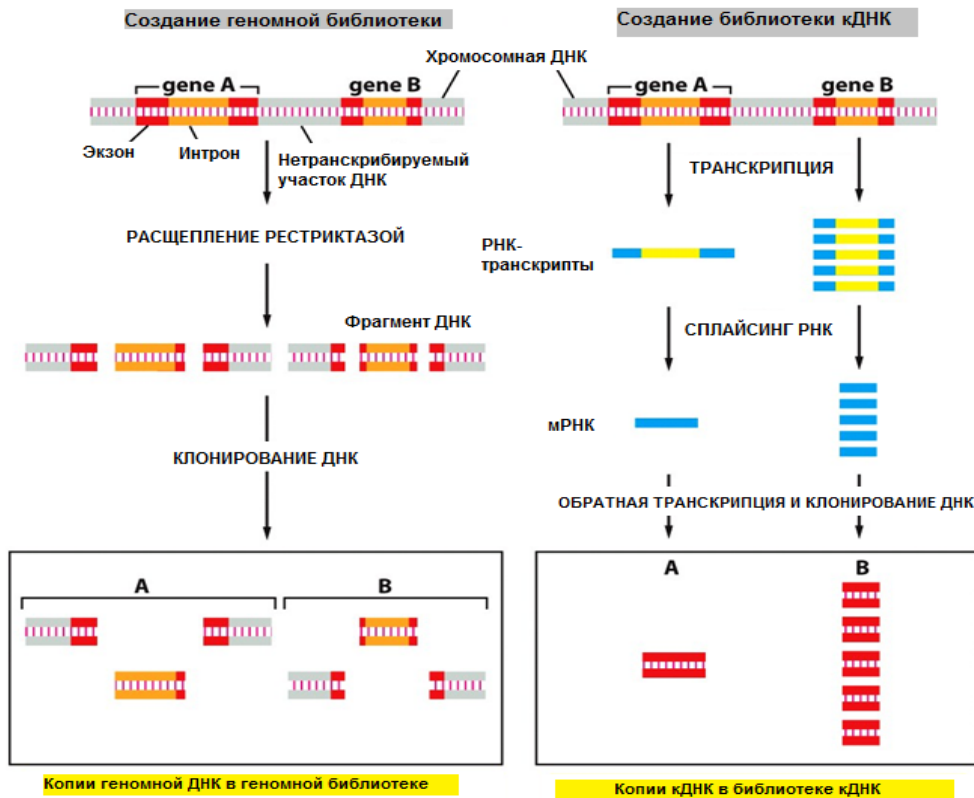


Рис. 2.6. Клонированные последовательности геномной ДНК и кДНК, полученные из одного и того же участка ДНК, различаются (по Альбертсу Б. и др., 2015)

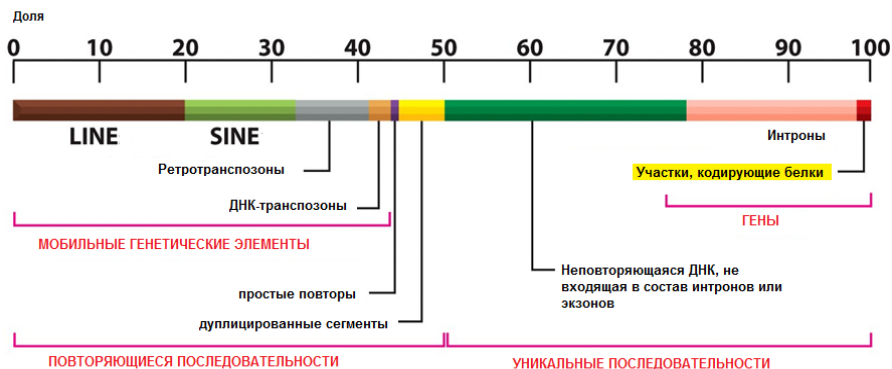


Рис. 2.7. Некодирующие и повторяющиеся генетические последовательности в геноме человека

В то же время главное преимущество геномных клонов состоит в том, что они содержат не только экзоны, но и интроны, а также регуляторные последовательности, которые определяют, когда и где экспрессируются гены. Поэтому именно геномные клоны используют для определения полной последовательности геномов.

Если известна нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, то можно значительно увеличить число его копий, применив **полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** – метод, созданный Кэри Мюллис (Kary Mullis) в 1983 г. Амплифицированную ДНК можно сразу клонировать или использовать во многих аналитических процедурах. Например, ПЦР сейчас широко применяется для создания большого числа копий любого гена из небольшого образца человеческой ДНК.

ПЦР основана на использовании ДНК-полимеразы для копирования образца ДНК в повторяющихся циклах репликации. Полимеразу направляют к необходимой последовательности короткие ДНК-праймеры, добавленные в реакционную смесь: они гибридизуются с образцом ДНК в начале и в конце необходимой последовательности. Эти праймеры предоставляют 3'-концы для ДНК-полимеразы, с которых она начинает репликацию обеих цепей. В ходе каждого цикла репликации две цепи двухцепочечной ДНК разделяются и копируются независимо.

На рис. 2.8 показаны отдельные стадии первого цикла репликации. После множества подобных циклов образуется большое число, обычно миллиарды, копий исходной последовательности (рис. 2.9).



Рис. 2.8. Праймеры направляют амплификацию необходимого фрагмента ДНК (по Альбертсу Б. и др., 2015)

Примечание: каждый цикл ПЦР включает три этапа. Сначала двухцепочечную ДНК ненадолго нагревают, чтобы отделить цепи друг от друга (1 этап). После отделения цепей охлаждение ДНК в присутствии переизбытка праймеров позволяет праймерам гибридизоваться с комплементарными последовательностями на цепях ДНК (2 этап). Затем смесь инкубируется с ДНК-полимеразой и четырьмя видами дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, чтобы ДНК синтезировалась, начиная с двух праймеров (3 этап). Затем цикл начинается заново с нагревания, чтобы отделить новые синтезированные цепи ДНК. Эта методика требует использования специальной ДНК-полимеразы (*Taq*-полимеразы), выделенной из термофильных бактерий (живут при 90°C); она устойчива при гораздо более высоких температурах, чем эукариотическая ДНК-полимераза, и не денатурирует при нагреве на первом этапе. Кроме того, нет необходимости добавлять её после каждого цикла ПЦР.

ПЦР крайне чувствительна; она может заметить единичную копию последовательности ДНК в образце, амплифицируя её так, что эту ДНК становится возможным увидеть, например, с помощью окрашивания после разделения электрофорезом в геле (рис. 2.2).

Существует несколько особенно важных областей применения ПЦР. **Во-первых**, в настоящее время это основной метод для клонирования относительно коротких фрагментов ДНК (менее 10000 п. н.) из клеток. Изначальной матрицей для реакции может быть, как ДНК, так и РНК, что позволяет с помощью ПЦР получать как полные геномные копии (с экзонами и с интронами), так и копии кДНК гена (рис. 2.10).

Во-вторых, ПЦР используют для поиска патогенов инфекционных заболеваний на очень ранних стадиях. В этом случае в качестве праймеров используют короткие фрагменты ДНК, комплементарные последовательности генома возбудителя. С помощью большого числа циклов ПЦР можно проверить наличие или отсутствие даже единичных его копий в образце крови.

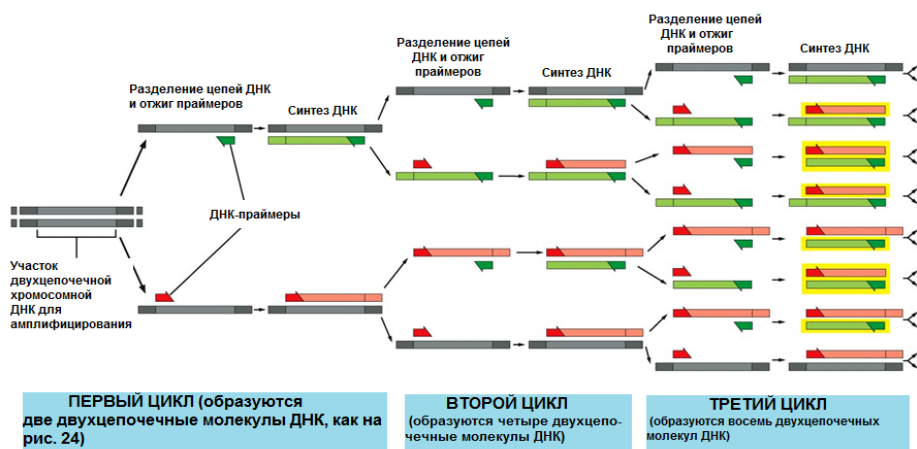


Рис. 2.9. В ПЦР используют повторяющиеся циклы разделения цепей, гибридизации и синтеза для амплификации ДНК (по Альбертсу Б. и др., 2015)

Примечание: в ходе каждого цикла происходит удвоение того количества ДНК, которое было в конце предыдущего, и через несколько циклов основная часть фрагментов ДНК идентичны последовательности исходной молекулы, заключённой между праймерами, включая их самих. На рисунке показаны три цикла реакции в которых образовано 16 цепей ДНК, 8 из них (обведены жёлтым) одной и той же длины и точно соответствуют исходному фрагменту; другие фрагменты

содержат дополнительные участки исходной последовательности ДНК, реплицируемой в первых циклах. Ещё через 4 цикла 240 из 256 цепочек ДНК будут точно соответствовать исходной последовательности, а ещё через несколько циклов практически все фрагменты ДНК будут иметь единую длину. На практике 20–30 циклов достаточно для эффективной амплификации ДНК (после 25 циклов исходная последовательность ДНК амплифицируется около 10^6 раз).

В-третьих, ПЦР широко применяется в судебной медицине. Высокая чувствительность этого метода позволяет работать с крайне маленькими образцами – мельчайшими следами крови и тканей, которые могут содержать остатки только одной клетки – и получать генетические «отпечатки пальцев» человека, от которого получен образец. Метод **снятия отпечатка ДНК** (ДНК-типирование, ДНК профилирование) был впервые описан английским генетиком Алеком Джеффрейсом в 1985 г. Снятие отпечатка ДНК основано на **полиморфизмах нуклеотидной последовательности** (как правило, это одиночные изменения пар оснований) у разных людей, в среднем одной пары на каждую 1000 [Нельсон Д., Кокс М., 2012].

Способность ДНК хранить информацию связана с такой важной её характеристикой, как последовательность нуклеотидов. Определение последовательностей нуклеиновых кислот даже из пяти или десяти нуклеотидов до конца 1970-х гг. было сложным и очень трудоёмким исследованием. Развитие двух новых методов в 1977 г. (авторами одного являются Алан Максам и Вальтер Гильберт, а другого – Фредерик Сенгер) сделало возможным секвенирование, то есть определение последовательности, даже более длинных молекул ДНК [Нельсон Д., Кокс М., 2012]. С помощью этих методов были определены полные нуклеотидные последовательности сотен тысяч генов и секвенированы геномы многих организмов, включая почкующиеся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, нематоду *Caenorhabditis elegans*, плодовую мушку *Drosophila melanogaster*, модельное растение *Arabidopsis thaliana*, а также собаку, крысу, шимпанзе, гориллу и человека [Альбертс Б. с соавт., 2015].

Самый распространённый метод секвенирования ДНК – **дидезокси-метод** – основан на том, что синтез ДНК проводят *in vitro* в присутствии специальных дидезоксинуклеозидтрифосфатов, которые терминируют синтез цепи ДНК. В этом методе фермент ДНК-полимераза образует частичные копии фрагмента, который должен быть секвенирован. Реакция репликации проводится в таких условиях, чтобы новая цепь ДНК обрывалась, достигая определённого нуклеотида (А, Т, G или С) (рис. 2.11, 2.12).

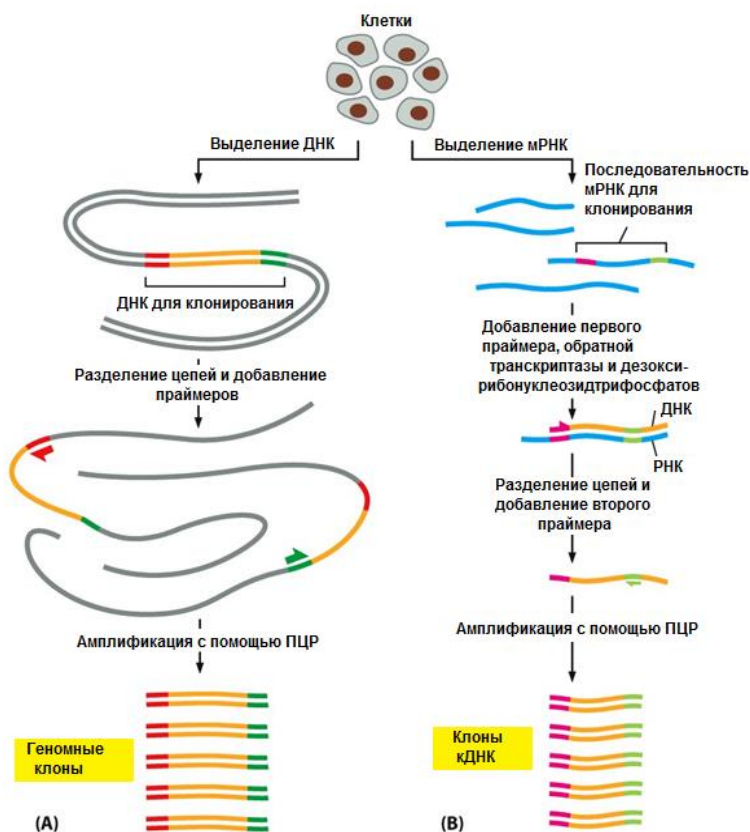


Рис. 2.10. ПЦР можно использовать для получения геномных или кДНК-копий (по Альберту Б. и др., 2015)

2.3. Определение последовательности нуклеотидов ДНК (секвенирование)

В настоящее время секвенирование ДНК полностью автоматизировано с помощью небольшого изменения метода Сэнгера, в котором дидезоксинуклеотиды, используемые для каждой реакции, метят разными флуоресцентными зондами (рис. 2.13).

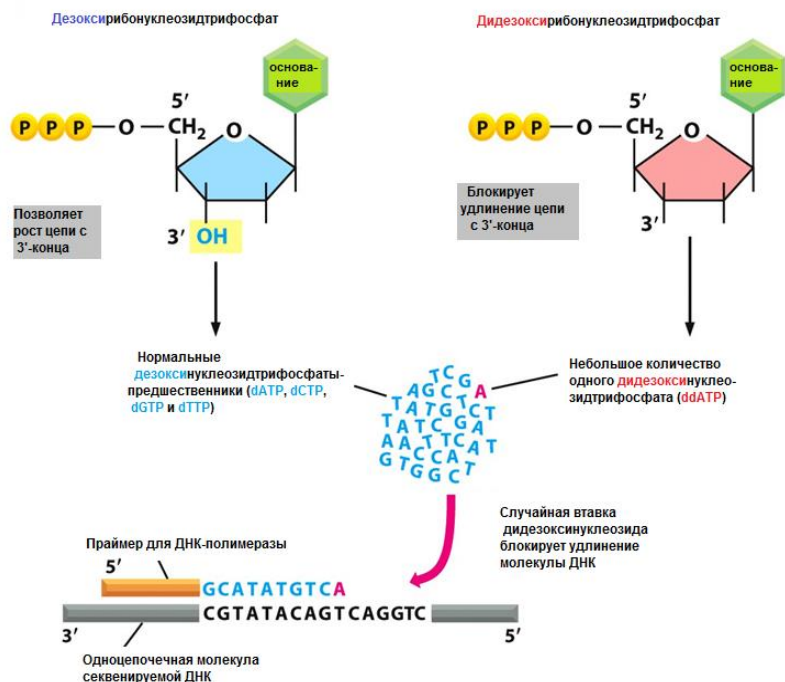


Рис. 2.11. Дидезокси-метод секвенирования ДНК основан на использовании дидезоксинуклеозидтрифосфатов, обрывающих цепь (по Альберту Б. и др., 2015)

Примечание: дидезоксинуклеозидтрифосфаты – производные нормальных дезоксинуклеозидтрифосфатов, у которых отсутствует 3'-гидроксильная группа. Очищенная ДНК реплицируется *in vitro* в реакционной смеси, содержащей одноцепочечные молекулы ДНК, которые должны быть секвенированы (серые), фермент ДНК-полимеразу, короткие ДНК-праймеры (оранжевые), чтобы полимераз

могла начать репликацию, а также четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Если в смесь добавлен дидезокси-аналог одного из нуклеозидов (например, dATP – показан *красным*), он может встроиться в растущую цепь ДНК. Когда в цепи не окажется 3'-ОН-группы, добавление следующего нуклеотида будет заблокировано, и цепь ДНК оборвется на этой позиции. Дидезокси-АТФ (*красное «А»*) конкурирует с нормальным dATP (*синие «А»*), который находится в избытке, так что ddATP вставляется в растущую цепь в случайных местах. В конце концов, в реакционной смеси образуется набор молекул ДНК различной длины, комплементарных исходному фрагменту и обрывающихся на различных А (рис. 2.12).

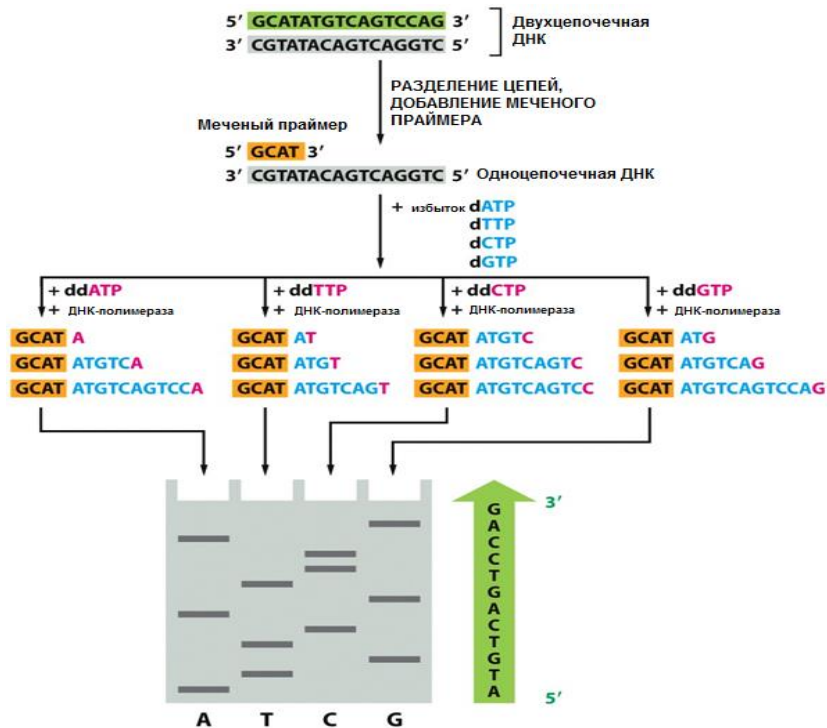


Рис. 2.12. При использовании дидезокси-метода получается набор молекул ДНК, отличающихся по длине на один нуклеотид (по Альберту Б. и др., 2015)

Примечание: чтобы определить полную последовательность фрагмента ДНК, двухцепочечную ДНК разделяют на две цепи, одна из которых служит матрицей для секвенирования. Четыре различных

дидезокси-нуклеотида, обрывающих цепь (ddATP, ddCTP, ddGTP и ddTTP, показаны *красным*), используют в четырёх отдельных реакциях синтеза ДНК с одной и той же одноцепочечной матрицей (*серая*). В результате каждой реакции образуется набор копий ДНК, обрывающихся на различных позициях последовательности. Затем продукты разделяют при помощи электрофореза на четырёх отдельных дорожках полиакриламидного геля (подписаны на рисунке как А, Т, С и G). Синтезированные фрагменты обнаруживают с использованием радиоактивной или флуоресцентной метки, строенной в праймер или один из дезосинуклеозидтрифосфатов, удлиняющих цепь. Полоски на каждой дорожке представляют собой фрагменты синтезированной ДНК, оборвавшиеся на одном из нуклеотидов (например, на А в самой левой дорожке) в различных позициях исходной ДНК. Считывая полоски, начиная снизу, и идя по всем дорожкам, можно определить последовательность синтезированной цепи. Последовательность, показанная на *зелёной* стрелке справа от геля, идентична последовательности 5'-3'-цепи (*зелёная*) исходной двухцепочечной ДНК.

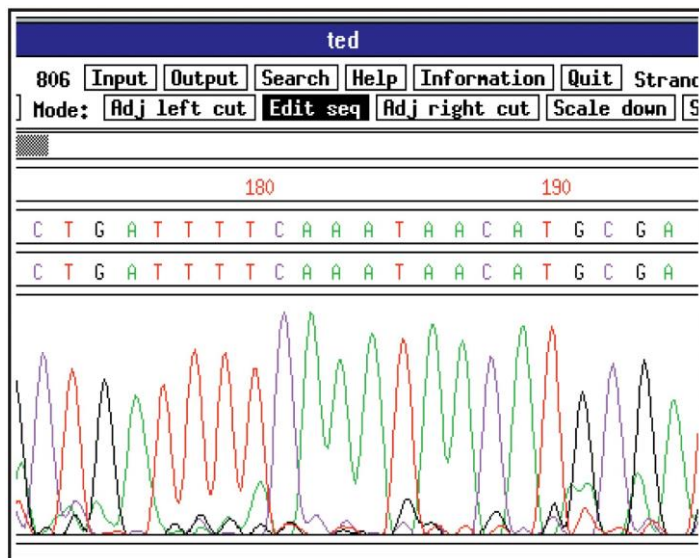


Рис. 2.13. Способ автоматизации реакций определения последовательности ДНК (по Альберту Б. и др., 2015)

Примечание: показан фрагмент одного раунда автоматического секвенирования, отображаемый на экране компьютера. Каждый

цветной пик показывает нуклеотид в последовательности ДНК. Можно чётко прочесть участок последовательности между позициями 173 и 194 относительно начала последовательности. Показана последовательность генома растения *Arabidopsis thaliana*.

2.4. Технологии CRISPR-Cas9

В 1987 г. в геноме кишечной палочки *Escherichia coli* был обнаружен участок, состоящий из многочисленных повторов [Nakata A. et al., 1989]. Функция этого участка, названного CRISPR-локусом (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – «скопление разделённых промежутками коротких симметричных повторов»), долгое время оставалась неизвестна. В 2005 году сразу три группы сообщили, что разделяющие эти повторы промежуточные последовательности идентичны последовательностям, найденным в геномах бактериофагов и в плазидах. Эти данные позволили предположить, что локус CRISPR – часть механизма, необходимого для защиты бактерий и архей от инфекций [Джагаров Д. Э., 2016]. В 2012–2013 годы на основе системы CRISPR/Cas были изобретены высокоточные инструменты для редактирования генов, а также для управления их активностью.

В настоящее время CRISPR-структуры обнаружены у 45 % всех известных бактерий и 85% архей [Grissa I. et al., 2007]. В геномах эукариот и вирусов CRISPR-локусы не обнаружены. По мере изучения CRISPR стало понятно, что это сложная многокомпонентная система, состоящая не только из повторов. CRISPR состоят из кассет, содержащих повторы с расположенными между ними спейсерами. Число составных звеньев (повтор + спейсер) в CRISPR-кассете может варьировать от двух до нескольких сотен. Например, у морской протеобактерии *Halimogobium ocraceum* 587 спейсеров в кассете [Grissa I. et al., 2007]. Часто в геномах содержится более одной CRISPR-кассеты. Самое большое их число обнаружено в ДНК метаногенной термофильной археи *Methanocaldococcus jannaschii* – 18 кассет занимают почти 1 % её генома [Гоглева А. А., Артамонова И. И., 2014].

CRISPR-структуры чаще располагаются на основной хромосоме бактерий (нуклеоиде), но иногда входят в состав плазмид (маленьких кольцевых, автономно реплицирующихся молекул ДНК).

Повторы в одной кассете, как правило, строго совпадают между собой по длине (около 32 пар оснований) и последовательности нуклеотидов (рис. 2.14). Для повторов характерна частичная диадная симметрия – части последовательностей в начале и в конце повтора обратно комплементарны. Благодаря этому концы таких палиндромных повторов могут взаимодействовать между собой с образованием устойчивых вторичных структур, прежде всего шпильек [Гоглева А. А., Артамонова И. И., 2014].

Спейсеры в пределах кассеты часто равны по длине, но отличаются по последовательности нуклеотидов. Наборы спейсеров в кассетах штаммов одного вида также сильно различаются. Эти спейсеры часто происходят из плазмид и фагов. Бактерии, выжившие после атаки фагов, в результате так называемой адаптации пополняют свой CRISPR-локус за счёт спейсеров, идентичных небольшим «трофейным» участкам ДНК фага [Barrangou R. et al., 2007]. Таким образом, спейсерные последовательности массива CRISPR – это память бактерии-хозяина о вирусных инфекциях и встречах с инородным генетическим материалом.

В 2005 г. сразу несколько независимых исследовательских групп проанализировали спейсеры уже известных к тому времени CRISPR-кассет с целью понять их происхождение [Bolotin A. et al., 2005; Mojica F. J. M. et al., 2005; Pourcel C. et al., 2005]. Для этого сравнили последовательности спейсеров со всеми последовательностями ДНК, доступными в базе данных GenBank. Оказалось, что спейсеры CRISPR-кассет у *Streptococcus thermophiles* и *Streptococcus vestibularis* часто совпадают по последовательности с участками генов бактериофагов, специфичных к стрептококкам, или плазмид *Streptococcus thermophiles* и *Lactococcus lactis* [Bolotin A. et al., 2005]. Кроме того, выяснилось, что:

1) существует корреляция между числом спейсеров в CRISPR-кассете и устойчивостью к фаговым инфекциям (у *Streptococcus thermophilus*) [Bolotin A. et al., 2005];

2) механизм образования CRISPR-кассет тесно связан с *cas*-генами [Jansen R. et al., 2002];

3) CRISPR-кассеты транскрибируются (у *Archeoglobus fulgidus* и *Sulfolobus solfataricus*) с образованием малых РНК, а это значит, что CRISPR-кассеты – активные компоненты генома [Tang T.-H. et al., 2005].

Все эти факты свидетельствуют, что CRISPR – это система, защищающая прокариот от вторжения вирусов и плазмид [Bolotin A. et al., 2005]. Согласно этой гипотезе, включение участков геномов мобильных элементов в виде спейсеров – не что иное, как иммунная память, которая может передаваться по наследству.

К локусу CRISPR примыкает лидерная последовательность, а также CRISPR-ассоциированные гены (CAS), кодирующие белки семейства CAS. По сравнению с типичными повторами и спейсерами лидерная последовательность гораздо длиннее – до 400 пар нуклеотидов. Установлено, что лидерные последовательности не содержат открытых рамок считывания, то есть не кодируют белки и не встречаются нигде больше в прокариотических геномах, кроме как в начале CRISPR-локуса [Гоглева А. А., Артамонова И. И., 2014]. Лидерная последовательность играет роль промотора – стартовой площадки, с которой начинается транскрипция массива CRISPR.

Лидерная последовательность CRISPR-локуса узнаёт белки, участвующие во встраивании новых спейсеров – как новые участки ДНК от нападавших микроорганизмов, так и новые повторы обычно встраиваются на границе между лидерной последовательностью и CRISPR (рис. 2.15).

Важной особенностью лидерных последовательностей является высокое содержание азотистых оснований аденина (А) и тимина (Т). А-Т – это уотсон-криковская пара, которая удерживается только двумя водородными связями, в то время как G-С – тремя, поэтому двухцепочечную ДНК в А-Т-богатых участках

легче расплести и превратить в одноцепочечную. Кроме того, в А-Т-богатых участках малая бороздка ДНК более узкая – такая топология служит характерным местом посадки для многих белков, взаимодействующих с ДНК. А-Т-богатые участки часто встречаются в различных регуляторных последовательностях (например, промоторах) и точках начала репликации [Гоглева А. А., Артамонова И. И., 2014]. Поэтому предполагают, что лидерная последовательность отвечает за регуляцию транскрипции CRISPR-кассеты и функционирование всей системы [Sorek R. et al., 2008].

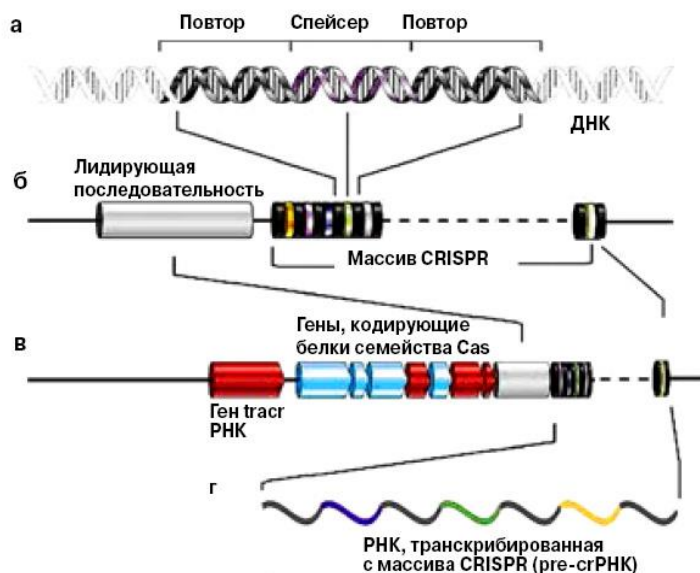


Рис. 2.14. Структура локуса CRISPR (по Джагарову Д. Э., 2014)

Примечание: **а** – строение участка CRISPR; **б** – массив CRISPR и лидерная последовательность; **в** – массив CRISPR, лидерная последовательность и гены, кодирующие tracrRNA и белки семейства Cas; **г** – молекула РНК, возникшая при транскрипции локуса CRISPR, в ней чередуются повторы и разнообразные участки, комплементарные участкам геном, нападавших на бактерию плазмид и фагов.

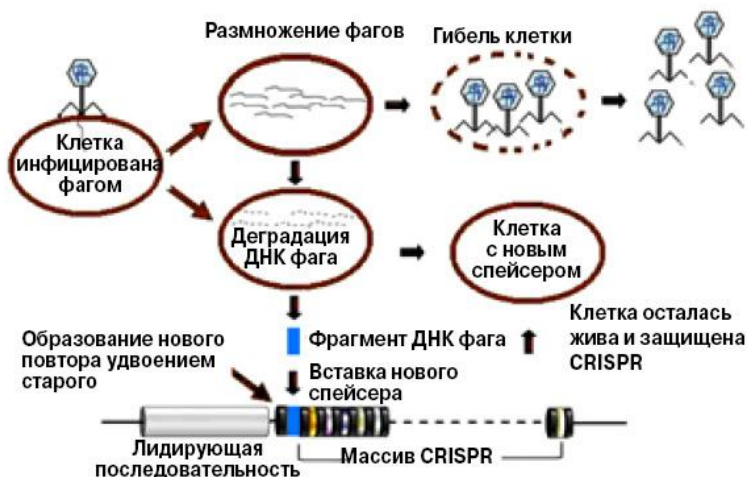


Рис. 2.15. Встраивание фрагментов чужеродной ДНК в систему CRISPR-Cas (по Джагарову Д. Э., 2014)

Примечание: после расщепления ДНК фага или плазмиды чужеродный фрагмент вставляется в локус CRISPR в качестве спейсера.

CRISPR/Cas-система работает в три этапа (рис. 2.16): приобретение новых спейсеров (адаптация), созревание эффекторных комплексов и разрушение чужеродной ДНК (иммунный ответ) [Гоглева А. А., Артамонова И. И., 2014].

Адаптация. Когда клетку с CRISPR/Cas-системой заражает вирус, из его генома вырезается небольшой фрагмент и встраивается в CRISPR-кассету в качестве спейсера [Barrangou R. et al., 2007]. При множественных повторных заражениях одним и тем же вирусом включение первого спейсера ускоряет приобретение дополнительных спейсеров против этого же чужеродного агента. Это явление назвали праймированием [Datsenko K. et al., 2012]. Несколько спейсеров повышают возможность справиться с инфицирующим агентом. Лидерная последовательность – это «точка роста» CRISPR-кассеты. С ней взаимодействуют белки, отвечающие за включение новых спейсеров. Без лидерной последовательности CRISPR-кассеты не могут расти [Lillestol R. K. et al., 2009].

Созревание эффекторных комплексов. Спейсеры – это своего рода пассивная иммунная память. Для защиты от вирусов нужно перевести её в активный иммунный ответ. Это происходит тоже в несколько стадий.

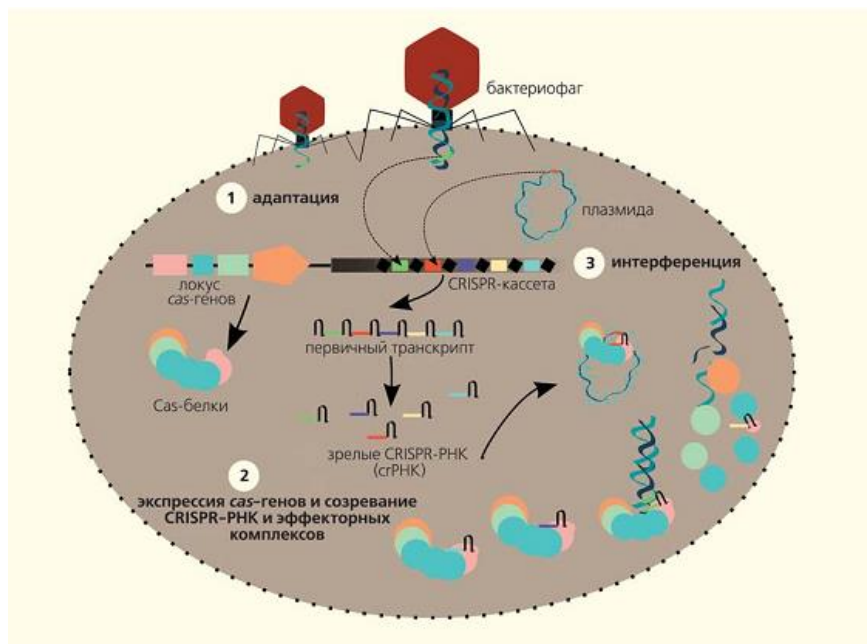


Рис. 2.16. Механизм работы CRISPR/Cas-системы

Сначала CRISPR-кассета активируется (экспрессируется), что приводит к образованию длинной молекулы первичного РНК-предшественника. Экспрессия запускается благодаря регуляторной области в составе лидерной последовательности. Одновременно начинают синтезироваться Cas-белки. Из них строится скелет активного эффекторного комплекса. Например, у *Escherichia coli* такой комплекс (Cascade) состоит из молекул пяти белков и по форме напоминает морского конька (рис. 2.17).

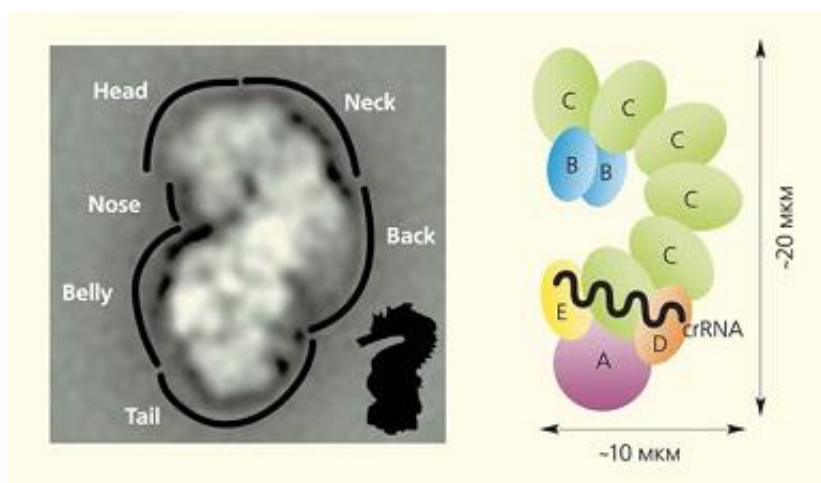


Рис. 2.17. Структура Cascade-комплекса у *Escherichia coli*
(по Jore M.M. et al., 2011)

Комплекс из Cas-белков нарезает длинный первичный РНК-предшественник на короткие РНК – CRISPR-РНК (crРНК) (рис. 2.18). Каждая crРНК содержит спейсер и часть повтора [Гоглева А. А., Артамонова И. И., 2014]. В процессе разрезания РНК-предшественника участвует небольшая РНК, комплементарная повторам – tracrРНК. Она служит меткой для белка Cas9, к которому присоединяется фермент РНКаза III, разрезающий длинную молекулу РНК. Выполнив свою функцию РНКаза III уходит, в результате чего остаётся комплекс двух молекул crРНК и tracrРНК с белком Cas9 [Джагаров Д. Э., 2014]. Cas9 является нуклеазой и сам по себе неактивен, но при связывании с tracrРНК его трёхмерная структура изменяется, в результате чего Cas9 приобретает способность взаимодействовать с ДНК-мишенью – защёлкивается на её двух нитях по типу «замка застёжки-молнии».

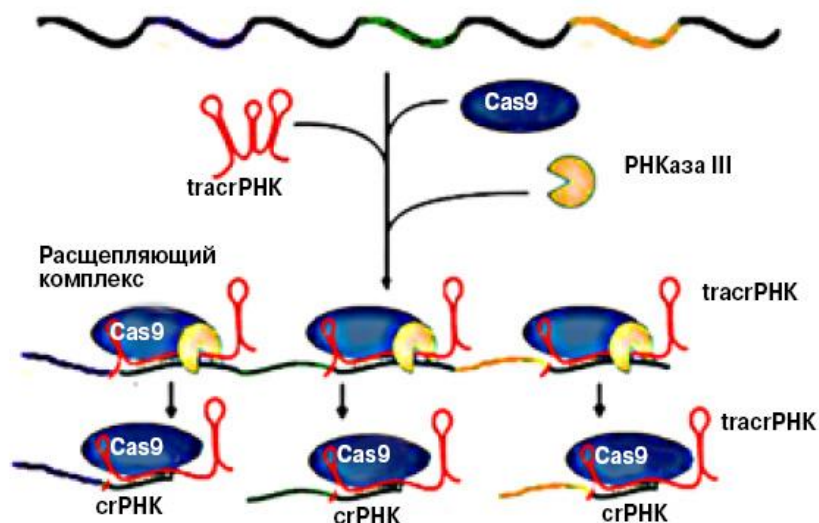


Рис. 2.18. Образование комплексов crRNA/tracrRNA-Cas9
(по Джагарову Д. Э., 2014)

Иммунный ответ. Комплекс crRNA/tracrRNA-Cas9 запускает иммунную реакцию в ответ на заражение бактерии вирусом: спейсерные участки crRNA находят комплементарные им участки вирусных нуклеиновых кислот и приносят к ним Cas-белки. Cas-белки вызывают расщепление и последующую деградацию вирусных нуклеиновых кислот. Таким образом, crRNA выполняют роль проводника, направляющего нуклеазу к цели, за что она и получила своё другое название – «RNA-гид» (рис. 2.18).

Чтобы белки Cas узнали и затем расщепили последовательность вирусной или плазмидной ДНК в ней должен находиться короткий (от трёх до девяти нуклеотидов) участок, так называемый протоспейсер (РАМ – protospacer adjacent motif). Таким образом, атакуются только те последовательности вирусной ДНК, рядом с которыми находятся РАМ. Если участок ДНК комплементарен crRNA, но рядом с ним нет РАМ, то комплекс crRNA/tracrRNA-Cas9 его не распознает [Джагаров Д. Э., 2014].

Интересно, что в локусе CRISPR наряду со спейсерами, комплементарными инородной ДНК, встречаются и спейсеры, нацеленные на собственную ДНК бактерии. И таких спейсеров в ДНК бактерий порядка 20 %.

Если заразить клетки неизвестным им фагом, то лишь 3 % выживших бактерий удлиняют свою CRISPR-кассету на один спейсер, соответствующий новому фагу. Если бактерии заразить фагом, ДНК которого хотя бы отчасти сходна с каким-либо спейсером в CRISPR-кассете, то адаптация идёт интенсивнее. От 50 % до 90 % популяции пополняет свои CRISPR участками генома этого фага, и выживаемость возрастает в десятки раз. Этот процесс называется CRISPR-адаптация [Савицкая Е. Е. с соавт., 2016].

Использование CRISPR/Cas-систем в биотехнологии. Практический интерес к CRISPR/Cas-системам основан на их способности специфически узнавать практически любые уникальные локусы за счёт комплементарных взаимодействий между спейсером и *cr*РНК и протоспейсером молекулы-мишени. Это свойство использовано в Cas9-опосредованных технологиях редактирования геномов.

В конце **2012** года М. Jinek объединил *tracr*РНК и *cr*РНК в одну цельную молекулу РНК-РНК-гида, или *sg*РНК, от англ. single-guide RNA и сконструировал вектор для клонирования этой РНК [Jinek M. et al., 2012]. Эта *sg*РНК образует комплекс с белком Cas9, затем находит комплементарные ДНК и правильно ориентирует Cas9, чтобы создавать в них двухцепочечные разрывы (рис. 2.19). Причём может сделать это именно в том участке, в каком пожелает исследователь, — достаточно включить в *sg*РНК фрагмент, комплементарный этому участку. После того, как разрез в нужном месте сделан, клетка сама стремится его ликвидировать с помощью систем репарации [Джагаров Д. Э., 2014].

Система CRISPR/Cas9 может использоваться как удобный инструмент направленной манипуляции с геномами: для встраивания, удаления и модификации структурных генов и регуляторных последовательностей (рис. 2.20). Такая технология

обладает большим потенциалом для генной терапии, лечения генетических заболеваний путём замены/удаления повреждённых участков генов и создания высокоспецифичных противовирусных вакцин.

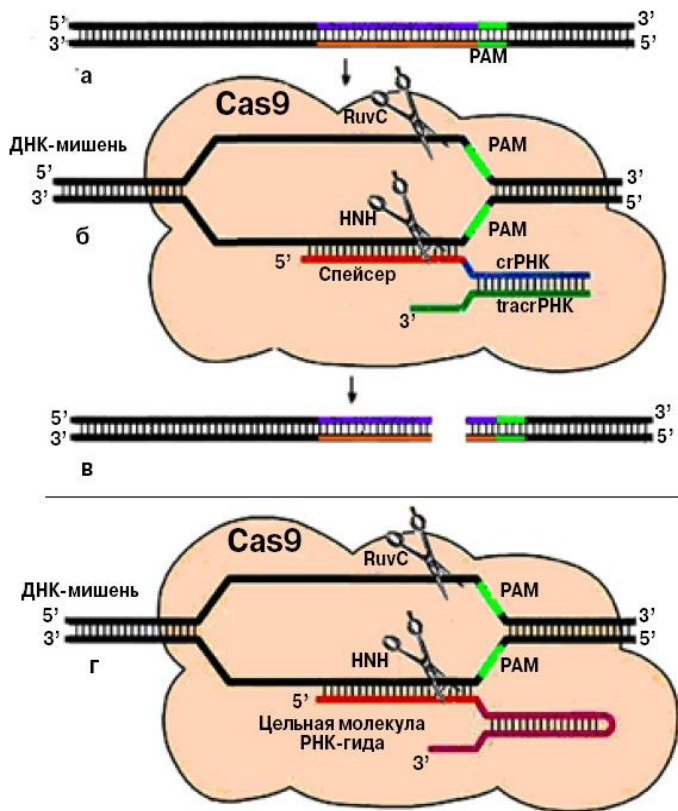


Рис. 2.19. Принцип работы Cas9 с участием crPHK и tracrPHK и в составе искусственной конструкции, где одна молекула sgPHK заменяет две (по Джагарову Д. Э., 2014)

Примечание: *а, б* и *в* – двухцепочечная ДНК-мишень подвергается точному разрезанию – Cas9 распознаёт мишень с помощью crPHK, а та удерживается в молекуле Cas9 благодаря посредничеству tracrPHK (места разрезов обозначены ножницами). RuvC и HNT – домены (части) Cas9 – они обладают нуклеазной активностью, каждый способен разрезать одну из двух нитей ДНК; *г* – этот же процесс, но с участием

цельной молекулы sgРНК, созданной усилиями учёных; она взаимодействует и с Cas9, и с ДНК-мишенью.

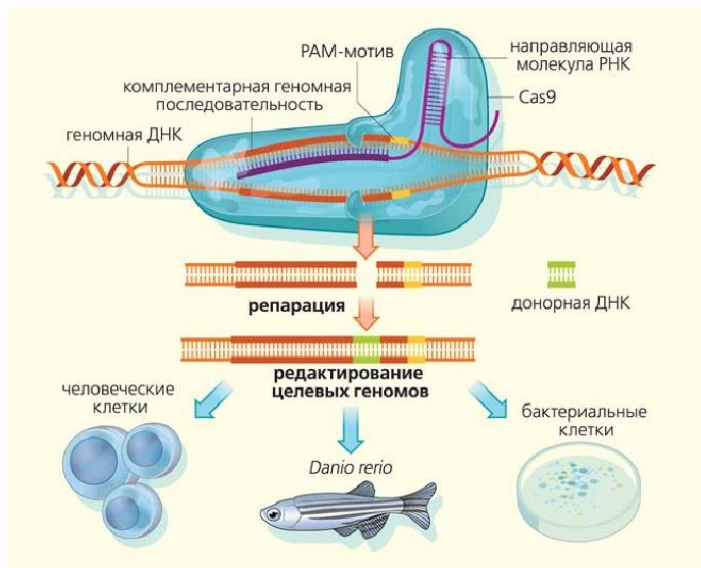


Рис. 2.20. Редактирование целевого генома с помощью РНК-направляемого белка Cas9 (по Charpentier E., Doudna J. A., 2013)

Задания для внеаудиторной работы

1. Общая характеристика методов генетической инженерии.
2. Рестрикция ДНК. Рестриктазы.
3. Гибридизация нуклеиновых кислот.
4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).
5. Клонирование ДНК.
6. Определение нуклеотидных последовательностей. Метод Максама-Гилберта. Метод Сенгера.
7. Химический синтез гена.
8. Получение биологически активных соединений: гормона роста человека, соматостатина, инсулина, интерферонов.
9. Генетическая трансформация.
10. Получение трансгенных растений.

Подготовьте презентацию по одной из проблем, касающихся генетической инженерии.

Основные термины и понятия

Амплификация
Библиотека генов
Вектор
Гибридизация
Денатурация
Клон ДНК
Клонирование
Липкие концы
Отжиг
Плавление ДНК
Плазмиды
Полимеразная цепная реакция
Рекомбинантная ДНК
Ренатурация
Рестриктаза
Рестрикты
Сайт
Сайт рестрикции
Секвенирование
Тотальная ДНК
Экзонуклеаза
Эндонуклеаза

Задания для аудиторной работы

Тема: Современные методы молекулярной биологии и генной инженерии

Решите задачи.

Задача 1. Составьте список из нескольких используемых рестриктаз и опишите их характеристики (название; организм, из которого выделен фермент; известные свойства).

Задача 2. Фермент рестрикции *Escherichia coli* RI разрезает гексамерную последовательность оснований:

ГААТТЦ
ЦГТААГ

Такая последовательность должна многократно встречаться в ДНК *Escherichia coli*. Почему фермент не разрушает свою собственную ДНК?

Задача 3. Что обозначает термин «липкие концы» применительно к молекулам ДНК?

Задача 4. Что такое клон генов? Что такое клон кДНК? Чем они отличаются у эукариот?

Задача 5. Что такое дидезоксинуклеозидтрифосфат? Какова его функция в секвенировании ДНК по методу Сенгера?

Задача 6. Кратко изложите суть полимеразной цепной реакции и условия её проведения.

Задача 7. Что такое бактериальный экспрессирующийся плазмидный вектор?

Задача 8. Замкнутую кольцевую вирусную ДНК обрабатывают ферментом рестриктазой. В этой ДНК есть один сайт рестрикции со следующей структурой:

5'-A-T-G-Ц-T-A-G-Ц-A-T-3'

3'-T-A-Ц-G-A-T-Ц-G-T-A-5'

а) Отметьте точкой предполагаемый центр сайта рестрикции.

б) Почему Вы решили, что выбранная Вами точка представляет собой центр? Каковы его свойства?

Глава 3

Структура геномов прокариот и эукариот

Термин «**геном**» был предложен Г. Винклером в 1920 г. для описания совокупности генов, заключённых в гаплоидном наборе хромосом одного биологического вида. Уже в то время подчёркивалось, что понятие генома в отличие от генотипа является характеристикой вида в целом, а не отдельной особи.

В настоящее время термином «**геном**» обозначают всю совокупность ДНК клетки (в случае ряда вирусов говорят о геномной РНК).

Существует **ядерный геном**, **митохондриальный геном** и **геном пластид**.

Соматические клетки содержат диплоидный геном ($2n$), половые – гаплоидный геном (n).

Наиболее важной характеристикой генома является число составляющих его генов – общее число генов и число генов, кодирующих белки. Используя четыре уровня реализации генетической информации, геном можно охарактеризовать следующим образом [Кребс Дж. с соавт., 2017]:

- **Геном** – это полный набор генов организма; полная последовательность ДНК организма.

- **Транскриптом** – это полный набор генов, экспрессирующихся в определённых условиях. Транскриптом представляет собой набор всех присутствующих в данной момент молекул РНК и может относиться к одной клетке или к любому сложно организованному клеточному сообществу, вплоть до организма. При транскрипции некоторых генов образуется множество разных молекул мРНК, и, таким образом, транскриптом по своей сложности, по-видимому, превышает общее число генов, присутствующих в геноме.

- **Протеом** – это полный набор белков (организма или отдельных тканей и клеток). Он должен соответствовать мРНК в транскриптоме. Могут также происходить посттрансляционные модификации белков, при этом один транскрипт может транслироваться с образованием нескольких белков.

– Белки могут функционировать как независимо, так и в составе белковых комплексов, например, холоферментов (РНК-полимераза, сплайсосома), и включаться в метаболические процессы, в которых принимают участие группы связанных между собой ферментов. Если идентифицировать все белок-белковые взаимодействия, то можно оценить общее количество независимых белковых комплексов (*интеракт*).

3.1. Функциональные отделы и свойства генома

Информация о структуре белков и РНК записана в участках ДНК, которые называются генами и цистронами.

Ген – это участок ДНК, кодирующий один белок.

Цистрон – участок ДНК, кодирующий одну полипептидную цепь.

Таким образом, если белок состоит из нескольких разных полипептидных цепей, то его ген включает несколько цистронов.

У животных и человека цистроны нередко располагаются в разных хромосомах и обычно тоже называются генами, например, ген α -цепи и ген β -цепи гемоглобина.

Всего в геноме бактерий (например, кишечной палочки) около 2500 цистронов. В хромосомах человека число генов составляет около 25 000.

Кроме генов всех белков организма, в хромосомах имеются также гены РНК – четырёх видов рибосомных РНК и нескольких десятков транспортных РНК.

Гены эукариот включают *транскрибируемую* и *регуляторные области* (рис. 3.1).

В *транскрибируемой области* примерно равные доли – по 27 и 26 % соответственно – занимают в геноме эукариот (например, нематоды) **экзоны** (участки гена, в которых записана информация о структуре белка или РНК, они сохраняются в матричной РНК) и **интроны** (участки гена, удаляемые в процессе образования зрелой РНК). Экзоны и интроны чередуются друг с другом, что придаёт гену «разорванную» структуру (показали в 1977 г Р. Робертс и Ф. Шарп). Число интронов в гене

варьирует от 2 (например, β -цепь гемоглобина) до нескольких десятков (в гене миозина их 50). Исключение составляют гены гистонов, которые не содержат интронов. Смысл существования интронов до конца не ясен. Предполагают, что интроны играют роль регуляторных сигналов. Согласно другой гипотезе, интроны разделяют гены на отдельные участки, которые могут рекомбинировать в ходе эволюции с образованием новых генов.

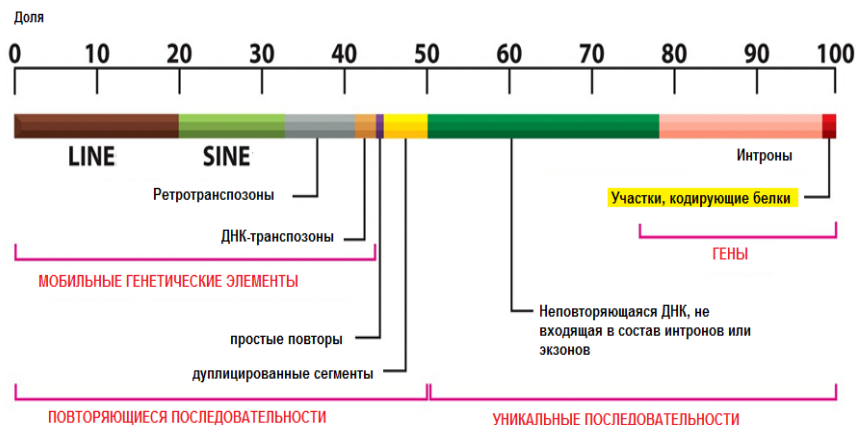


Рис. 3.1. Геном человека – состоит из некодирующих и повторяющихся генетических последовательностей

Оставшиеся 47 % транскрибируемой части генома приходятся на повторы, межгенные участки и т. д., то есть на ДНК с неизвестными функциями.

В **регуляторной** части генома выделяют различные участки. Между генами находятся некодирующие последовательности – **спейсеры**, функция которых может быть различна:

1) Многие спейсерные участки выполняют структурную роль – участвуют в правильной укладке нуклеосомной цепи в высшие структуры хроматина, в прикреплении хромосом к аппарату центриолей.

2) Другие некодирующие участки ДНК служат специфическими локусами связывания определённых белков, например,

функционирующих на ДНК ферментов (ДНК-полимеразный комплекс), белков, выполняющих регуляторную функцию.

Регуляторные элементы, стимулирующие транскрипцию связанных с ними генов, называются **энхансерами** (усилителями, от англ. *enhancer*). Они связывают транскрипционные факторы, ускоряющие транскрипцию гена. Например, **белок р53** активируется в ответ на разнообразные повреждения клеточной структуры: нерепарированные разрывы и другие повреждения ДНК, нарушение расхождения хромосом в митозе, разрушение микротрубочек и т. д. Сам же белок р53 регулирует активность трёх групп генов: **а)** активирует гены, отвечающие за остановку клеточного деления; **б)** активирует гены, запускающие апоптоз – процесс, ведущий путём активации специальных ферментов, к гибели клетки; а также репрессирует гены, сдерживающие апоптоз; **в)** активирует гены, тормозящие образование новых сосудов, то есть ангиогенез.

Энхансеры могут располагаться достаточно далеко от регулируемого гена – на расстоянии несколько тысяч пар оснований.

Регуляторные элементы, подавляющие транскрипцию, называются **сайленсерами** (успокоителями, от англ. *silencer*).

3.2. «Избыточность» генома эукариот

Геном эукариот существенно отличается от генома прокариот по ряду признаков, среди которых его **избыточность**. Так, на $\sim 10^6$ пар нуклеотидов (п. н.) в ДНК бактерий приходится ~ 5000 генов. На 10^9 п. н. млекопитающих $\sim 50\,000$ генов (табл. 3.1).

Таким образом, из таблицы 3.1 видно, что прямой корреляции между количеством ДНК и эволюционной продвинутостью организма нет.

Сравним геном **нематоды** (97 млн п. н. – 18424 генов) с геномом **дрожжей** (12 млн п. н. – 6000 генов) и геномом **человека** (3,2 миллиарда п. н. – 25 000 генов). Видно, что доля кодирующих участков в расчёте на весь геном в ходе эволюции резко уменьшается – у дрожжей она очень высока, а у человека

очень мала. Это значит, что эволюция эукариот от низших форм к высшим сопряжена с «разбавлением» генома – на единицу длины ДНК приходится всё меньше информации о структуре белков и РНК и всё больше информации «ни о чём».

Минусы «избыточной» ДНК:

- увеличение времени синтеза ДНК;
- сложнее организовывать удвоение ДНК;
- высокая энергоёмкость – на 1 нуклеотид для включения в цепь ДНК нужно затратить ~60 молекул АТФ.
- благодаря зависимости размера ядра от количества ДНК происходит увеличение размеров клетки.

Таблица 3.1. Размер генома и число генов у ряда организмов

Организм	Размер генома, млн п. н.	Число генов
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0,58	470
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1,11	834
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,83	1743
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1,66	1743
<i>B. subtilis</i>	4,2	4100
<i>Escherichia coli</i>	4,6	4288
<i>S. cerevisiae</i>	13,5	6034
<i>S. pombe</i>	12,5	4929
<i>A. thaliana</i>	119	25 498
<i>O. sativa (puc)</i>	466	~40 000
<i>D. melanogaster</i>	165	13 601
<i>C. elegans</i>	97	18 424
<i>H. sapiens</i>	3300	~25 000

Плюсы «избыточной» ДНК:

– возникает возможность создания сложного регуляторного аппарата, позволяющего поднять организм на более высокий эволюционный уровень.

Для объяснения функциональной роли «избыточной» ДНК в геноме эукариот была предложена гипотеза «альтруистической» ДНК: избыточные последовательности ДНК оказывают стабилизирующее влияние на генетическую информацию, заключённую в геноме многоклеточных организмов. Некодирующие последовательности выступают в роли ловушек мутагенов любого вида, специфически защищая жизненно важные

участки ДНК от мутаций. Организмы, у которых жизненно важные гены максимально защищены от действия мутагенов, должны обладать эволюционным преимуществом и в первую очередь сохраняться естественным отбором (Патрушев Л. И., 1997).

Причины избыточности:

1. Большой размер генов (за счёт наличия интронов).
2. Присутствие повторных последовательностей. Повторяются и гены, и некодирующие участки. У эукариот некоторые последовательности повторены сотни и тысячи раз.
3. Наличие большого числа некодирующих последовательностей, часть из которых выполняет регуляторную функцию при транскрипции, а часть – необходима для компактизации генома.

3.3. Компактность генома эукариот

Компактность – другое принципиальное отличие генома эукариот от прокариотического генома. *Каждая человеческая клетка содержит около 2 м ДНК, при этом диаметр ядра составляет всего 5–8 мкм. Уместить весь этот материал в таком маленьком объёме – всё равно, что попытаться уложить Эйфелеву башню внутрь спичечного коробка.*

В эукариотических клетках очень длинные двухцепочечные молекулы ДНК упакованы в структуры, называемые **хромосомами**. Они не только легко помещаются внутри ядра, но и могут без труда разделяться между дочерними клетками при каждом клеточном делении.

У эукариот ДНК в ядре распределена по разным хромосомам. Геном человека, например, содержит примерно $3,2 \times 10^9$ нуклеотидов, разделённых между 24 хромосомами – 22 аутосомами, X-хромосомой и Y-хромосомой. Каждая хромосома состоит из одной чрезвычайно длинной линейной молекулы ДНК, соединённой с белками, которые сворачивают и упаковывают её в более компактную структуру. ДНК, объединённую с белками, называют **хроматином**. В дополнение к белкам, участвующим в сворачивании ДНК, хромосомы также связаны

с другими белками, которые участвуют в экспрессии генов, репликации и репарации ДНК.

Выделяют 4 уровня упаковки (компактизации) ДНК (рис. 3.2). При этом молекула ДНК «укорачивается» в 10 000 раз.

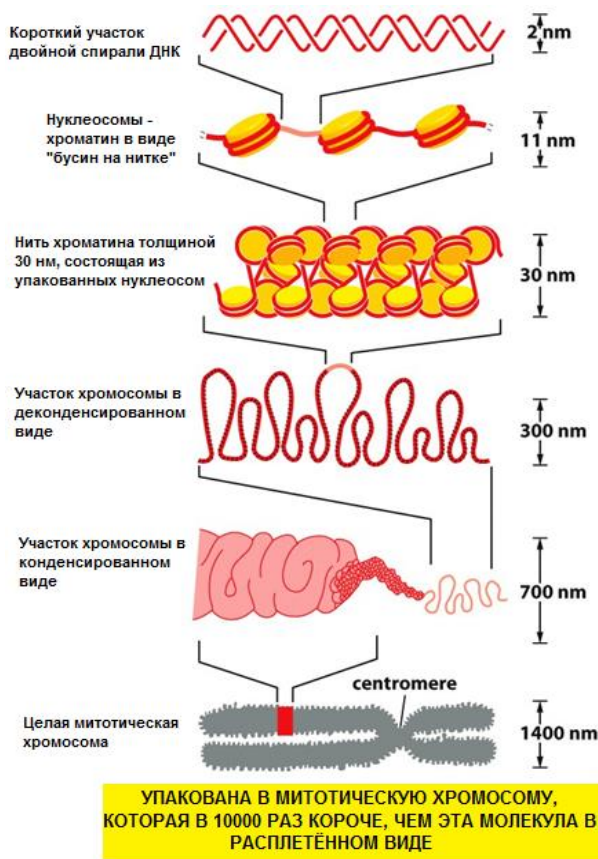


Рис. 3.2. Уровни упаковки ДНК

Компактизация ДНК в ядре осуществляется при посредстве сложного комплекса белков, среди которых принято выделять **гистоны** и **негистоновые** белки. Гистоны представляют собой небольшие белки, обладающие основными свойствами – они обогащены лизином и аргинином (положительно заряженными

аминокислотами) (табл. 3.2). Выделяют 5 основных типов гистонов **H1** – линкерный гистон, **H2A**, **H2B**, **H3** и **H4** – сердцевинные гистоны.

Гистоны (кроме гистона **H1**) являются чрезвычайно консервативными белками (у коровы и клевера разница в **H2A** всего в одну аминокислоту). Следовательно, эти белки выполняют важную функцию, которая у всех эукариот обеспечивается одинаково. Любая мутация в гистоновых генах летальна.

Гистон **H1** относится к семейству линкерных гистонов. Это семейство представляет собой набор родственных белков с выраженной тканевой и видовой специфичностью. **H1** – очень вариабельная фракция, различен не только у видов, но даже у одного организма, в зависимости от стадии онтогенеза.

Средняя часть молекулы гистона содержит гидрофобные аминокислоты. Положительно заряженные аминокислоты гистонов обеспечивают электростатические взаимодействия с ДНК. Центральная часть необходима для взаимодействия гистонов между собой. Каждый из гистонов сердцевины имеет гибкий N-концевой «хвост» (**H2A** и **H2B** также имеют C-концы), содержащий сайты ковалентной модификации, важные для функционирования хроматина. Модификации гистонов носят временный характер и связаны со структурными изменениями хроматина в процессах репликации и транскрипции, а некоторые модификации способствуют и репарации ДНК.

Таблица 3.2. Общая характеристика гистонов

Фракция	Mr (Da)	Лизин	Аргинин	Модификация	Функция модификации
H1 (очень богатая лизином)	23 000	29 %	1 %		
H2A (умеренно богатая лизином и аргинином)	13 960	11 %	9 %		
H2B (умеренно богатая лизином)	13 774	16 %	6 %		

<i>H3</i> (очень богатая аргинином); в ней есть цистеин, а в других – нет	15 348	10 %	13 %	Метилирование Ацетилирование, фосфорилирование	Активация транскрипции; конденсация хроматина; метилирование ДНК. Активация транскрипции.
<i>H4</i> (богатая аргинином и глицином)	11 282	11 %	14 %	Метилирование Ацетилирование	Сборка нуклеосом

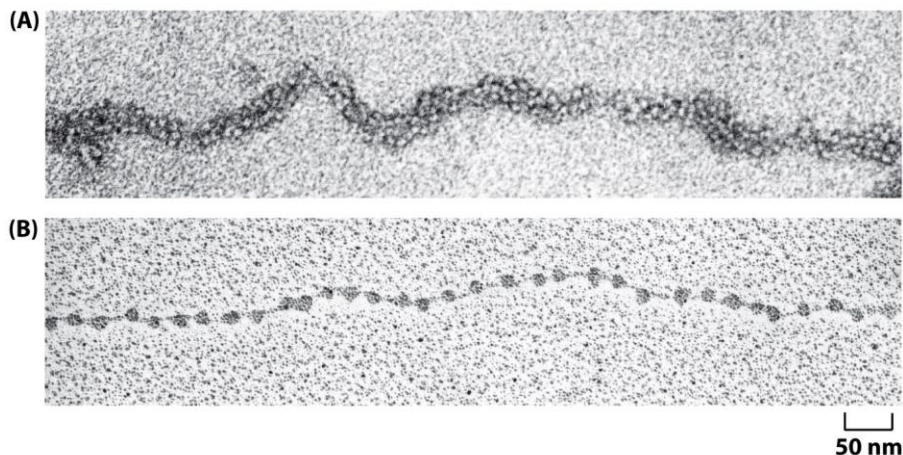
К **негистоновым** белкам относятся все белки хроматина за вычетом гистонов. По сравнению с гистонами, негистоновые белки более вариабельны между разными типами тканей и видами организмов; их массовая доля в хроматине чуть меньше, чем доля гистонов. В функции негистоновых белков входит контроль экспрессии генов и структуры хроматина высшего порядка [Кребс Дж. с соавт., 2017]. Например, фермент РНК-полимеразу можно рассматривать как негистоновый белок.

Четыре уровня компактизации ДНК (рис. 3.2)

1. Нуклеосомный. Нуклеосома является базовой структурной единицей первого уровня упаковки ДНК в хроматине (рис. 3.3; 3.4). Структура центральной части нуклеосомы с высоким разрешением была расшифрована в 1997 году. Она представляет собой белковую глобулу, или, точнее говоря некое подобие диска, на который намотан фрагмент ДНК протяженностью 147 п. н. (1,7 витка). Глобула состоит из восьми молекул гистонов: тетрамера ***(H3)₂-(H4)₂*** и двух димеров ***H2A-H2B***. Диаметр глобулы-диска составляет ~11 нм (110 Å), а высота – ~5,7 нм.

Между центральными частицами нуклеосомы расположены линкерная ДНК, длина которой может варьировать от нескольких до 80 п. н. Гистон ***H1*** связывается с ДНК, входящей на нуклеосому, и ДНК, выходящей из нуклеосомы, стабилизируя глобулу и обеспечивая замыкание двух полных витков ДНК.

Гистоны контактируют с фосфодиэфирным остовом молекулы ДНК. В целом, накрученная на нуклеосомную глобулу ДНК образует 14 прочных электростатических контактов с молекулами гистонов.



*Рис. 3.3. Нуклеосомы под электронным микроскопом
(по Альберту Б. с соавт., 2015)*

Примечание: **A** – хроматин, выделенный из интерфазного ядра, без дополнительной обработки выглядит под электронным микроскопом как нити толщиной 30 нм; **B** – участок хроматиновой нити, которая была специально «распакована» (деконденсирована) после выделения, чтобы можно было увидеть нуклеосомы.

2. Супербидный, или соленоидный (рис. 3.5). Фактически обеспечивается **H1** гистоном. **H1** взаимодействует с октамерами, сближает их, и ещё на него наматывается ДНК. Образуется супербид. Происходит сокращение линейного размера ДНК в 6–10 раз. Диаметр увеличивается до 300Å. Этот уровень компактизации, как и первый, не зависит от первичной структуры ДНК.

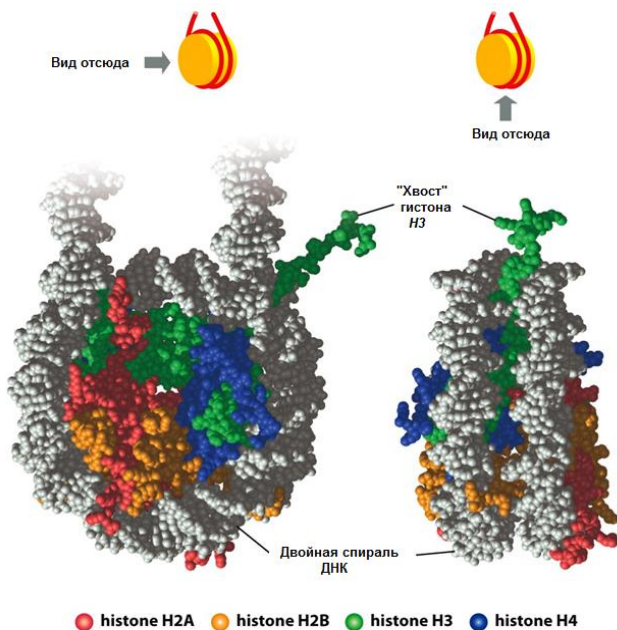


Рис. 3.4. Структура центральных частей нуклеосом, выявленная при помощи рентгеноструктурного анализа (Luger K. et al, Nature 389: 251–260, 1997)

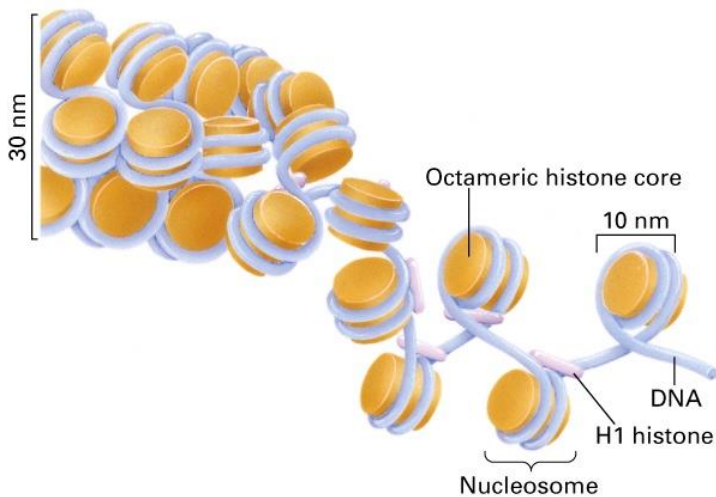


Рис. 3.5. Супербидный уровень упаковки ДНК

3. Петлевой уровень (рис. 3.6). Обеспечивается негистоновыми белками. Они узнают определённые последовательности ДНК, связываются с ними и друг с другом, образуя петли по 20–80 тыс. пар нуклеотидов. Петля обеспечивает экспрессию гена, то есть петля является не только структурным, но и функциональным образованием. Есть участки, в которых нет петель.

Укорочение за счёт петель проходит в 20–30 раз. Образуются и петлевые домены. Диаметр увеличивается до 700Å.

4. Метафазная хромосома (рис. 3.7). Метафазная хромосома уже удвоена. Она состоит из двух хроматид. Каждая из них содержит одну молекулу ДНК. Сюда входят белки ядерной ламина, серия белковых нитей, сопряжённых с ядерной оболочкой и пронизывающих всё ядро.

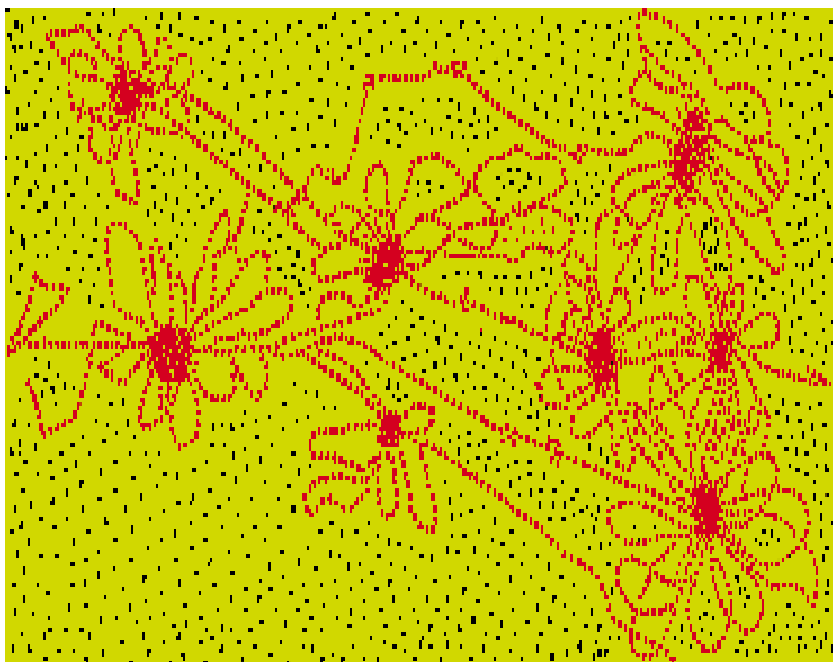


Рис. 3.6. Петлевой уровень упаковки ДНК

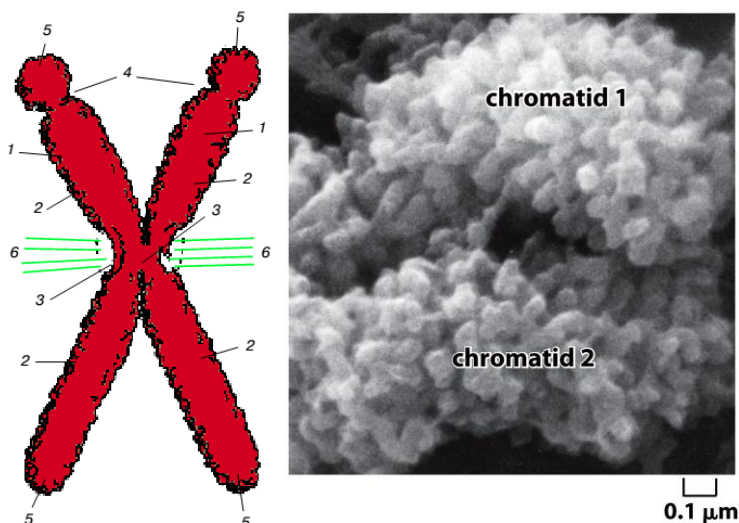


Рис. 3.7. Митотическая хромосома (по Альбертсу Б. с соавт., 2015)

Примечание: эта хромосома удвоилась, и две хроматиды всё ещё остаются соединёнными между собой – фотография сделана под сканирующим электронным микроскопом.

Существуют определённые правила расположения хромосом в ядре. Богатые генами хромосомы располагаются ближе к центру ядра (рис. 3.8).

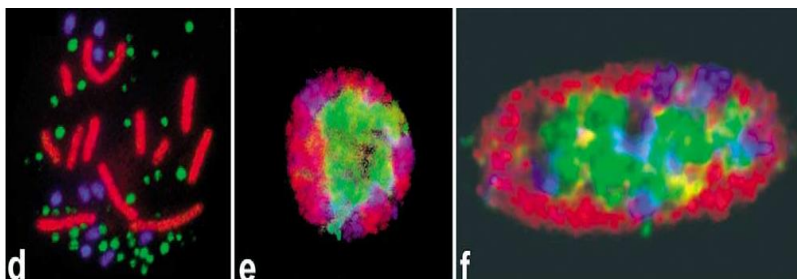


Рис. 3.8. Расположение хромосом в ядре

Примечание: зелёный цвет – «мини» хромосомы (наиболее богатые генами); красный цвет – «большие» хромосомы (наиболее бедные генами); сиреневый цвет – средние хромосомы (промежуточная плотность генов).

3.4. Классификация генов в геноме

В геноме эукариот выделяют три типа последовательностей ДНК – быстрые, умеренные повторы и уникальные гены.

К **быстрым повторам** относится сателлитная ДНК.

Особенности:

1. Сателлитная ДНК (короткие участки 6–10 п. н.) не является кодирующей, она никогда не транслируется.

2. Сателлитная ДНК обязательно располагается в центромерном районе. В местах расположения сателлитной ДНК возможна максимальная компактизация.

3. Сателлитная ДНК всегда располагается тандемно по 100–200 единиц в блоке. В результате образуются длинные последовательности в геноме.

4. У недавно образовавшихся на одной территории близких видов сателлитная ДНК заведомо разная. Это обеспечивает бесплодие возможных межвидовых гибридов.

К **умеренным повторам** относят как транскрибируемые и транслируемые, так и только транскрибируемые, но нетранслируемые последовательности ДНК и регуляторные участки (табл. 3.3).

Таблица 3.3. Умеренные повторы

Умеренные повторы		
Гены		Регуляторные участки
Транскрибируемые и транслируемые Гены белков рибосом, гистоновые гены, гены мембранных белков, гены иммуноглобулинов	Транскрибируемые, но не транслируемые Гены рРНК, тРНК (повторяются в геноме в среднем 5000 раз)	Энхансерные модули, точки начала репликации (origin), промоторы и терминаторы транскрипции

Уникальные гены. У человека, по разным оценкам, 30–50 тыс. генов. Большинство генов – уникальны. Но даже в них есть повторяющиеся элементы. Это – некоторые экзоны. Все уникальные гены разделяют на гены «домашнего хозяйства» и гены «роскоши».

Гены «домашнего хозяйства» кодируют то, что всегда нужно любой клетке независимо от ткани. По разным оценкам таких генов у человека 10–20 тыс. Это гистоновые гены, гены тРНК, рРНК.

Гены «роскоши», которых заведомо больше в 2–3 раза, это гены, которые экспрессируются в клетках определённых тканей и в определённое время. Например, все гены белковых гормонов – гены «роскоши».

Наряду с уникальными генами существуют множественные гены, образующие семейства, члены которых похожи (но обычно не идентичны) по нуклеотидной последовательности. С увеличением размера генома доля уникальных генов уменьшается, а доля генов, принадлежащих семействам, увеличивается [Кребс Дж., 2017].

В настоящее время существует и другая классификация генов:

1. Уникальные гены, имеющие специализированную функцию. Например, глобиновый, инсулиновый и другие гены. Они экспрессируются лишь в определённых клетках.

2. Уникальные гены, обладающие общими функциями, экспрессирующиеся в подавляющем большинстве клеток.

3. Множественные сгруппированные гены. Это гены рРНК, часть генов тРНК, часть гистоновых генов.

4. Множественные рассеянные гены. Это оставшаяся часть гистоновых генов, оставшиеся гены тРНК, а также МДГ (мобильные диспергированные (рассеянные) гены).

Гены эукариотических клеток также можно разделить на два больших класса: **а)** соответствующие бактериальным генам и **б)** характерные гены эукариот (Ник Лейн, 2013). Гены, которые можно найти как у бактерий, так и у эукариот, часто отвечают за ключевые функции клетки – процессы обмена веществ (механизмы выработки энергии и её использования, например для синтеза аминокислот и липидов) или информационные процессы (механизмы считывания с ДНК информации и её трансляции).

3.5. Геном прокариот

Наследственная информация у прокариот содержится в центрально расположенном нуклеоиде, который не отделён от цитоплазмы мембранной оболочкой. По химическому составу нуклеоид на 80 % состоит из ДНК, а 20 % приходится на различные белки и РНК. Важной особенностью молекулы ДНК прокариот является организация в виде кольца, что является условием для защиты прокариотической клетки от чужеродного генетического материала (Дерябин Д. Г., 2005).

Длина *Escherichia. coli* 1–6 мкм и ширина 0,3–1 мкм, а длина кольцевидной хромосомы 1–1,6 мм (то есть в 1000 раз превышает длину бактерии). ДНК в клетке *Escherichia coli* определённым образом упакована. Хромосома прокариот представляет собой высокоупорядоченную структуру, представленную системой из 20–100 независимо суперспирализованных петель, отходящих от плотной центральной области (рис. 3.9). В одну такую петлю входит около 40 000 пар нуклеотидов. В формировании подобной укладки и суперспирализации бактериальной хромосомы принимают участие белки топоизомеразы, а также специальные молекулы РНК. Подобная укладка бактериальной хромосомы непосредственно связана с её функционированием, где центральная область нуклеоида представлена суперспирализованной транскрипционно неактивной ДНК, а на расположенных на периферии деспирализованных петлях происходят интенсивные процессы образования различных типов РНК.

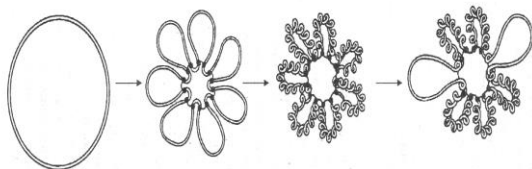


Рис. 3.9. Уровни организации генетического материала прокариот
(по Ченцову Ю. С., 2004)

3.6. Геном митохондрий

У всех эукариот генетическая информация содержится не только в хромосомах клеточного ядра, но и в митохондриях.

Ядерный геном представляет собой совокупность линейных молекул ДНК гаплоидного набора хромосом, тогда как **митохондриальный геном** – одну или несколько кольцевых (редко линейных) молекул ДНК (мтДНК). У большинства высших животных геном митохондрий содержит 37 генов: 13 для белков дыхательной цепи, 22 для тРНК и два для рРНК (для большой субъединицы рибосом 16S рРНК и для малой 12S рРНК).

Как правило, в каждой митохондрии содержится несколько копий её генома. Например, в клетках печени человека около 2000 митохондрий, и в каждой из них – по 10 одинаковых геномов. Размер генома митохондрий разных организмов колеблется от менее 6 тыс. пар нуклеотидов у малярийного плазмодия (в нём, помимо двух генов рРНК, содержится только три гена, кодирующих белки) до сотен тысяч пар нуклеотидов у наземных растений. У большинства организмов в последовательности мтДНК отсутствуют интроны и ДНК-повторы.

Геномы митохондрий разных видов отличаются не только по набору генов, порядку их расположения и экспрессии, но по размеру и форме ДНК. Подавляющее большинство описанных сегодня митохондриальных геномов представляет собой кольцевые суперспирализованные двухцепочечные молекулы ДНК. У некоторых растений наряду с кольцевыми формами имеются и линейные, а у некоторых простейших, например, инфузорий, в митохондриях обнаружены только линейные ДНК (рис. 3.10).

В митохондриях большинства организмов (кроме высших животных) часть кольцевых молекул ДНК присутствует в виде олигомеров, которые можно разделить на три класса: линейные; кольцевые; цепные, катенаны, состоящие из топологически связанных, то есть продетых друг в друга, мономерных колец (рис. 3.10, В). Например, у *Trypanosoma brucei* имеются два типа молекул: 45 одинаковых максиколец, каждое из которых состоит из 21 тыс. пар нуклеотидов, и 5,5 тыс. идентичных друг другу миниколец по 1000 пар нуклеотидов. Все они, соединяясь

в катенаны, образуют переплетенную сеть, которая вместе с белками формирует структуру, называемую кинетопластом.

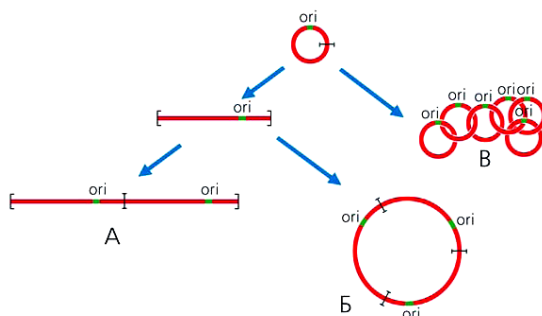


Рис. 3.10. Митохондриальные геномы разных организмов

Геном митохондрий человека представлен одной кольцевой молекулой ДНК размером 16569 пар нуклеотидов. Он кодирует 13 белков, все тРНК (22), две рРНК. 60 % генов, кодирующих белки, приходится на семь субъединиц комплекса, окисляющего НАДН, остальные гены кодируют две субъединицы АТФ-синтетазы, три субъединицы цитохромоксидазы, одну субъединицу убихинол-цитохром-*c*-редуктазы (цитохром *b*) (рис. 3.11).

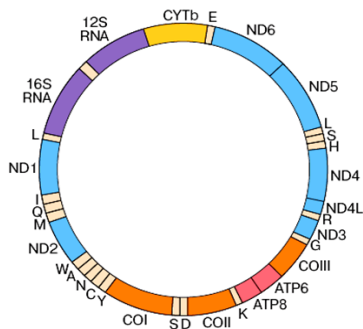


Рис. 3.11. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК человека

Примечание: показаны гены, кодирующие субъединицы НАДН-дегидрогеназного комплекса (ND1-ND6, ND4L), субъединицы цитохром-*c*-оксидазы (COI-III), цитохром *b* (CYTb), субъединицы АТФ-синтазы (ATP8 и 6), рибосомные РНК (12S RNA и 16SRNA)

и транспортные РНК (обозначены однобуквенными латинскими символами соответствующих аминокислот).

Геном митохондрии кодирует лишь малую часть белков, необходимых для жизни, нормального функционирования и размножения самой митохондрии. Все недостающие белки поступают в митохондрию извне – из цитоплазмы клетки, а кодирующие их гены находятся в клеточном ядре (Марков А., 2015). Установлено, что практически все эти «митохондриальные гены ядерной локализации» когда-то располагались в митохондриальной хромосоме, а затем были перенесены в ядро. Например, в мтДНК человека остались только те гены, которые невозможно перенести – строение кодируемых ими белков не позволяет транспортировать их через мембрану митохондрий. У растений митохондриальные геномы примерно в 10–20 раз больше, но эпизодический перенос отдельных митохондриальных генов в ядро продолжается и в настоящее время.

Предполагают, что перенос генов из мтДНК в ядерный геном проходил через целый ряд промежуточных стадий (Марков А., 2015):

1) сначала копия митохондриального гена должна была встроиться в одну из ядерных хромосом;

2) затем к ней в результате случайных перестроек участков ДНК присоединялись: а) подходящая регуляторная область, чтобы ген заработал и б) особый фрагмент, который сигнализирует клетке, что продукт данного гена (белок) необходимо транспортировать в митохондрию. ***Все митохондриальные гены ядерной локализации имеют такой сигнальный фрагмент!*** Только после этого исходный ген, локализованный в митохондриальной хромосоме, может быть отключён или удалён.

3.7. Симбиотическая теория происхождения митохондрий

Гипотезу о происхождении митохондрий и растительных пластид из внутриклеточных бактерий эндосимбионтов высказал Р. Альтман ещё в 1890 г.

Суть её такова: с появлением фотосинтезирующих бактерий в атмосфере Земли накапливался кислород – побочный

продукт их метаболизма. С ростом его концентрации усложнялась жизнь анаэробных гетеротрофов, и часть из них для получения энергии перешла от бескислородного брожения к окислительному фосфорилированию. Часть свободно живущих аэробов была захвачена анаэробами, но не «переварена», а сохранена в качестве энергетических станций, митохондрий (Дерябин Д. Г., 2005).

В пользу симбиотической теории говорят многочисленные факты (Ник Лейн, 2013; Инге-Вечтомов С. Г., 2015):

1) совпадают размеры и формы митохондрий и свободно живущих аэробных бактерий; те и другие содержат кольцевые молекулы ДНК, не связанные с гистонами (в отличие от линейных ядерных ДНК);

2) по нуклеотидным последовательностям рибосомные и транспортные РНК митохондрий отличаются от ядерных, демонстрируя при этом удивительное сходство с аналогичными молекулами некоторых аэробных грамотрицательных эубактерий;

3) митохондриальные РНК-полимеразы, хотя и кодируются в ядре клетки, ингибируются рифампицином, как и бактериальные, а эукариотические РНК-полимеразы нечувствительны к этому антибиотику;

4) белковый синтез в митохондриях и бактериях подавляется одними и теми же антибиотиками, не влияющими на рибосомы эукариот;

5) липидный состав внутренней мембраны митохондрий и бактериальной плазмалеммы сходен, но сильно отличается от липидного состава наружной мембраны митохондрий, гомологичной другим мембранам эукариотических клеток;

6) кристы, образуемые внутренней митохондриальной мембраной, являются эволюционными аналогами мезосомных мембран многих прокариот;

7) до сих пор сохранились организмы, имитирующие промежуточные формы на пути к образованию митохондрий из бактерий (примитивная амёба *Pelomyxa* не имеет митохондрий, но всегда содержит эндосимбиотические бактерии).

Существует представление, что разные царства эукариот имели разных предков и эндосимбиоз бактерий возникал

на разных этапах эволюции живых организмов. Об этом же говорят отличия в строении митохондриальных геномов простейших, грибов, растений и высших животных. Но во всех случаях основная часть генов из промитохондрий попала в ядро (Марков А., 2015; Марков А., Наймарк Е., 2017).

После приобретения митохондрий и пластид эукариоты не потеряли способность к симбиозу (Марков А., 2015). Этот процесс продолжается и по сей день. Например, инфузории, обитающие в рубце жвачных, и жгутиконосцы, населяющие кишечник термитов, содержат в своей цитоплазме симбиотических бактерий, помогающих им переваривать клетчатку (целлюлозу). Такие симбиотические системы напоминают матрёшку: в корове – инфузории, в инфузориях – бактерии.

Жизнь внутри чужой клетки способствует постепенному упрощению и деградации – внутриклеточные бактерии теряют свои гены, становятся более зависимыми от хозяина и постепенно превращаются из самостоятельных организмов в нечто, напоминающее органеллы. У одних внутриклеточных бактерий этот процесс зашёл уже очень далеко, а у других он только начинается.

Так, **симбиотическая система *Calyptogenia magnifica* – *Rutbia magnifica*** – находится на ранней стадии эволюционного становления, и симбионт ещё не успел далеко продвинуться по пути неизбежной деградации (Newton I.L.G. et al., 2007). Бактерия *Rutbia magnifica* обитает в тканях двустворчатого моллюска *Calyptogenia magnifica*. Этот симбиотический организм обитает на дне моря на большой глубине вблизи гидротермальных источников. Пищеварительная система гигантского моллюска сильно редуцирована, и почти всё необходимое он получает от живущей в его клетках симбиотической бактерии *Rutbia magnifica*. Эта бактерия относится к группе гамма-протеобактерий. Несмотря на внутриклеточный образ жизни генетическая дегградация у *Rutbia magnifica* не сильно выражена. Размер генома бактерии – 1,2 млн пар нуклеотидов и в нём сохранились гены метаболических путей, характерных для свободноживущих хемоавтотрофов (все гены, необходимые для фиксации CO₂, для окисления восстановленных соединений серы, для синтеза различных кофакторов и витаминов, а также всех 20 аминокислот).

Анализ генома *Rutbia magnifica* показал, что бактерия фиксирует неорганический углерод при помощи цикла Кальвина, а энергию для этого получает за счёт окисления соединений серы (Newton I.L.G. et al., 2007).

Моллюск-хозяин активно снабжает бактерию необходимой ей пищей – в крови *Calypptogena magnifica* обнаружен особый цинксодержащий белок, предназначенный для связывания и транспорта сероводорода. У бактерии имеется также полный набор генов, необходимых для кислородного дыхания. Кислородом бактерию тоже обеспечивает моллюск-хозяин. Кроме того, у *Rutbia magnifica* выявлены гены для таких важных метаболических путей, как гликолиз и цикл Кребса.

Бактерия *Rutbia magnifica* снабжает моллюска-хозяина аминокислотами и витаминами. Также, она способна утилизировать отходы его жизнедеятельности, такие как аммоний. Это вещество бактерия всасывает из тканей моллюска и использует к обоюдной пользе, например, для синтеза аминокислот (Марков А., 2015).

Превращение симбиотического организма в органеллу можно рассмотреть на примере бактерии *Carsonella*, геном которой был прочитан группой японских и американских учёных в 2006 году (Nakabachi A. et al., 2006). Бактерия *Carsonella* живёт в клетках листоблошек (*Psillidae*) – мелких, похожих на тлей насекомых, питающихся исключительно соком растений. Как и другие насекомые, питающиеся соком растений (например, тли и клопы), листоблошки обзавелись бактериальными помощниками, которые синтезируют для них необходимые вещества, отсутствующие в растительном соке, в первую очередь аминокислоты (Марков А., 2015). Как и *Rutbia magnifica*, *Carsonella* относится к группе гамма-протеобактерий. Её геном по размеру вполне сопоставим с геномом митохондрий – 160 тысяч пар нуклеотидов (типичные размеры митохондриальных геномов: у низших эукариот – 40–100 тысяч пар нуклеотидов; у растений – 200–400 тысяч пар нуклеотидов; у животных – 15–20 тысяч пар нуклеотидов).

У *Carsonella* наблюдаются все три основных признака генетической деградации, свойственной внутриклеточным бактериям:

1) сокращение генома в результате потери почти всех некодирующих участков ДНК и значительной части генов; 2) резкое преобладание в ДНК нуклеотидов аденина и тимина, но низкое содержание гуанина и цитозина; 3) быстрая молекулярная эволюция – повышенный темп изменения ДНК в ряду поколений.

Carsonella не может жить вне клеток хозяина и передаётся только вертикально – от матери к её детям (как и митохондрии). Специализированные клетки хозяина – бактериоциты – целенаправленно поддерживают жизнь симбионтов. Возможно (хотя и не доказано), что многие гены, утраченные предками *Carsonella*, были перенесены в геном хозяина, где они продолжают функционировать, обеспечивая бактерию необходимыми веществами извне.

Человеческий организм также не исключение, например, наш метаболизм во многом определяется многочисленными бактериями, составляющими кишечную микрофлору. Фактически каждый из нас – это ходячий суперорганизм со своим собственным уникальным микросообществом. Нет двух людей с одинаковым набором микробов и их генов, даже у однояйцевых близнецов они различаются (Аккерман А., 2012).

По имеющимся оценкам, в кишечнике взрослого человека присутствует более 1 кг микроорганизмов, относящихся к сотням различных видов. Однако по генам рибосомной РНК были идентифицированы только 72 разновидностей бактерий (из них 60 некультивируемых и 16 новых для науки) и один вид архей-метаногенов (Марков А., 2015; Gill S.R. et al., 2006).

Показано, что в кишечной микрофлоре резко повышена доля генов, имеющих отношение к метаболизму полисахаридов растительного происхождения, некоторых аминокислот и витаминов (Gill S.R. et al., 2006). В целом можно выделить наиболее важные метаболические функции, которые выполняют микробы в человеческом кишечнике (Марков А., 2015; Gill S.R. et al., 2006):

1. Переваривание растительных полисахаридов, которые не могут расщепляться ферментами, закодированными в геноме человека. Трудноусваиваемые углеводы расщепляют в основном бактерии-бродильщики, выделяющие в качестве конечных

продуктов обмена низкомолекулярные органические кислоты, которые активно всасываются кишечным эпителием человека. Из этого необычного источника человек получает около 10 % калорий.

2. В «совокупном геноме» кишечной микрофлоры высокопроцентное содержание генов, связанных с синтезом незаменимых аминокислот и витаминов.

3. Кишечная микрофлора располагает большим арсеналом ферментов для обезвреживания токсичных веществ, присутствующих в повседневной пище человека, особенно растительной.

Задания для внеаудиторной работы

- 1.** Структура генома вирусов и фагов.
- 2.** РНК-содержащие вирусы (РНК→РНК).
- 3.** РНК-содержащие вирусы (РНК→ДНК→РНК).
- 4.** ДНК-содержащие вирусы.
- 5.** Структура генома прокариот.
- 6.** Подвижные генетические элементы прокариот. IS-элементы и транспозоны бактерий.
- 7.** Структура генома эукариот. «Избыточность» эукариотического генома. Компактность генома эукариот.
- 8.** Основы метода ренатурации ДНК. Быстрые повторы, умеренные повторы, уникальные гены.
- 9.** Подвижные генетические элементы эукариот: IS-элементы, транспозоны.
- 10.** Неядерные геномы. ДНК митохондрий и хлоропластов.
- 11.** Программа «Геном человека». Геномная дактилоскопия – современный метод молекулярной биологии.
- 12.** Эволюция геномов.

Основные термины и понятия

Ген
Геном
Гистон
Инсуляторы
Интрон

Локус
Мобильные генетические элементы
Нуклеонид
Нуклеосома
Оперон
Плазмиды
Провирус
Промотор
Псевдогены
Сайленсеры
Сателлитная ДНК
Теломеры
Терминатор
Транспозиция
Фаги
Хромосома
Экзон
Энхансеры

Задания для аудиторной работы

Тема: Структура генома

Решите задачи.

Задача 1. Сравните химическую природу, размер и форму вирусов и бактерий.

Задача 2. Сравните ДНК митохондрий и ДНК хлоропластов.

Задача 3. Какое минимальное число нуклеотидных пар содержится в гене, кодирующем панкреатическую рибонуклеазу, состоящую из 124 аминокислот? Почему число нуклеотидных пар может оказаться больше, чем в Вашем ответе? С чем связана такая неопределённость?

Задача 4. Диплоидный набор хромосом млекопитающих содержит 109 пар нуклеотидов (п. н.). Если это количество ДНК присутствует в хроматиновой нити, и каждый участок ДНК размером 200 п. н. связан с девятью гистонами и упакован

в нуклеосому, а каждая группа из шести нуклеосом скручена в соленоид, с конечным уровнем упаковки 1:50, то определите следующее:

- а)** Общее число нуклеосом во всех нитях;
- б)** Общее число соленоидов во всех нитях;
- в)** Общее число гистоновых молекул, связанных с ДНК диплоидного набора хромосом;
- г)** Общую длину всех фибрилл.

Задача 5. ДНК бактериофага М13 имеет следующий нуклеотидный состав: А – 23 %, Т – 36 %, Г – 21 %, Ц – 20 %. Что говорят Вам эти цифры о ДНК данного фага?

Задача 6. В печени крысы имеется фермент, в полипептидную цепь которого входит 192 аминокислотных остатка. Этот фермент кодируется геном, включающим 1440 пар оснований. Объясните взаимосвязь между числом аминокислотных остатков в ферменте и числом пар оснований в соответствующем ему гене.

Задача 7. В составе РНК-содержащих вирусов *E. coli* ДНК нет, в них присутствует лишь РНК, которая играет роль вирусной хромосомы. Это означает, что в таких вирусах гены состоят из РНК, а не из ДНК. Опровергает ли это центральную догму молекулярной биологии? Обоснуйте свой ответ.

Задача 8. Участок молекулы ДНК состоит из 7 экзонов (по 180 нуклеотидов) и 9 интронов (по 320 нуклеотидов). Определите количество нуклеотидов в незрелой и зрелой мРНК, а также вес белка, закодированного в данном участке ДНК (молекулярная масса аминокислоты равна 100 а. е. м.).

Задача 9. В гене W содержится 3600 п. н. Определите число полных оборотов спирали в этом гене, количество закодированных в нём аминокислот и вес гена (молекулярная масса нуклеотида равна 345 а. е. м.).

Задача 10. ДНК одного из вирусов имеет молекулярную массу 780 000 дальтон. Сколько аминокислот входит в белок, закодированный в ДНК этого вируса, если молекулярная масса одной нуклеотидной пары приблизительно равна 650 дальтон? Каков вес этого белка (молекулярная масса аминокислоты равна 100 а. е. м.)?

Глава 4

Репликация различных ДНК и её регуляция

Общая схема передачи генетической информации такова:



Эта схема включает процессы, в которых участвуют ДНК и РНК:

1) репликация ДНК – биосинтез копии ДНК, предшествующий делению клеток;

2) транскрипция – биосинтез молекул РНК, нуклеотидная последовательность которых комплементарна определённому участку (гену) двухцепочечной молекулы ДНК;

3) трансляция – биосинтез белков, аминокислотная последовательность которых определена нуклеотидной последовательностью мРНК и образуется при участии рРНК и тРНК.

4.1. Принципы репликации ДНК

Репликация ДНК – это процесс, при котором информация, закодированная в последовательности оснований молекулы родительской ДНК, передаётся с максимальной точностью дочерней ДНК.

Выделяют следующие принципы репликации:

1. Комплементарность.
2. Антипараллельность.
3. Униполярность.
4. Потребность в затравке.
5. Прерывистость.
6. Полуконсервативность.

Первые три принципа можно сформулировать в одной фразе: **синтез каждой дочерней цепи ДНК идёт комплементарно и антипараллельно матричной цепи и всегда в направлении 5'→3'** (Дымшиц Г. М., 2000).

Субстратами, из которых синтезируются новые цепи ДНК, являются **дезоксинуклеозидтрифосфаты** (дНТФ), а не дезоксинуклеозидмонофосфаты (дНМФ), входящие в состав ДНК.

Использование дНТФ, а не дНМФ, объясняется энергетическими причинами – образование межнуклеотидной связи требует энергии, а её источником служит разрыв межфосфатной связи. Поэтому в ходе включения в цепь ДНК дНТФ от каждого нуклеотида отщепляется 2 фосфатных остатка.

Репликация ДНК – **матричный процесс**: каждая синтезируемая (дочерняя) цепь ДНК строится, используя в качестве матрицы одну из цепей исходной (родительской) ДНК. Кроме того, это процесс является симметричным – матрицами служат обе цепи родительской ДНК.

Процесс репликации осуществляется **сложным ферментным комплексом** (насчитывающим до 15–20 различных белков). При репликации ДНК у эукариот на каждой хромосоме работает не один, а сразу большое количество таких комплексов. Иными словами, на хромосоме имеется много точек начала репликации ДНК. И удвоение ДНК происходит не последовательно от одного конца до другого, а одновременно во многих местах сразу. Это значительно сокращает продолжительность процесса репликации – в сперматогониях на одной хромосоме в среднем около 40 точек начала репликации и S-фаза клеточного цикла составляет 15 ч (Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. А., 2007). В каждой точке начала репликации начинают работать два ферментных комплекса: один перемещается по молекуле ДНК в одну сторону, второй – в противоположную. При этом каждый комплекс реплицирует обе цепи ДНК. Основой при этом является **принцип комплементарности** – из четырёх возможных нуклеотидов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) в состав растущей цепи включается в данный момент, тот который комплементарен нуклеотиду в соответствующем положении родительской цепи (рис. 4.1)

Ферментный комплекс функционирует так, что одна из двух синтезируемых им цепей растёт с некоторым опережением по сравнению с другой цепью. Соответственно, первая цепь – лидирующая, а вторая – запаздывающая. Лидирующая цепь образуется в виде непрерывного длинного фрагмента, например,

для сперматогоний это около 1 600 000 нуклеотидов. Запазды-
вающая цепь образуется в виде серии коротких фрагментов –
примерно по 1500 нуклеотидов. Это так называемые **фрагмен-
ты Оказаки** (рис. 4.2).

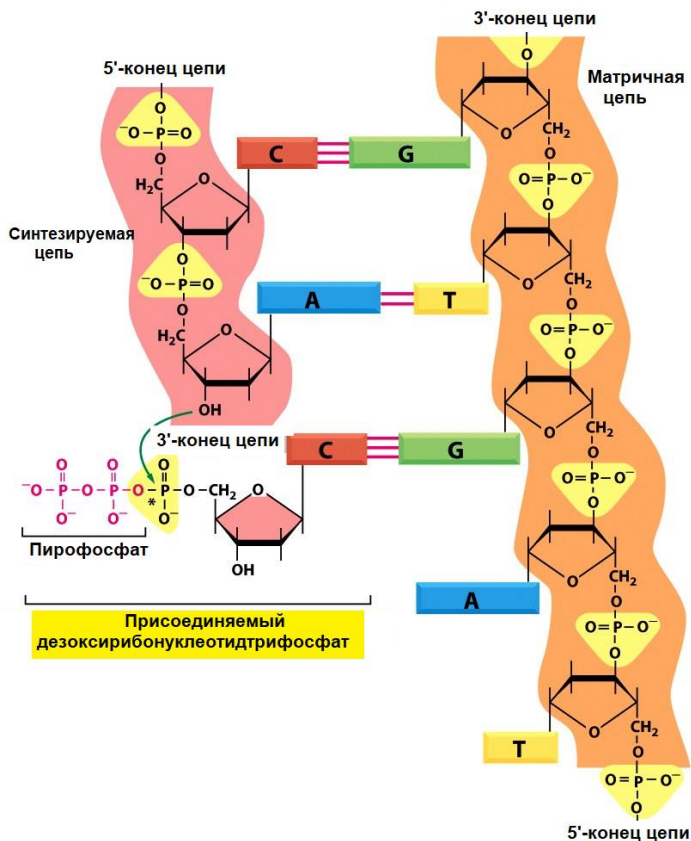


Рис. 4.1. Синтез ДНК по принципу комплементарности и в направлении от 5'-конца к 3'-концу (по Альберту Б. с соавт., 2015)

Образованию каждого фрагмента ДНК (как длинного, так и любого из фрагментов Оказаки) предшествует синтез короткой последовательности (из 10–15 нукл.) **РНК-затравки**. Для синтеза РНК-затравки требуются рибонуклеозидтрифосфаты,

а их включение происходит также по принципу комплементарности соответствующему участку ДНК.



Рис. 4.2. Схема образования дочерних цепей ДНК в репликативной вилке (по Дымышцу Г. М., 2000)

Прерывистость репликации показана для всех объектов, кроме фагов, содержащих одноцепочечную ДНК. У некоторых фагов и вирусов прерывистый синтез идет по обеим цепям. У бактерий и высших организмов одна цепь образуется непрерывно, а другая – прерывисто (лидирующая и запаздывающая цепи). Размер фрагментов Оказаки видоспецифичен и составляет для фагов 1000–2000 нукл., *E. coli* – 1000 нукл., для эукариот – 200–400 нукл.

Полуконсервативность означает, что каждая дочерняя ДНК состоит из одной матричной цепи и одной вновь синтезированной.

В конце 50-х годов было сформулировано три модели репликации ДНК (рис. 4.3):

– **Консервативная модель** – обе родительские цепи остаются вместе после репликации.

– **Полуконсервативная модель** – после репликации ДНК состоит из одной родительской и одной новосинтезированной цепи.

– **Дисперсионная модель** – после репликации каждая из цепей ДНК содержит фрагменты родительской и новосинтезированной ДНК.

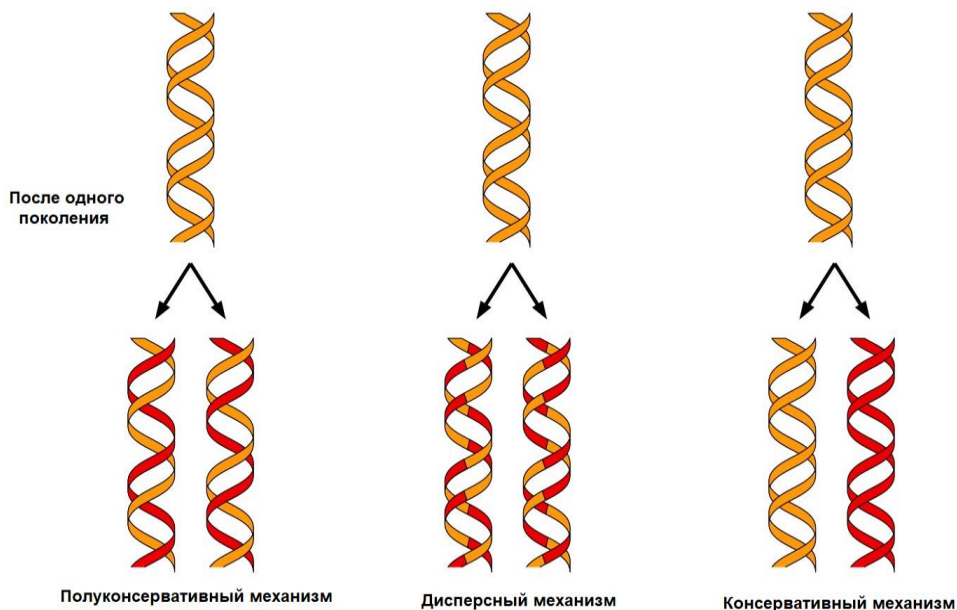


Рис. 4.3. Альтернативные модели репликации ДНК

Для выяснения вопроса о характере расхождения цепей ДНК по дочерним молекулам Мэтт Мезельсон и Фрэнк Сталь в **1958 г.** разработали метод, с помощью которого ДНК разделяется по удельной плотности (метод равновесного

центрифугирования в градиенте плотности CsCl). Сначала они выращивали бактерии длительное время на среде, содержавшей тяжёлый изотоп азота (^{15}N), который включался в ДНК, а затем переносили их на среду, содержащую лёгкий изотоп азота (^{14}N) (рис. 4.4). Анализ в градиенте плотности показал, что в ходе первого деления после пересева каждая молекула ДНК содержала одну «тяжёлую» (содержала ^{15}N) и одну «лёгкую» цепь (^{14}N). Появление ДНК с «лёгкими» и «тяжёлыми» цепями указывало на **полуконсервативный способ репликации** (рис. 4.5). Продолжение эксперимента в последующих делениях подтвердило этот результат.

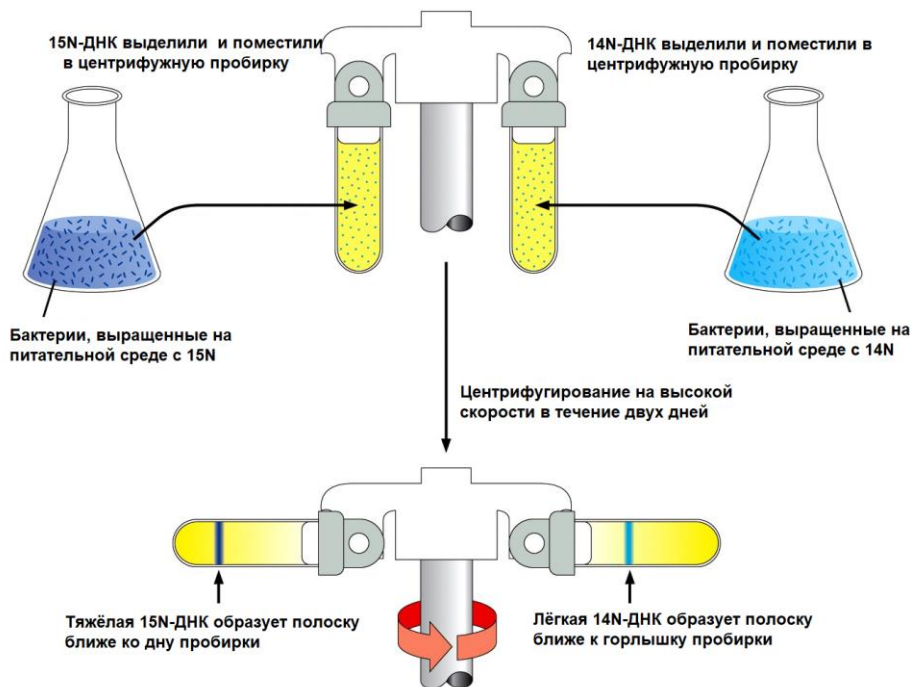


Рис. 4.4. Центрифугирование в градиенте плотности хлорида цезия позволяет разделить тяжёлую и лёгкую цепь (по Альберту Б. с соавт., 2015)

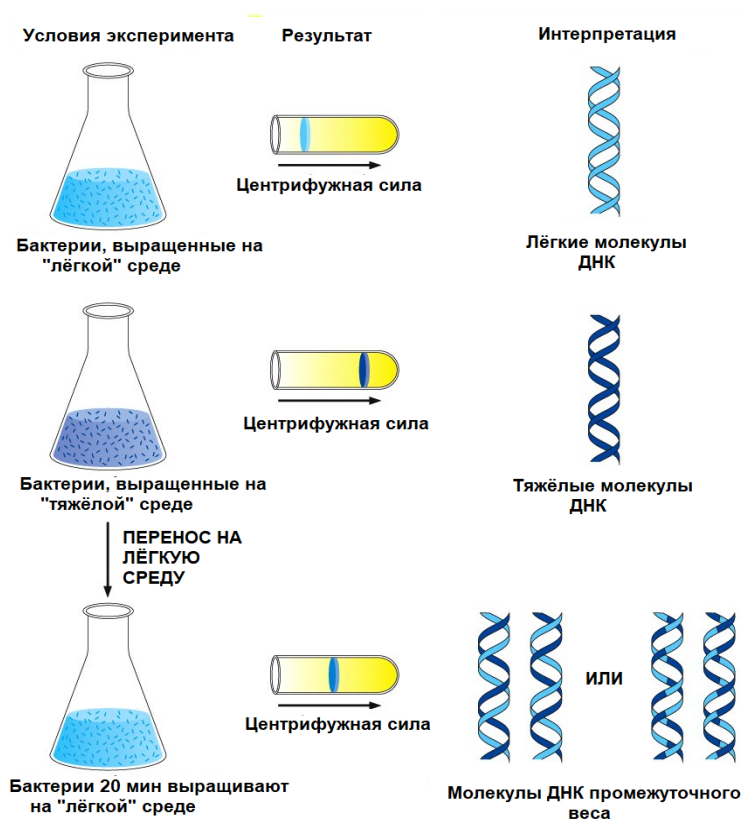


Рис. 4.5. Доказательство полуконсервативного способа репликации ДНК по М. Мезельсону и Ф. Сталю

4.2. Репликация различных ДНК и её регуляция

Репликация у прокариот. *Escherichia coli* – это бактерия, содержащая двухцепочечную кольцевую ДНК (рис. 4.6). Экспериментами Д. Кэрнса было показано, что ДНК в клетках *Escherichia coli* реплицируется, оставаясь в кольцевой форме. Репликация обычно происходит в двух направлениях, то есть существует две репликативные вилки. Обе вилки возникают в одной точке и удаляются от неё в обоих направлениях одновременно, пока снова не встретятся. В этой точке два полностью синтезированных дочерних двухцепочечных кольца

разделяются – каждое из них содержит одну старую и одну новую цепь. Функцию разделения двух новых колец выполняет топоизомераза II (рис. 4.7.).

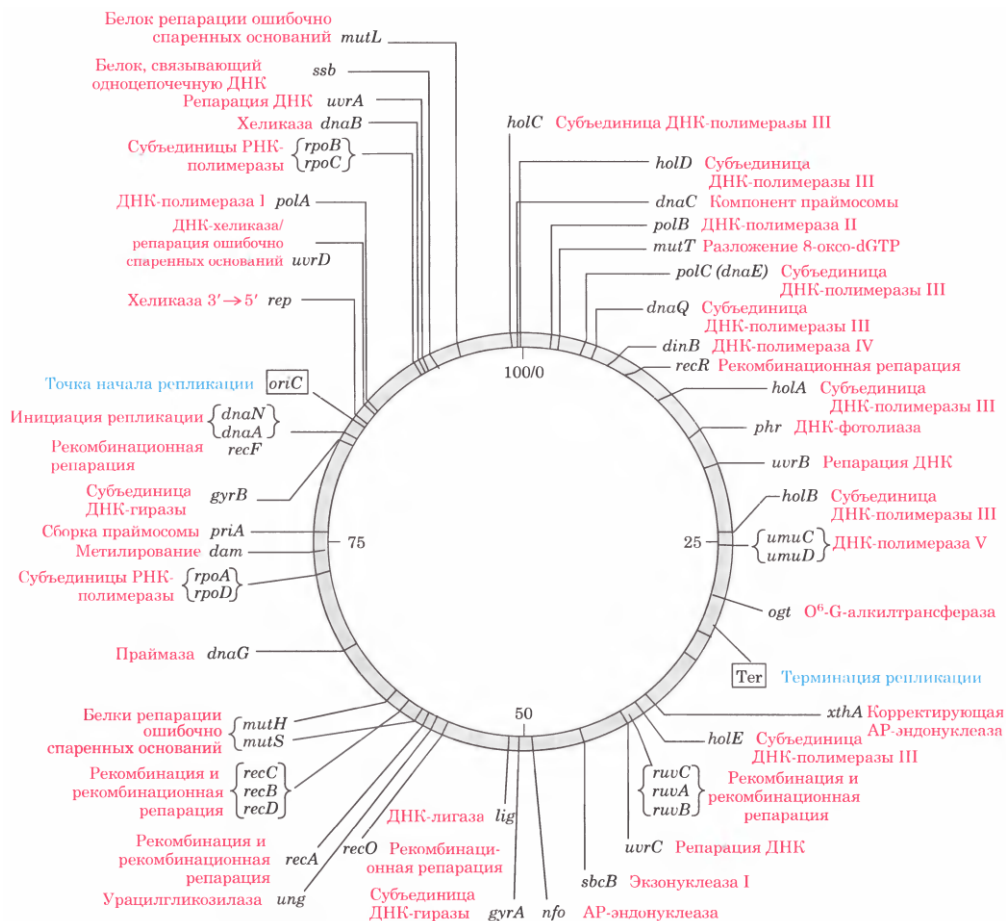


Рис. 4.6. Хромосомная карта *Escherichia coli* (по Нельсону Д., Коксу Д., 2015)

Примечание: показаны гены, кодирующие многие важные для метаболизма ДНК белки; *mut* – мутагенез; *dna* – репликация ДНК; *pol* – ДНК-полимераза; *rpo* – РНК-полимераза; *uvr* – устойчивость к УФ; *rec* – рекомбинация; *dam* – метилирование аденина; *lig* – ДНК-лигаза; *Ter* – терминация репликации; *ori* – точка начала репликации (у *E. Coli* это *oriC*).

Участок начала репликации у *Escherichia coli* (точка начала репликации – *oriC*) представляет собой нуклеотидную последовательность длиной 100–200 пар оснований, богатую парами А-Т, без которой ДНК не может реплицироваться. Эта последовательность узнаётся специфическими клеточными белками, которые начинают в этом месте цикл репликации.

В процессе репликации участвуют больше 20 различных белков (включая и ДНК-полимеразы), каждый из которых выполняет определённую функцию. Весь комплекс, состоящий более чем из 20 репликативных ферментов и факторов, называют ДНК-репликационной системой или реплисомой.

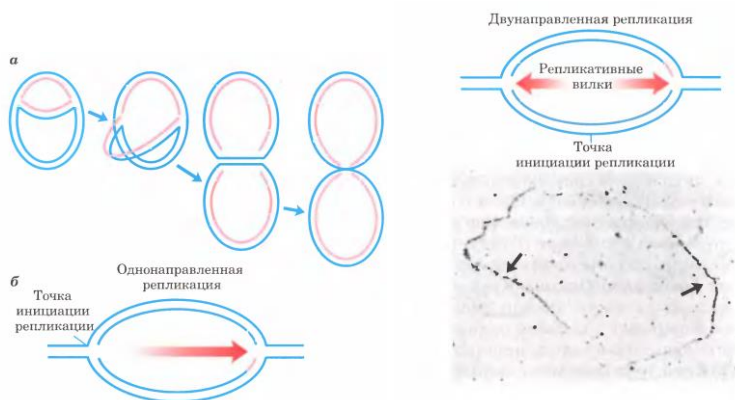


Рис. 4.7. Эксперимент Д. Кэрнса – выявление двунаправленного характера репликации ДНК (по Нельсону Д., Коксу Д., 2015)

Примечание: *а* – во время репликации кольцевой хромосомы образуется структура, напоминающая греческую букву тета (θ), так как обе нити реплицируются одновременно (дочерняя цепь показана красным цветом); *б* – репликация может происходить в одном или в обоих направлениях, что было установлено с помощью автордиографии: при внесении ^3H на короткий период непосредственно перед прекращением реакции метка (отмечена красным) обнаруживается в одной или в двух репликативных вилках соответственно; на автордиограмме показан репликационный «глазок» в ДНК *Bacillus subtilis* – самая большая плотность зёрен серебра (стрелки) наблюдалась именно в тех двух местах, где происходила репликация

(не подвергшаяся репликации часть хромосомы, находящаяся вне глазка, не содержит метки и поэтому невидима).

Основные компоненты репликативной вилки *Escherichia coli* (рис. 4.8).

1. Хеликазы (от *helix* – спираль) – расплетают двухцепочечную ДНК в районе репликативной вилки на две цепи. На это затрачивается энергия гидролиза АТФ – по 2 молекулы АТФ на разделение 1 пары нуклеотидов. Хеликаза раскручивает ДНК в обоих направлениях, создавая возможность сборки двух репликативных комплексов.

2. ДНК-топоизомеразы – раскручивают плотно свёрнутую двойную спираль ДНК. Раскручивание двойной спирали ДНК в ходе репликации приводит к возникновению положительных сверхвитков перед репликативной вилкой, которые и убираются ДНК-топоизомеразами. Они действуют на ДНК, изомеризуя или меняя её топологию.

Топоизомераза I способна только релаксировать сверхспирализованную ДНК, но не способна вводить новые витки. Фермент расщепляет одну из двух цепей ДНК, перенося её проксимальный конец на себя. Это позволяет дистальному участку ДНК вращаться вокруг соответствующей фосфодиэфирной связи целой цепи, что и предупреждает образование супервитков. Впоследствии концы разорванной цепи вновь замыкаются. Процесс легко обратим, поскольку при разрезании не происходит потери энергии. Топоизомераза I не использует энергию АТФ.

Топоизомераза II (гираза) разрывает обе нити ДНК, перенося связи на себя, что делает процесс разрыва полинуклеотидных цепей легко обратимым. Этот процесс энергозависимый и сопряжён с гидролизом АТФ. У *Escherichia coli* топоизомераза II вводит в ДНК отрицательные сверхвитки, которые «нейтрализуют» положительные сверхвитки.

С эволюционной точки зрения для выживания клеток чрезвычайно важно решение топологических проблем, и оно происходит с помощью двух топоизомераз, обладающих различными

механизмами действия. У многих организмов свойства этих ферментов несколько отличаются (табл. 4.1).

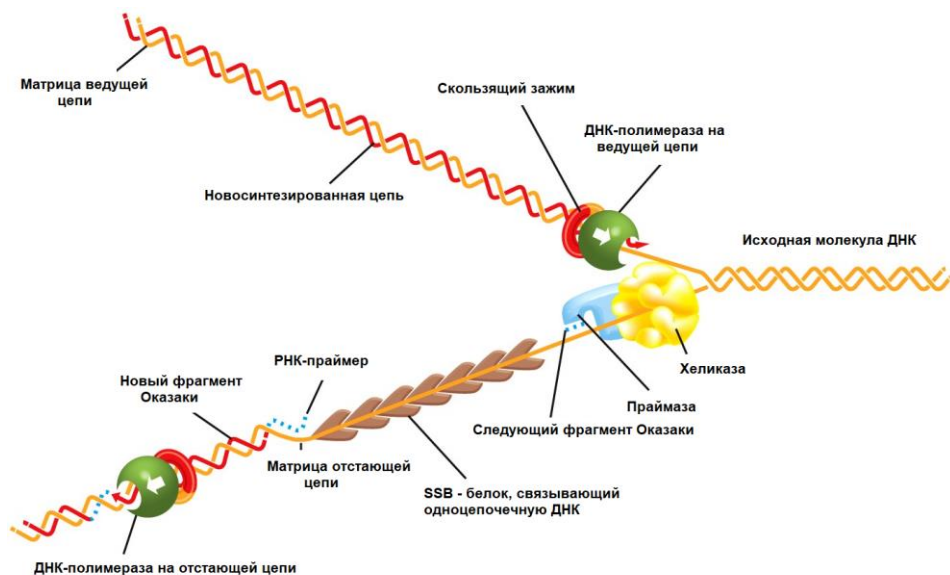


Рис. 4.8. Основные компоненты репликативной вилки *Escherichia coli*
(по Альберту Б. с соавт., 2015)

3. SSB-белки (от англ. *Single Strand Binding Proteins*; белки Альбертса, 1968) – связываются с одонитевой ДНК и после их присоединения происходит стабилизация одиночных цепей.

4. Для синтеза ДНК необходима РНК-затравка, которую синтезирует фермент **праймаза** (РНК-полимераза). Этот фермент не нуждается для инициации синтеза в свободной 3'-ОН-группе, в отличие от ДНК-полимеразы. Праймаза синтезирует короткую молекулу РНК (длиной 10–60 нуклеотидов), используя в качестве матрицы родительскую двухцепочечную ДНК. Эта РНК-затравка остаётся спаренной с расплётённой ДНК и действует как место инициации синтеза, предоставляя свою свободную 3'-ОН-группу для присоединения первого нуклеотида ДНК ферментом ДНК-полимеразой. Аналогичная затравка образуется и перед синтезом отстающей цепи только матрицей для её образования служит одноцепочечная ДНК.

5. Репликацию ДНК осуществляют особые ферменты **ДНК-полимеразы** (ДНК-Pol). Первой была открыта **ДНК-полимераза I** (Артур Корнберг, 1956). Этот фермент кодируется геном *polA*, состоит из одной полипептидной цепи, Mr103 000 Da. ДНК полимераза использует один и тот же каталитический центр для включения в ДНК четырёх разных нуклеотидов. При этом важное значение имеет мониторинг правильного спаривания. Включение ошибочного нуклеотида резко снижает скорость катализа. В настоящее время у *Escherichia coli* описано ещё четыре ДНК-полимеразы (табл. 4.2).

Таблица 4.1. Топоизомеразы *Escherichia coli* и эукариот:
типы и механизм действия (по Эллиот В., Эллиот А., 2002)

Тип	Действие на ДНК	Эффект на сверхспирализацию
Топоизомераза I		
<i>Escherichia coli</i>	Разрывает одну нить ДНК	Релаксирует отрицательную сверхспирализацию
Эукариоты	Разрывает одну нить ДНК	Релаксирует положительную и отрицательную сверхспирализацию
Топоизомераза II (гираза)		
<i>Escherichia coli</i>	Разрывает обе нити ДНК; АТФ-зависимая	Релаксирует положительные сверхвитки; включает отрицательные сверхвитки; разделяет сцепленные кольцевые молекулы ДНК
Эукариоты	Разрывает обе нити ДНК; АТФ-зависимая	Релаксирует положительные сверхвитки, но не может вводить отрицательные сверхвитки

Таблица 4.2. Свойства ДНК-полимераз *Escherichia coli*
(по Нельсону А., Коксу А., 2015)

Характеристика	ДНК-полимераза		
	I	II	III
Структурный ген	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Субъединицы (количество разных типов)	1	7	≥10
Относительная Mr	103 000	88 000*	791 500
3'→5'-экзонуклеаза (коррекция ошибок)	Да	Да	Да
5'→3'-экзонуклеаза	Да	Нет	Нет
Скорость полимеризации (нуклеотиды/с)	16–20	40	250–1000
Процессивность (число нуклеотидов, присоединённых до диссоциации полимеразы)	3–200	1500	≥500 000

Примечание: * – только субъединица, отвечающая за полимеризацию.

Важными характеристиками ДНК-полимераз являются **точность работы** и **процессивность** (способность строить длинные цепи ДНК). Точность работы обеспечивается наличием 3'→5'-экзонуклеазной активности, которая удаляет включённые по ошибке некомплементарные нуклеотиды.

ДНК-Pol I имеет полимеразный и 3'→5'-экзонуклеазный центры в составе одной полипептидной цепи. **ДНК-Pol III** состоит из 10 субъединиц; α , ϵ и θ субъединицы формируют сердцевину (кор), которая обладает ДНК-полимеразной активностью. Кроме того, α -субъединица отвечает за сборку полинуклеотидной цепи, а ϵ -субъединица обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью. Функции третьей субъединицы (θ) не известны.

Каждая репликативная вилка у *Escherichia coli* включает две молекулы ДНК-Pol III (одна синтезирует лидирующую цепь, а другая запаздывающую), которые связаны с несколькими вспомогательными белками.

В 1999 г. были идентифицированы ДНК-полимеразы IV и V – они принимают участие в необычном механизме репарации ДНК.

6. РНК-затравка удаляется из молекулы ДНК с помощью фермента **ДНК-Pol I**, действующей как 3'→5'-экзонуклеаза. Этот же фермент присоединяет вместо удалённой РНК нуклеотиды, используя при этом свою 5'→3'-полимеразную активность (рис.4.9).



Рис. 4.9. Удаление РНК-затравки у *Escherichia coli*

Примечание: когда 3'-конец синтезируемой цепи ДНК «утыкается» в 5'-конец РНК-затравки, ДНК-полимераза III вытесняется ДНК-полимеразой I, которая, обладая 3'→5'-гидролитической активностью, «съедает» РНК-затравку, одновременно продолжая синтез ДНК; когда затравка (РНК) съедена, ДНК-полимераза I вытесняется лигазой, которая сшивает концы ДНК.

7. Фермент **ДНК-лигаза** соединяет в нужном порядке фрагменты ДНК, катализируя образование фосфодиэфирной связи. Для этой реакции требуется сопряжённый гидролиз молекулы АТФ.

Репликация у эукариот. Общие принципы репликации ДНК у *Escherichia coli* применимы и к эукариотам, правда, с некоторыми поправками. Однако репликация ДНК эукариот регулируется и координируется в соответствии с клеточным циклом, что усложняет процесс. Эукариотическая ДНК также реплицируется в двух направлениях, при этом репликация начинается одновременно во многих точках. Каждая эукариотическая хромосома – **полирепликон** (рис. 4.10).

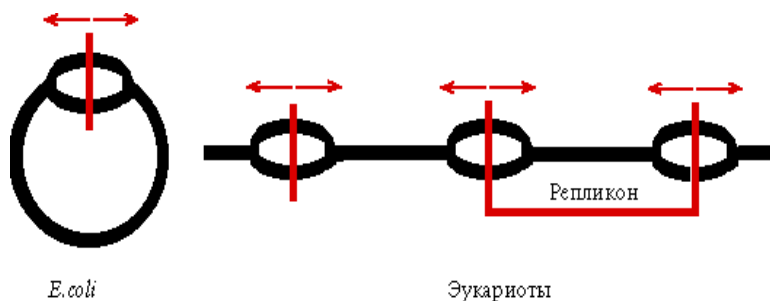


Рис. 4.10. Репликон – участок ДНК между двумя точками начала репликации

У эукариот описано пять ДНК-полимераз. Полимеразы α и δ участвуют в репликации ядерной ДНК (Pol III у *Escherichia coli*). Pol α находится в комплексе с праймазой, но не проявляет активности 3'→5'-экзонуклеазы. Полимераза δ обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью. Предполагают, что полимеразы α и δ формируют у эукариот репликативный комплекс для синтеза лидирующей цепи. Две другие ДНК-полимеразы эукариот – β

и ϵ – выполняют репарирующую функцию, а γ -полимераза участвует в репликации митохондриальной ДНК.

В репликации ДНК у эукариот задействованы ещё два белковых комплекса. Белок RPA (replication protein A) связывает одноцепочечную ДНК, и его функция аналогична функции белка SSB. Белок RFC (replication factor C) – облегчает сборку активных репликационных комплексов. Для терминации репликации линейных эукариотических хромосом на концах каждой хромосомы синтезируются специальные структуры, называемые **теломерами**.

4.3. Теломерные последовательности ДНК

В 1971 г. А. М. Оловников предположил, что при делении клетки, молекула ДНК не может воспроизвести абсолютную свою копию, как это необходимо. При делении кончик молекулы как бы обрывается. При каждом очередном делении эта молекула всё сокращается и, наконец, становится негодной для исполнения своих функций. Спустя десятилетия его предположения подтвердились (Богданов А. А., 1998). Оказалось, что концы хромосом защищены своеобразными наконечниками – **теломерами** (рис. 4.11). При каждом делении клетки теломеры сокращаются, пока не истощатся полностью. После этого, клетка больше обновляться не может. Таким образом, одна из основных функций теломер заключается в защите концов хромосом от действия повреждающих факторов разной природы, которые могут нарушить целостность хромосом.

Теломерами называют специализированные концевые районы линейной хромосомной ДНК, состоящие из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей. Кроме того, в состав теломер входят многие белки, специфически связывающиеся с теломерными ДНК-повторами (Богданов А. А., 1998; Дымшиц Г. М., 2000). Таким образом, теломеры (так же, как и все другие районы хромосомы) построены из дезокси-нуклеопротеидов, то есть комплексов ДНК с белками.

В теломерной ДНК не закодировано никаких белков, то есть она не содержит гены. Теломеры выполняют следующие

важные функции: **1)** предотвращают деградацию и слияние хромосом, то есть поддерживают целостность генома клетки; **2)** отвечают за прикрепление хромосом к ядерному матриксу и играют важную роль в создании специфической архитектуры и внутренней упорядоченности клеточного ядра; **3)** решают проблему концевой недорепликации ДНК.

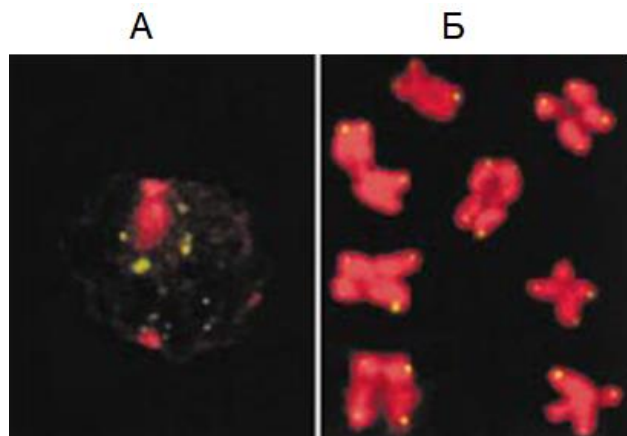


Рис. 4.11. Локализация в клеточном ядре (А) и на митотических хромосомах человека (Б) – флуоресцентная микроскопия

Теломерная ДНК простейших состоит из 6–8 нуклеотидных остатков, которые многократно повторяются. При этом одна цепь ДНК обогащена остатками гуаниловой кислоты (G-богатая цепь; у ресничной инфузории тетрахимены она состоит из TTGGGG-блоков), а комплементарная ей цепь ДНК обогащена остатками цитидиловой кислоты (C-богатая цепь) (Богданов А. А., 1998).

Теломерная ДНК человека построена из TTAGGG-блоков, то есть отличается от простейших всего лишь одной буквой в повторе. Более того, из TTAGGG-блоков построены G-богатые цепи ДНК всех млекопитающих, рептилий, амфибий, птиц и рыб. Столь же универсален теломерный ДНК-повтор у растений, включая и морские водоросли – он представлен последовательностью TTTAGGG.

Очень важная характеристика теломерных ДНК – их длина. У человека она колеблется от 2 до 20 тыс. пар азотистых оснований (табл. 4.3), а у некоторых видов мышей может достигать сотен тыс. пар оснований.

Таблица 4.3. Длина теломерной ДНК и активность теломеразы в клетках человека (по Богданову А. А., 1998)

Тип клеток	Теломеры, т. п. н.	Теломеразная активность
Половые	25–20	Высокая
Соматические	10–12 при рождении, уменьшаются с возрастом	Отсутствует
Раковые	4–6, 10–15	Присутствует в 80 % случаев

Примечание: т. п. н. – тысяч пар нуклеотидов.

У многих видов двуспиральная теломерная ДНК на самом конце содержит одноцепочечный «хвост», который представлен её G-богатой цепью и заканчивается свободной 3'-ОН-группой (рис. 4.12). Соответственно белки теломер делят на две группы: **1)** белки, связанные с одноцепочечной теломерной ДНК и **2)** белки, связанные с двухцепочечной ДНК теломеры.



Рис. 4.12. Структура двуспиральной теломеры ДНК

Теломерные белки участвуют во всех функциях теломер, поддерживая их структуру и регулируя длину теломерной ДНК. Показано, что некоторые из белков, ассоциированных с двуспиральной теломерной ДНК, регулируют активность определённых генов, повышая или подавляя их экспрессию. Например, дрожжевой белок Rap1 принимает участие в регуляции длины теломерной ДНК, а также, будучи в составе теломеры участвует в активации и репрессии транскрипции.

Таким образом, изменения или нарушения в структуре теломер могут затрагивать не только их собственные функции, но и экспрессию жизненно важных генов, находящихся в других районах хромосом.

В 1984 г. Э. Блэкберн и Э. Грайдер выделили фермент, который с помощью механизма, отличного от механизма реакций, лежащих в основе репликации, синтезирует теломерную ДНК. Это фермент был назван **теломеразой**.

Теломераза представляет собой особую ДНК-полимеразу, которая содержит в своем составе матрицу для синтеза теломерных повторов. Фермент добавляет эти повторы (один за другим) к 3'-концу предсуществующей теломерной ДНК и таким образом удлиняет её (Эллиот В., Эллиот Д., 2002). Теломераза имеет две особенности: **1)** использует РНК в качестве матрицы для синтеза ДНК – это обратная транскрипция; **2)** эта матрица включена в структуру фермента. Теломераза последовательно наращивает материнские цепи ДНК повторами, используя 3'-концы в качестве затравок. Образующиеся длинные одноцепочечные концы в свою очередь служат матрицами для синтеза дочерних цепей традиционным репликативным механизмом (рис. 4.13).

В табл. 4.4 приведены характеристики хорошо изученных белковых субъединиц нескольких теломераз.

Таблица 4.4. Характеристика некоторых субъединиц теломераз различных организмов

Организм	Белок	Длина, а. к. о.	Mr, kDa	Функция
Инфузория <i>Tetrahymena thermophila</i>	Tt-TERM	1117	133	Обратная транскриптаза Взаимодействует с р95 и теломеразной РНК Взаимодействует с одноцепочечной теломерной ДНК
	p80	807	80	
	p90	943	95	
Инфузория <i>Euplotes aediculatus</i>	p123	1031	123	Обратная транскриптаза
Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EST2	885	103	Обратная транскриптаза

Мышь <i>Mus musculus</i>	MTERT TP1	~1090 2652	130 240	Обратная транскриптаза Аналог р80
Человек <i>Homo Sa- piens</i>	HTERT TP1	~1060 2627	127 260	Обратная транскриптаза Аналог р80 (возможно, предохраняет теломер- разную РНК от деграда- ции в соматических клетках)

Примечание: а. к. о. — аминокислотных остатков.

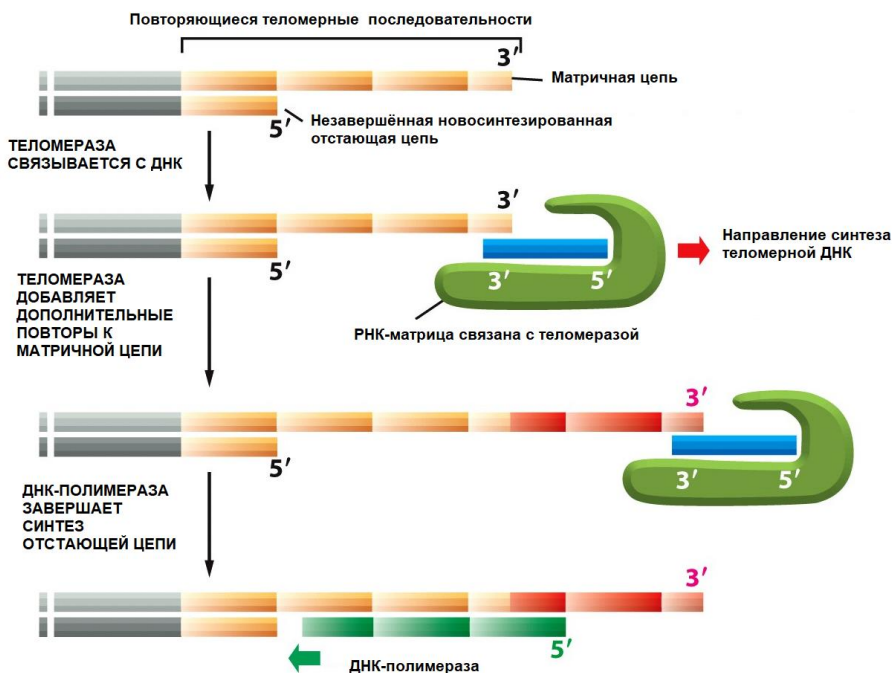


Рис. 4.13. Основные этапы синтеза одного теломерного ДНК-повтора теломеразой (по Богданову А. А., 1998; Альбертсу Б. с соавт., 2015)

Примечание: **а** – связывание теломеры – на первой стадии теломеразы находит 3'-конец теломерной ДНК, с которым часть матричного участка теломеразной РНК образует комплементарный комплекс. При этом теломераза использует 3'-конец хромосомной ДНК в качестве праймера; **б** – элонгация – наступает очередь РНК-зависимой ДНК-полимеразной активности теломеразы. Она обеспечивается

специальной субъединицей теломеразы, которая по структуре своего каталитического центра сходна с обратными транскриптазами ретровирусов и ретротранспозонов; **В** – когда синтез ДНК-повтора заканчивается, происходит транслокация, то есть перемещение матрицы и белковых субъединиц фермента на заново синтезированный конец теломерной ДНК, и весь цикл повторяется вновь.

4.4. Репарация повреждений ДНК

Передача наследственной информации в неискаженном виде является важным условием выживания, как отдельного организма, так и вида в целом. Большинство изменений в структуре ДНК совершенно недопустимы: они либо ведут к вредным мутациям, либо блокируют репликацию ДНК и вызывают гибель клеток. В клетках имеется большая группа ферментов, осуществляющих репарацию ДНК, то есть занятых исправлением нарушений, возникших в наследственной программе на одной из цепей ДНК.

Основные реparable повреждения ДНК – апуринизация, дезаминирование, тиминовые димеры, метилирование

Молекулы ДНК живых организмов неизбежно подвергаются действию различных повреждающих факторов: химических реагентов, ультрафиолетового облучения и более жёсткой радиации (рис. 4.14).

Известно четыре основных типа повреждений в молекуле ДНК:

- повреждение одиночных нуклеотидов;
- повреждение пары нуклеотидов;
- разрыв цепей ДНК;
- образование поперечных сшивок между основаниями одной цепи или разных цепей ДНК.

Система репарации способна противостоять всем типам повреждений в ДНК (Сойфер В. Н., 1997).

Механизмы репарации хорошо изучены только для повреждений одиночных и пары нуклеотидов, в основе которых

лежат изменения структуры гетероциклических азотистых оснований. Повреждения нуклеотидов включают апуринизацию, дезаминирование, образование пиримидиновых димеров и метилирование.

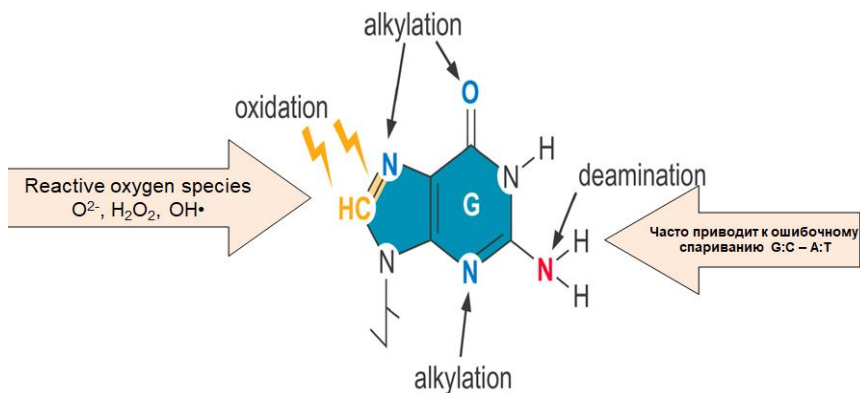


Рис. 4.14. Действие повреждающих факторов на ДНК

Апуринизация – гидролитическое выщепление азотистых оснований из полинуклеотидной цепи ДНК – приводит к образованию апуриновых сайтов (AP-сайтов) (рис. 4.15). Причинами, вызывающими апуринизацию являются: изменение pH, ионизирующее излучение, повышение температуры. В процессе апуринизации разрывается N-гликозидная связь между пуриновым основанием и дезоксирибозой. Пиримидины тоже могут отщепляться, но скорость этого процесса на два порядка ниже. Показано, что каждая соматическая клетка теряет за сутки около 10 000 пуринов и пиримидинов.

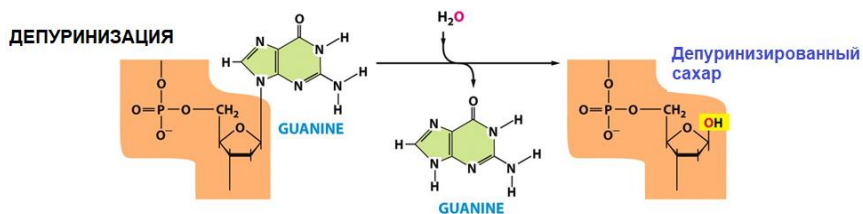


Рис. 4.15. Образование апуриновых сайтов

Дезаминирование (рис. 4.16). Азотистая кислота осуществляет дезаминирование экзоциклических аминогрупп гетероциклов, например, приводит к превращению остатков аденина в гипоксантин, гуанина в ксантин, цитозина в урацил. Продукты дезаминирования удаляются специфическими гликозилазами, в результате чего образуются AP-сайты. Тимин не может быть дезаминирован.

Образование тиминовых димеров. Под действием ультрафиолетового света происходит ковалентное сшивание рядом стоящих пиримидинов. При сшивании тиминов образуется тиминовый димер (Т-димер), блокирующий репликацию (рис. 4.17).

Метилирование ДНК. Имеется 14 позиций, по которым ДНК метилируется. Например, гуанин может быть метилирован по атому кислорода в 6-положении и в такой форме будет связываться не только с цитозином, но и с тиминном (рис. 4.18). Таким образом, в два шага может произойти замена пары G-C на A-T. Процесс метилирования ДНК в нормальных физиологических условиях приводит к образованию 4000 N⁷-метилгуанина, 600 N³-метиладенина и 10–30 O⁶-метилгуанина.

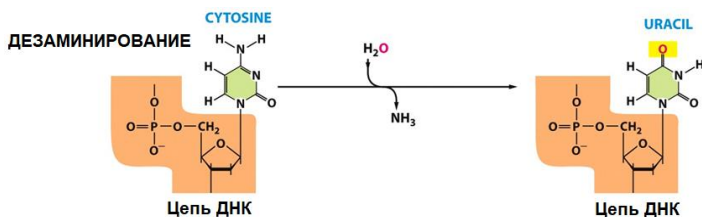


Рис. 4.16. Дезаминирование цитозина

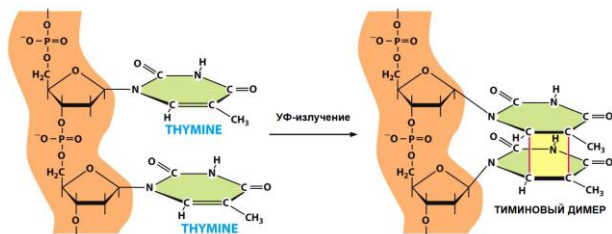


Рис. 4.17. Образование тиминовых димеров под действием УФ-излучения

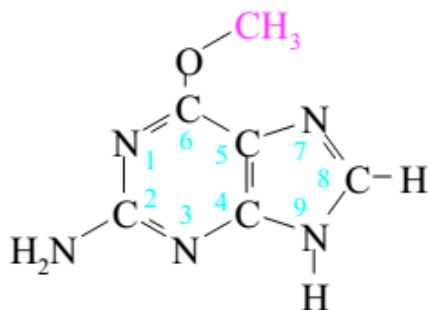


Рис. 4.18. Метилирование гуанина с образованием Об-метил-гуанина

Повреждение ДНК приводит к трём главным негативным эффектам: **1)** повреждение ДНК интерферирует (подавляет) с транскрипцией; **2)** повреждение ДНК может инициировать ряд сигналов, приводящих клетку к апоптозу или к остановке митотической активности; **3)** повреждение ДНК может иметь мутагенный эффект (Засухина Г. Д., 2011).

Механизмы репарации ДНК

Как эукариотические, так и прокариотические клетки имеют системы, репарирующие возникшие повреждения ДНК. Каждый механизм реализуется с помощью определённого набора ферментов. Системы репарации ДНК достаточно консервативны в эволюции от бактерий до человека.

Известны два типа репарации: **прямая** и **эксцизионная** (от англ. Excision – вырезание).

Прямая репарация – наиболее простой путь устранения повреждений в ДНК, в котором задействованы специфические ферменты, способные быстро (как правило, в одну стадию) устранять соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотида.

Эксцизионная репарация включает удаление повреждённых азотистых оснований из ДНК и последующее восстановление нормальной структуры молекулы. В эксцизионной репарации обычно принимают участие несколько ферментов, а сам процесс затрагивает не только повреждённый, но и соседние с ним

нуклеотиды. Кроме этого, для эксцизионной репарации необходима вторая (комплементарная) цепь ДНК (Сойфер В. Н., 1997).

В эксцизионной репарации выделяют следующие стадии (Сойфер В. Н., 1997; Засухина Г. Д., 2011) (рис. 4.19):

- 1) вырезание аномальных азотистых оснований;
- 2) разрыв в цепи ДНК с помощью фермента эндонуклеазы;
- 3) удаление ряда нуклеотидов с помощью экзонуклеазы;
- 4) Заполнение освободившегося участка комплементарными нуклеотидами с помощью ДНК-полимеразы;
- 5) сшивка репарированной цепи ДНК ферментом ДНК-лигазой.

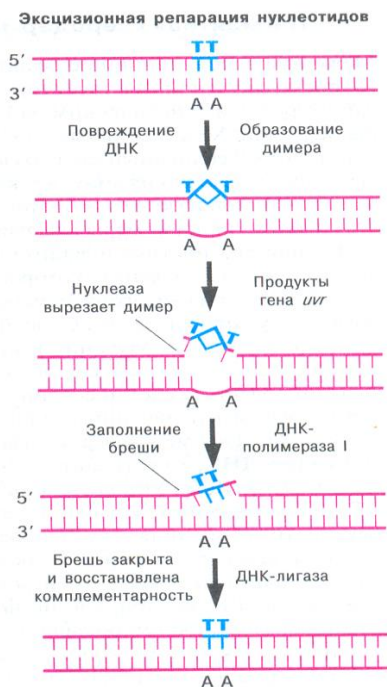


Рис. 4.19. Стадии эксцизионной репарации (по Клягу У., Каммингу М., 2007)

Репарация апуринизированной (апиримининовой) ДНК (рис. 4.20). Репарация апуринизированной ДНК осуществляется с помощью фермента – **апуриновой эндонуклеазы**, которая находит участок апуриновой ДНК и вырезает его. Затем этот фрагмент замещается при участии ДНК-полимеразы I

и ДНК-лигазы. Кроме того, AP-сайты могут репарироваться путём прямой вставки пуринов при участии ферментов ДНК-инсертаз (от англ. Insert – вставлять).

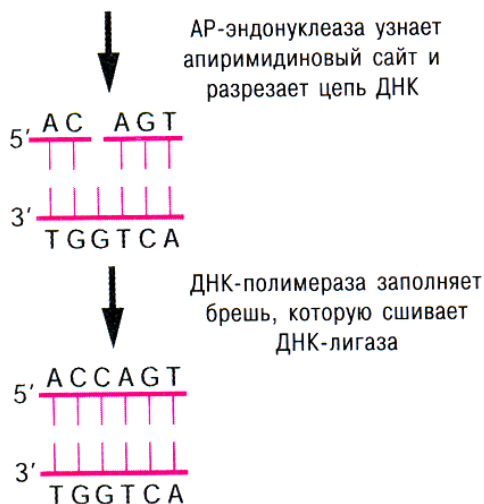


Рис. 4.20. Репарация апириимидиновой ДНК

Репарация повреждений ДНК дезаминированием (рис. 4.21). Наличие тимина в ДНК позволяет отличать дезаминированный цитозин. **N-гликозилаза** – фермент, который узнаёт дезаминированное основание, разрывает N-гликозидную связь и удаляет неправильное основание. После этого апуриновая эндонуклеаза вносит одноцепочечный разрыв, и фосфодиэстераза отщепляет от ДНК ту дезоксирибозу, к которой теперь не присоединено азотистое основание. Появляется брешь размером в один нуклеотид. У бактерий она заделывается **ДНК-полимеразой I**, а **лигаза** сшивает концы ДНК. У эукариот брешь заделывает **ДНК-полимераза ϵ** .

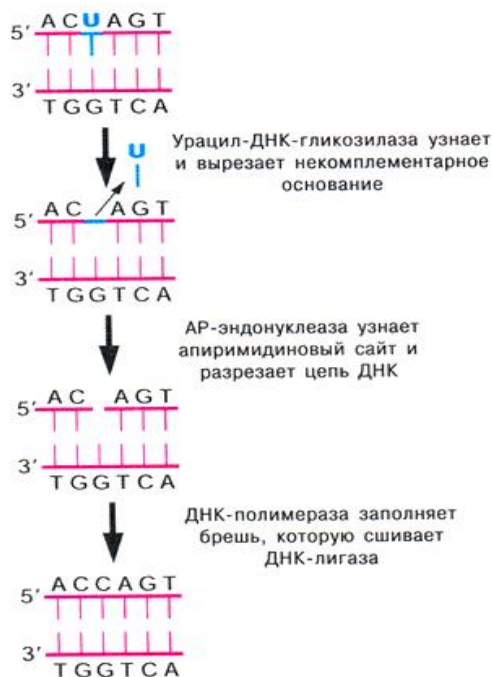


Рис. 4.21. Репарация повреждений ДНК дезаминированием

Репарация тиминовых димеров. Тиминовые димеры «расшиваются» путём прямой репарации при участии фермента **фототиаза**. Фермент фототиаза – узнаёт тиминовые димеры и на свету или в темноте образует с ними комплекс. При освещении видимым светом происходит активация фермента, Т-димер разрывается, и вновь получаютс я два тимина (рис. 4.22). Этот процесс называется фотореактивацией. Этот механизм был, по-видимому, потерян у млекопитающих в процессе эволюции. Показано, что фотореактивация эффективна к низшим эукариот – дрожжей и активна у прокариот.

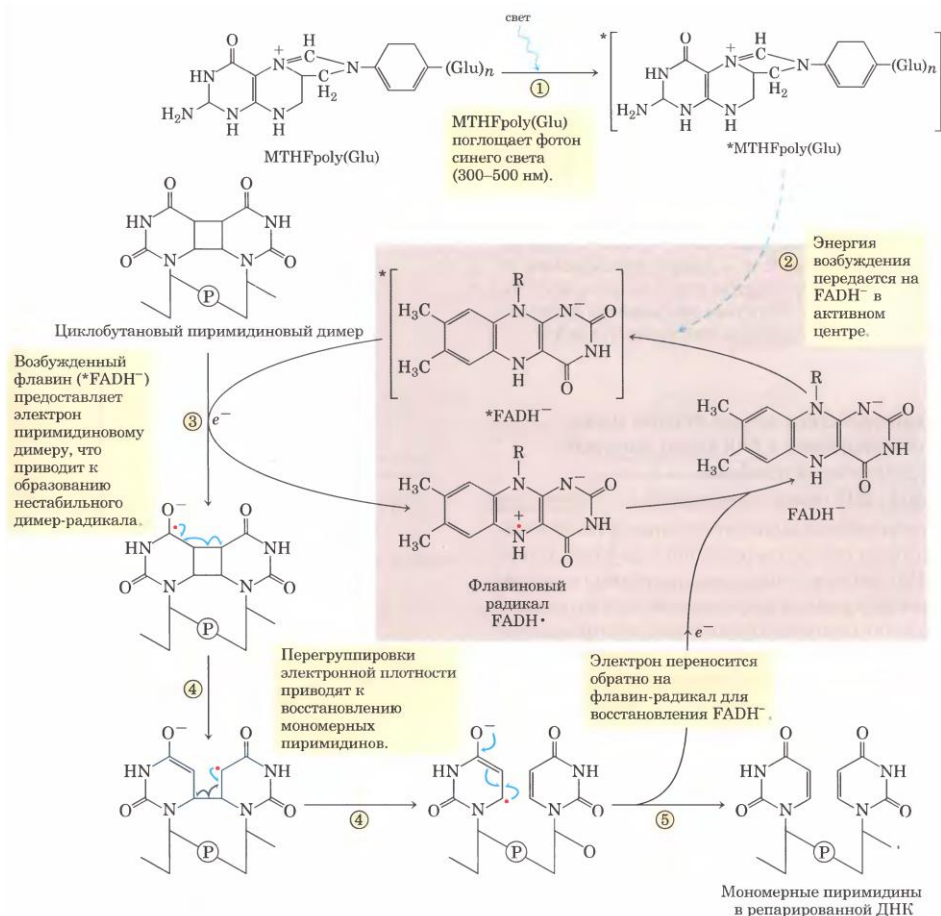


Рис. 4.22. Репарация тиминовых димеров (по Нельсону Д., Коксу А., 2015)

Примечание: энергия поглощённого света используется для ликвидации последствий фотореакции, вызвавшей повреждение. У *Escherichia coli* совместно работают два хромофора фотолиазы ($\text{Mr}=54000$): N^5 , N^{10} -метенилтетрагидрофолилполиглютамат (MTHFpolyGlu) и FADH^- . MTHFpolyGlu выполняет функцию антенны, поглощая фотоны синего света (300–500 нм). Энергия возбуждения передаётся на FADH^- , и возбуждённый флавин ($^* \text{FADH}^-$) отдаёт тиминovому димеру, устраняя повреждение.

Репарация метилированных азотистых оснований (рис. 4.23). Метилированные азотистые основания репарируются при помощи фермента ***O*⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы**. Этот фермент снимает метильную группу ($-\text{CH}_3$) с азотистого основания на один из собственных из 12 остатков цистеина и при этом «гибнет».

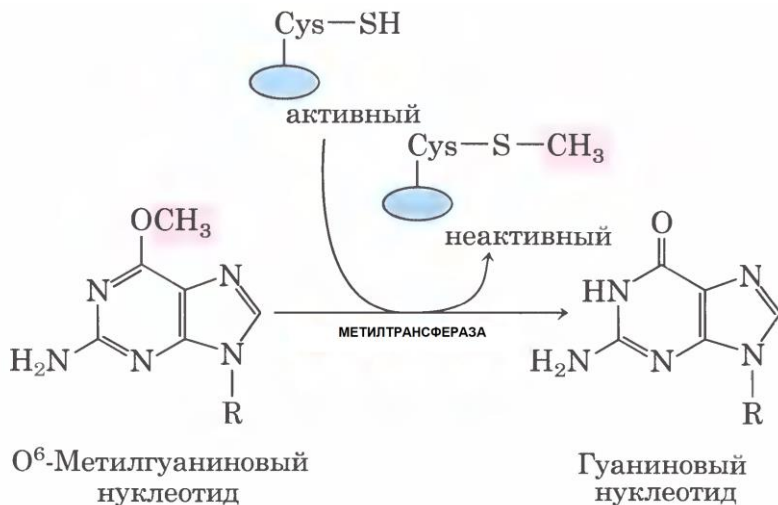


Рис. 4.23. Репарация метилированных азотистых оснований

Все описанные выше типы репарации катализируются **конститутивными ферментами**, присутствующими в клетках в постоянных количествах.

Кроме того, существует репарация, осуществляемая **индуцибельными ферментами** – **SOS-репарация**. Этот механизм включается для спасения клетки в условиях, когда нарушения ДНК реально угрожают её жизнеспособности.

При этом:

1. Снижается скорость репликации ДНК, что делает процесс репарации более эффективным.
2. Блокируется деление клеток.
3. Индуцируется синтез ряда защитных белков, в частности белков теплового шока.

Действие SOS-репарации носит кратковременный характер, и примерно через 30–60 мин она переключается на конститутивную репарацию.

Репарация ошибок репликации (репарация ошибок спаривания – mismatch repair). Высокая точность репликативного аппарата клетки предотвращает ошибки при копировании ДНК. Несмотря на эту защиту, такие ошибки всё же возникают. Поэтому в клетке существует система репарации неспаренных нуклеотидов (рис. 4.24). Так, у *Escherichia coli* репарация неправильного спаривания основана на **метилировании ДНК**. Последовательности ДНК узнаются и метилируются с участием фермента **аденинметилазы**.



К каждому остатку аденина присоединяется метильная группа, и такая модификация сохраняется в течение всего клеточного цикла (Клаг У., Каммингс М., 2007). С началом следующей репликации ДНК вновь синтезированная цепь оказывается неметилированной и эндонуклеазы вырезают основания, неправильно встроенные как с 5'-, так и с 3'-конца этой цепи. Отщепленная последовательность деградирует и замещается комплементарной ещё до образования неправильной пары и последующей её эксцизии в ходе проверки ошибок спаривания.

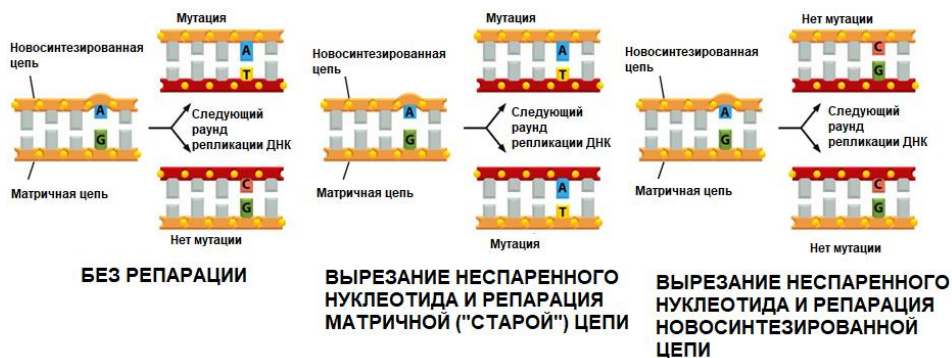


Рис. 4.24. Репарация ошибок репликации (Альбертс Б. с соавт., 2015)

Белки, участвующие в этом процессе, слегка отличаются по структуре, в зависимости от того, с какого конца цепи отщепляются нуклеотиды. В распознавание цепей вовлечены такие белки *Escherichia coli*, как MutH, L, S и U. Мутации в одном из генов, кодирующих эти белки, приводят к дефектности системы исправления ошибок спаривания. Механизм репарации ДНК с участием гомологичных белков, сходный с описанным у *Escherichia coli*, известен также у дрожжей и млекопитающих.

В настоящее время благодаря многочисленным исследованиям выявлены заболевания, обусловленные дефектами различных систем репарации (табл. 4.5).

Таблица 4.5. Примеры наследственных болезней, обусловленных дефектами в системе репарации (по Сойфер В. Н., 1997)

Болезнь	Что нарушено в системах репарации	Затронутые гены	Симптомы заболевания
Болезни, вызываемые преимущественно дефектами в системе эксцизионной репарации			
Пигментная ксеродермия (ПК) Классическая ПК (ей соответствуют 90 % клинических случаев ПК)	Эксцизионная репарация нуклеотидов (нарушение вырезания, застройки брешей и др.). Разнообразные дефекты репарационных процессов, контролируемых многими генами (так называемые варианты ХР-генов), активно изучаются в настоящее время	ХРА ХРВ ХРС ХРD ХРЕ ХРF ХРG	Сверхчувствительность к УФ-свету, ведущая к появлению красных пятен на коже, переходящих в незаживающие коросты и нередко в рак кожи; неврологические расстройства (синдром Де Санктиса-Качиони); поражения век, бровей и глаз. Распространение: 1 случай на 250 000 человек в Европе и США; 1:40 000 человек в Японии
Вариантная ПК (10% случаев)	Наряду с некоторыми дефектами, присущими классической ПК, наблюдается изменение параметров репликации ДНК	(Так называемые варианты ХР-генов)	

Трихотриодистрофия (ТТД)	Повышенная фоточувствительность ДНК (примерно в 50% случаев заболеваний), нарушение вырезания димеров тимина или недостаточная скорость застройки брешей после вырезания нуклеотидов, возможны нарушения транскрипции	XPB и, возможно, другие гены	Нехватка серы в белках волос и их луковиц, ведущая к ломкости волос, «тигровость» волос (чередование светлых и тёмных полос по длине волоса, выявляемое под микроскопом); ихтиоз; часто умственная и физическая отсталость; дефекты полового развития; аномалии кожи и зубов; нередко раковые заболевания
Синдром Кокэйна	Дефекты репарирующих эндонуклеаз и дефектность репарации повреждённых в транскрибируемых участках ДНК	CSA CSB XPB XPB? XPG	Карликовость, вызываемая задержкой роста и развития в младенческом и детском возрасте при нормальном уровне гормонов роста, глухота, атрофия зрения, кальцификация костей черепа и др.
Анемия Фанкони	Дефекты репарации повреждений от химических мутагенов и канцерогенов (но не УФ-света), обусловленные дефектами эндонуклеаз, дефектами распознавания кросс-сшивок ДНК; пониженная способность к апоптозу после ионизирующего облучения; двукратное удлинение G ₂ -фазы клеточного цикла и др.	FAA FAB FAC	Сверхчувствительность к химическим мутагенам и канцерогенам, уменьшение количества всех клеточных элементов крови, различные аномалии врождённых способностей, деформация пальцев и другие виды скелетных нарушений, урогенитальные нарушения, микроцефалия, микрофтальмия, дефекты уха и потеря слуха, сердечные и гастроинтестинальные нарушения

Болезни, вызываемые преимущественно дефектами репаративного синтеза и дефектного клеточного ответа на поражения ДНК			
Атаксия-телангиэктазия (синдром Лун-Бара)	Дефекты репаративного синтеза ДНК, нарушения клеточного цикла, высокая частота спонтанных хромосомных аномалий, увеличенная чувствительность к ионизирующим излучениям и радиониметикам, к УФ-свету и агентам сходного действия (таким, как 4-нитрохинолиноксид)	Четыре группы комплементации	Появляется у одного из 40 тыс. новорождённых, основные поражения отмечены в нервной и иммунной системах (мозжечковая атаксия, приводящая к нарушениям координации мышц, шатающейся походке и прогрессирующей умственной отсталости, кожным нарушениям, предрасположенности к раковым заболеваниям и др.)
Синдром Блума	Замедленная репликация ДНК и подавленный репаративный синтез, высокая частота хромосомных аберраций, особенно сестринских хроматидных обменов, по-видимому обусловленная низкой активностью лигаз (молекулярная причина дефекта пока неясна)		Резко уменьшенный вес новорождённых, задержанный рост; при непродолжительном пребывании на солнечном свете на лице появляется характерная красная пигментация, по форме напоминающая бабочку и вызванная расширением капилляров; повышенная чувствительность к вирусным инфекциям; резко повышенный риск раковых заболеваний

Болезни, вызываемые преимущественно дефектами мисмэтч-репарации			
Наследственный неполипозный рак прямой кишки	Исследования 1994 года показали, что наиболее часто болезнь вызывается дефектами мисмэтч-репарации	Аналоги бактериальных генов MutS и MutL	Наиболее часто встречающаяся наследственная предрасположенность к раку (1:200 человек), требующая, как правило, каскада последовательного мутирования специфических локусов в нескольких хромосомах человека, приводящего к активации нескольких онкогенов

Задания для внеаудиторной работы

1. Доказательства генетической роли нуклеиновых кислот.
2. Структура ДНК. Полиморфизм ДНК.
3. Компактизация ДНК. Структура хроматина.
4. Репликация различных ДНК и её регуляция.
5. Теломерные последовательности ДНК и их функции.
6. Теломераза – механизм действия. Теломераза и старение.
7. Основные реparable повреждения в ДНК – апуринизация, дезаминирование, образование тиминовых димеров, метилирование.
8. Принципы устранения повреждений в ДНК.

Основные термины и понятия

Апуриновый сайт
 Геликаза
 ДНК-полимераза
 Корректирующая активность
 Лигаза
 Лидирующая цепь
 Матричная цепь
 Ориджин репликации
 Отстающая цепь

Репарация
Репликативная вилка
Репликация
Теломераза
Теломерные отделы ДНК
Тиминовые димеры
Топоизомеразы
Фрагмент Оказаки
Эксонуклеазы
Эндонуклеазы

Задания для аудиторной работы

Тема: Репликация и репарация ДНК

Решите задачи.

Задача 1. Что такое репликация ДНК? В чём заключается биологический смысл репликации ДНК?

Задача 2. а) Напишите нуклеотидную последовательность участка ДНК, синтезируемого ДНК-полимеразой, на указанной ниже матрице ДНК: **5'-AGCTTGCAACGTTGCATTAG-3'**.

б) Теперь напишите нуклеотидную последовательность матричной РНК, транскрибируемой РНК-полимеразой при использовании в качестве матрицы новосинтезированной цепи ДНК, полученной в пункте **а)** этой задачи.

Задача 3. Составьте список предпшественников и ферментов, необходимых для синтеза ведущей и отстающей цепи при репликации ДНК.

Задача 4. Заполните пропуски в следующих утверждениях.

А. Фермент, ответственный за синтез ДНК, как при репликации, так и при репарации, называется _____.

Б. Фермент, который сшивает разрывы в ДНК во время синтеза ДНК или её репарации, называется _____.

В. Та дочерняя цепь ДНК, которая при репликации синтезируется непрерывно, называется _____, а та цепь, которая синтезируется с перерывами _____.

Г. Для ДНК-полимеразы в отличие от РНК-полимеразы совершенно необходим 3'-ОН-конец _____, спаренной с расплетённой ДНК, чтобы присоединять к нему новые нуклеотиды.

Д. Для инициации синтеза ДНК на отстающей цепи нужны короткие праймеры, возникающие благодаря работе фермента _____, которая в качестве субстратов использует рибонуклеозидтрифосфаты.

Е. Расплетание двойной спирали ДНК в зоне репликативной вилки катализируется _____, использующей для направленного движения по ДНК энергию гидролиза АТФ.

Ж. Способствующие расплетанию ДНК _____ связываются с одноцепочечной ДНК таким образом, что основания становятся доступными для реакции матричного синтеза.

З. Если ДНК-полимераза ошибочно присоединит неправильный нуклеотид к 3'-концу, её отдельный каталитический домен, обладающий 3'→5'-_____ активностью, удалит неподходящее основание.

Задача 5. Выполните «цепное» задание:

а) в ходе репликации матрицей для синтеза новых молекул ДНК служат:

- А. Повреждённая нить ДНК
- Б. мРНК
- В. Обе нити ДНК
- Г. тРНК

б) на этапе инициации эта нуклеиновая кислота связывается с:

- А. ДНК-полимеразой α
- Б. SSB-белками
- В. РНК-полимеразой
- Г. ДНК-топоизомеразой

в) с помощью выбранного компонента происходит:

А. Гидролиз 3',5'-фосфодиэфирной связи в одной из цепей ДНК

- Б. Синтез олигорибонуклеотида
- В. Удлинение новых цепей ДНК

г) к полученному продукту присоединяется:

- А. ДНК-полимераза β
- Б. ДНК-полимераза δ
- В. ДНК-хеликаза
- Г. ДНК-лигаза

д) фермент катализирует:

- А. Расплетение двойной спирали ДНК за счёт энергии АТФ
- Б. Удлинение нити ДНК
- В. Соединение фрагментов Оказаки
- Г. Заполнение брешки между двумя фрагментами ДНК

е) это обеспечивает:

- А. Образование высокомолекулярного продукта
- Б. Присоединение ДНК-полимеразы α
- В. Комплементарное взаимодействие матрицы и продукта
- Г. Рост лидирующей цепи ДНК

Задача 6. Установите соответствие.

- А.** ДНК-полимераза δ
- Б.** ДНК-лигаза
- В.** Эндонуклеаза
- Г.** ДНК-N-гликозилаза
- Д.** ДНК-инсертаза

- 1.** Устраняет «брешь» на повреждённой нуклеотидной цепи
- 2.** Гидролитически удаляет повреждённое основание
- 3.** Катализирует образование N-гликозидной связи

Задача 7. Установите соответствие.

Ферменты репликации:

- А.** ДНК-полимераза δ
- Б.** РНКазы
- В.** ДНК-лигаза
- Г.** ДНК-полимераза β
- Д.** ДНК-полимераза α

Функции:

- 1.** Связывает фрагменты Оказаки друг с другом
- 2.** Синтезирует РНК-праймер
- 3.** Катализирует синтез лидирующей цепи ДНК

Задача 8. Установите соответствие.

Ферменты репарации:

А. Эндонуклеаза

Б. Экзонуклеаза

В. Инсёртаза

Г. ДНК-полимераза β

Д. ДНК-N-гликозилаза

Функции:

1. Расщепляет связь между повреждённым азотистым основанием и пентозой

2. Гидролизует 3',5'-фосфодиэфирную связь в повреждённой цепи ДНК

3. Присоединяет азотистое основание к апуриновому сайту

Задача 9. Заполните таблицу отличий ДНК от мРНК.

Признак	ДНК	мРНК
Азотистые основания		
Сахар		
Функция в клетке		
Особенности строения молекулы		
Локализация в клетке		

Задача 10. Заполните таблицу.

Молекула	Мономеры	Функция	Место в клетке	Особенности строения
ДНК				
мРНК				
тРНК				
рРНК				

Глава 5

Транскрипция. Регуляция транскрипции у прокариот и эукариот. Процессинг

5.1. Общая характеристика транскрипции

В молекуле ДНК в виде последовательности из четырёх азотистых оснований закодирована определённая **генетическая информация**.

- о структуре всех белков и РНК организма;
- о порядке реализации этой информации в разных клетках в процессе онтогенеза и при различных функциональных состояниях.

В процессе **репликации ДНК** генетическая информация **воспроизводится целиком**, чтобы затем передаваться дочерним клеткам. Но, кроме того, эта информация **экспрессируется** (реализуется) в клетке, обуславливая все проявления её жизнедеятельности.

Экспрессия информации о структуре определённого белка включает два основных этапа (рис. 5.1):

а) Первый из них – **транскрипция** – процесс переноса генетической информации от ДНК к РНК. Все виды РНК – матричная, рибосомная и транспортная – синтезируются в соответствии с последовательностью оснований в ДНК, служащей матрицей. Транскрибируется только одна, так называемая «+»-цепь ДНК.

В результате транскрипции образуются **предшественники РНК** (преРНК), которые в ядре подвергаются созреванию, или **процессингу**. При этом преРНК претерпевают существенную модификацию и, после этого уже зрелая РНК поступает из ядра в цитоплазму.

б) Второй из основных этапов экспрессии генов – **трансляция** – биосинтез белка на рибосомах по программе, диктуемой мРНК. Суть этой программы – определение очерёдности, в которой аминокислоты должны включаться в строящуюся пептидную цепь.

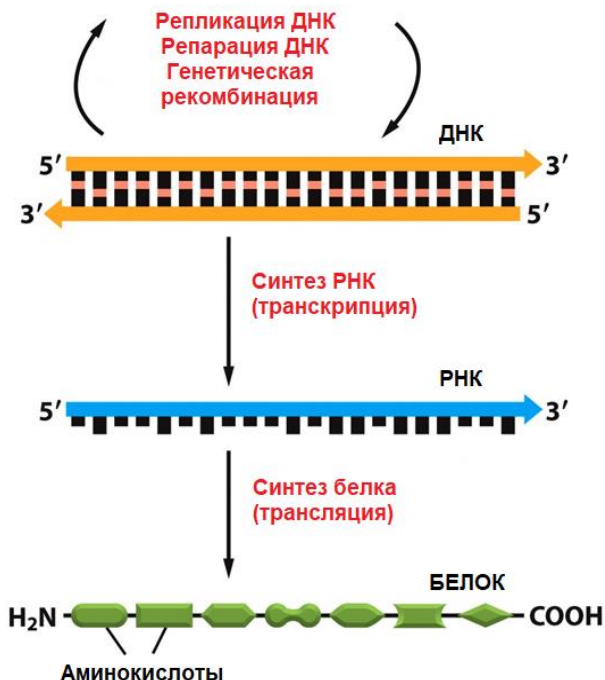


Рис. 5.1. Реализация генетической информации

Транскрипция – это синтез всех видов РНК по матрице ДНК, осуществляемый ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой.

У прокариот синтез всех видов РНК осуществляется одним и тем же ферментом. У эукариот выделяют 3 специализированные РНК-полимеразы:

- **РНК-полимераза I**, синтезирующая пре-рРНК;
- **РНК-полимераза II**, ответственная за синтез пре-мРНК;
- **РНК-полимераза III**, синтезирующая пре-тРНК.

Субстратами для РНК-полимераз служат рибонуклеозид**три**-фосфаты (активированные нуклеотиды – аденозин**три**фосфат, гуанозин**три**фосфат, уридин**три**фосфат, цитидин**три**фосфат). Поэтому весь процесс транскрипции осуществляется за счёт энергии макроэргических связей активированных нуклеотидов.

Выделяют следующие **принципы транскрипции**:

1. Комплементарность.
2. Антипараллельность.
3. Униполярность.
4. Беззатравочность.
5. Асимметричность.

6. Консервативность процесса – молекула ДНК по окончании синтеза РНК возвращается в исходное состояние.

РНК синтезируется комплементарно и антипараллельно транскрибируемой цепи ДНК. Рост цепи РНК идёт только в направлении $5' \rightarrow 3'$. Это значит, что у этой цепи очередные нуклеотиды присоединяются к $3'$ -концу. Для начала синтеза РНК фермент не нуждается в поли- или олигонуклеотидной затравке. Первый нуклеотид в РНК всегда пурин в форме **трифосфата** (АТФ или ГТФ) (рис. 5.2).

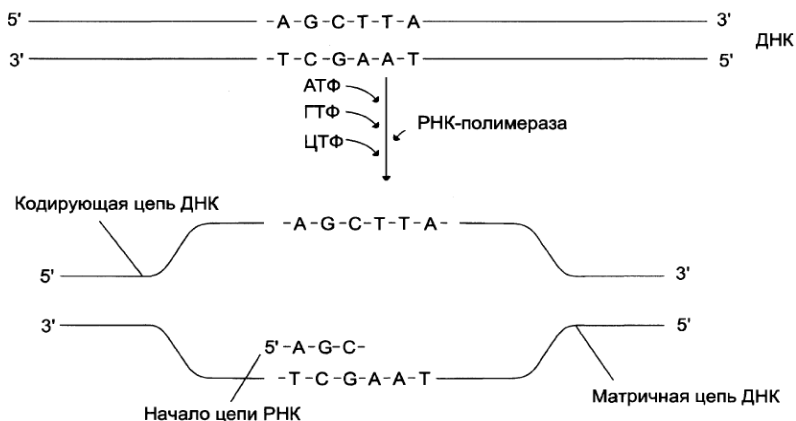


Рис. 5.2. Синтез РНК

Понятие об опероне и транскриптоне (рис. 5.3, 5.4).

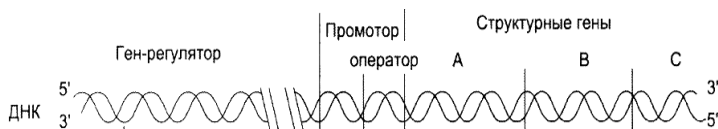


Рис. 5.3. Структура оперона прокариот

Оперон – это единица транскрипции у прокариот. В начале каждого оперона находится промотор. В конце каждого оперона находится терминатор. Перед терминатором располагаются структурные гены, или цистроны. Между промотором и цистронами может находиться оператор.

Промотор – это особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как посадочная площадка и старт синтеза РНК. Только с промотора может начаться синтез специфической РНК.

Терминатор – это особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как финиш транскрипции.

Цистрон – это последовательность нуклеотидов ДНК, кодирующая один полипептид (в большинстве случаев – белок) или одну тРНК, или одну рРНК. В большинстве случаев цистроны объединяются в оперон по следующему принципу: закодированные в них белки принимают участие в одной биохимической цепи реакций.

Оператор – это особая последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая белком-репрессором. У оператора диспетчерская функция – он разрешает или запрещает синтез РНК.

У эукариот участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции – **транскриптон**. В состав транскриптона, как правило, входит только один ген. Соотношение информативной и неинформативной частей в транскриптонах эукариот составляет в среднем 1:9 (у прокариот в оперонах 9:1) (рис. 5.4).



Рис. 5.4. Структура транскриптона эукариот

В процессе транскрипции транскрибируются обе цепи ДНК, но в каждом отдельном опероне или транскриптоне

только одна из них. Какая именно, определяется положением промотора и терминатора (рис. 5.5).

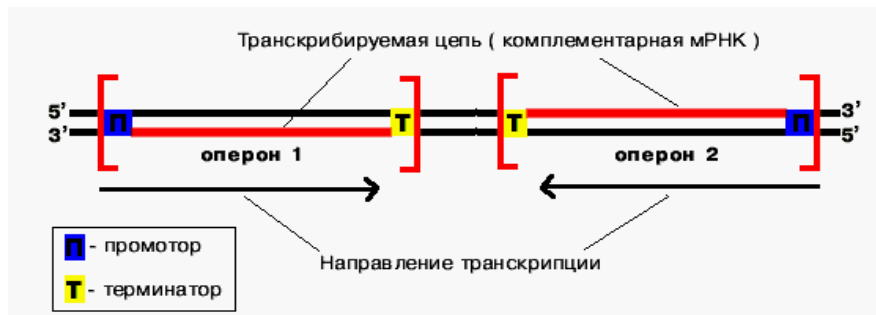


Рис. 5.5. Направление транскрипции, определяемое положением промотора и терминатора в гене

Субъединичный состав РНК-полимеразы (рис. 5.6).

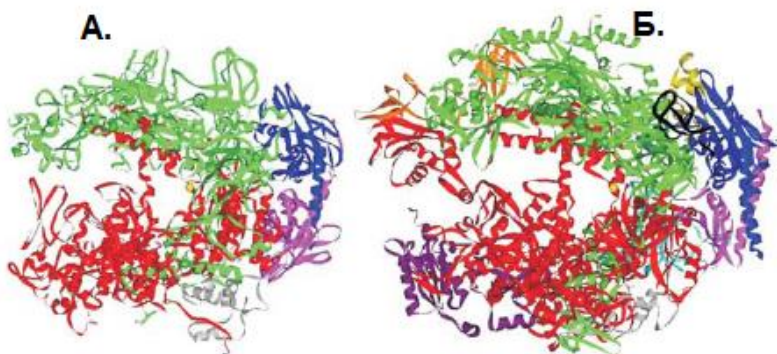


Рис. 5.6. Структура бактериальной РНК-полимеразы (А) и РНК-полимеразы II эукариот (Б)

РНК-полимераза – белок с четвертичной структурой. Субъединичный состав фермента: $(2\alpha)\beta\beta'\sigma$ – **holo**-фермент (полный фермент). Без σ -фактора это **core**-фермент $(2\alpha)\beta\beta'$. Только **holo**-фермент обладает высоким сродством к специфической последовательности нуклеотидов – промотору, сродство к остальным случайным последовательностям ДНК у него

снижено в 10 000 раз. У *core*-фермента одинаковое сродство к любой последовательности нуклеотидов.

Сам по себе σ -фактор обладает наименьшим сродством к ДНК по сравнению с другими субъединицами РНК-полимеразы, однако он придаёт *holo*-ферменту такую конформацию, которая обладает повышенным сродством к промотору. Как только произошла инициация транскрипции, σ -фактор отделяется. **Элонгация** – продолжение синтеза РНК, и **терминация** – его остановка, осуществляются *core*-ферментом.

Две α -субъединицы – составляют каркас РНК-полимеразы. К ним крепятся остальные субъединицы. β' -субъединица отвечает за прочное связывание с ДНК за счёт кластера положительно заряженных аминокислот. В β -субъединице находятся два каталитических центра. Один отвечает за инициацию, а другой – за элонгацию. Один центр работает в *holo*-, а другой – в *core*-ферменте.

5.2. Этапы транскрипции

В процессе транскрипции можно выделить четыре стадии: **1) связывание** РНК-полимеразы с промотором; **2) инициация** – начало синтеза РНК (заключается в образовании первой фосфодиэфирной связи между АТР или ГТР и вторым нуклеотидом синтезирующейся молекулы РНК); **3) элонгация** – рост цепи РНК, то есть последовательное присоединение нуклеотидов друг к другу в том порядке, в котором стоят комплементарные им нуклеотиды в транскрибируемой цепи ДНК; **4) терминация** – завершение синтеза РНК.

Узнавание и прочное связывание РНК-полимеразы с промотором (рис. 5.7).

Узнавание и прочное связывание РНК-полимеразы с промотором происходит на разных участках ДНК. Эти участки отличаются и по первичной, и по вторичной структуре. РНК-полимераза узнаёт промотор, покрывая 40–60 пар нуклеотидов. В промоторе узнаётся взаимное расположение двух расплавленных АТ-богатых участков. В каждом из них расплавлено 4–6 пар. Центры этих участков находятся в положениях «-10»

и «-35». Принципиально важным является расстояние между расплавленными участками. Оно колеблется от 16 до 19 пар нуклеотидов. Искусственное увеличение этого расстояния до 20 пар нуклеотидов или уменьшение его до 15 пар нуклеотидов приводит к тому, что РНК-полимераза не узнаёт испорченный промотор.

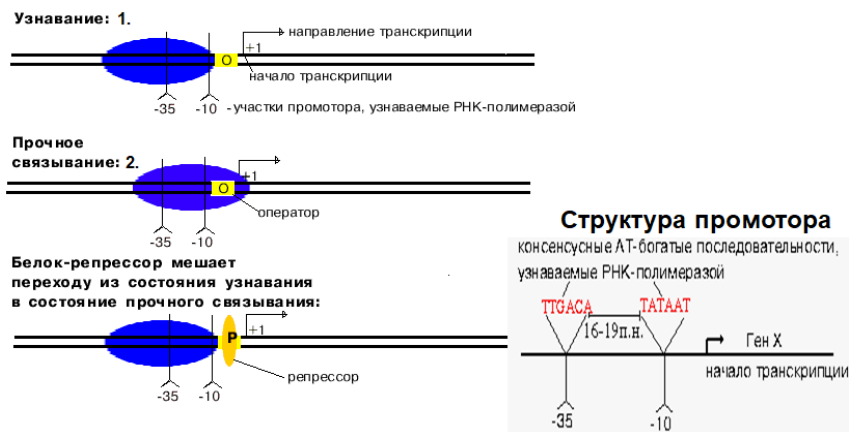


Рис. 5.7. Узнавание и прочное связывание РНК-полимеразы с промотором

Примечание: Транскрипция начинается со стартовой точки, которая служит матрицей для первого нуклеотида РНК. Матрица первого нуклеотида обозначается как +1, а соседний нуклеотид как -1. Стартовая точка обозначается стрелкой, которая показывает направление транскрипции.

Как только произошло узнавание (позиция 1), РНК-полимераза перемещается в позицию 2 (рис. 5.7). В каталитическом центре инициации транскрипции, находящемся в β -субъединице фермента, оказывается +1-ый нуклеотид оперона. Переход из позиции 1 в позицию 2 возможен, если на операторе нет белка-репрессора.

Инициация. Инициация заключается в образовании первой фосфодиэфирной связи между пуринтрифосфатом (АТФ или GTP) и следующим нуклеотидом. После инициации σ -фактор покидает фермент. Для комплементарного синтеза РНК необходим разрыв водородных связей в ДНК. Связавшись

с промотором, РНК-полимераза вызывает локальную денатурацию ДНК, то есть разделение цепей ДНК на протяжении 15 пар нуклеотидов (1,5 витка). Разрыв водородных связей очень энергоёмкий процесс. Показано, что РНК-полимераза переводит ДНК из **B**-формы в **A**-форму, в которой плоскости оснований не перпендикулярны оси спирали, а наклонены на 20°. Это облегчает «выворачивание» двух соседних азотистых оснований в цепи ДНК, для того, чтобы напротив них встали комплементарные нуклеотиды РНК.

Элонгация – последовательное наращивание цепи РНК (или продолжение транскрипции). Скорость элонгации 40–50 нукл./сек. «Мотором» транскрипции является энергия, высвобождающаяся при отщеплении пиррофосфата от каждого рибонуклеозидтрифосфата.

Терминация – окончание синтеза РНК. Терминация транскрипции бывает ρ -независимой и ρ -зависимой (ρ – ро).

При **ρ -независимой терминации** в терминаторе присутствует палиндром (рис. 5.8). В синтезируемой РНК формируется шпилька. Шпилька меняет конформацию РНК-полимеразы и фермент теряет сродство к ДНК.

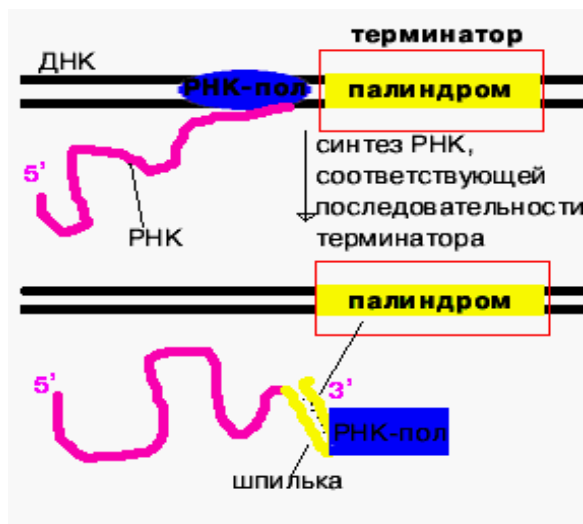


Рис. 5.8. ρ -Независимая терминация

В *ρ -зависимой терминации* участвует специфический белок – *ρ -фактор* (рис. 5.9). *ρ -Фактор* – это имеющий четвертичную структуру белок, обладающий АТФ-азной активностью. Он способен узнавать 5'-конец синтезируемой РНК длиной приблизительно 50 нуклеотидов, садиться на него и двигаться по РНК с такой же скоростью, с которой РНК-полимераза движется по ДНК. В терминаторе много G-C пар (с тремя водородными связями), вследствие чего РНК-полимераза замедляет ход, *ρ -фактор* её догоняет, изменяет конформацию фермента – и синтез РНК прекращается.

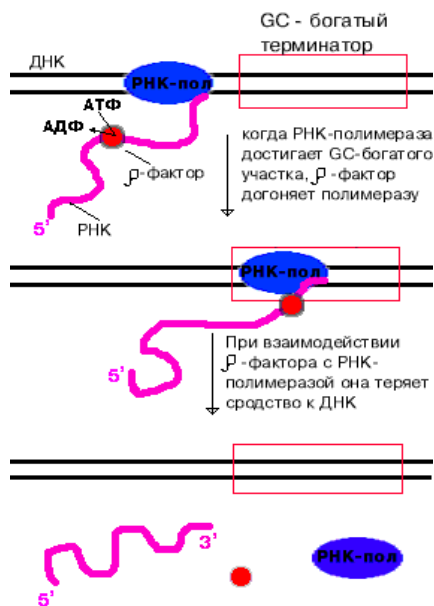


Рис. 5.9. *ρ -Зависимая терминация*

5.3. Регуляция транскрипции у прокариот

Важной особенностью регуляции транскрипции у бактерий является то, что их клетки не имеют оформленного ядра, отделённого от цитоплазмы. При этом образующаяся молекула РНК может сразу связываться с рибосомами и транслироваться с образованием белка.

Выделяют следующие схемы регуляции транскрипции у прокариот:

- 1) негативная индукция Жакобо и Моно;
- 2) позитивная индукция;
- 3) позитивная репрессия;
- 4) негативная репрессия.

1) Схема негативной индукции Жакобо и Моно – лактозный оперон (Лас-оперон) (рис. 5.10).

Эта схема называется так потому, что контролирующим транскрипцию фактором является негативный фактор, «выключатель» – **белок-репрессор**. Индукция (включение) происходит при потере сродства белка-репрессора к оператору. *Lac*-оперон *Escherichia coli* содержит 3 гена, отвечающие за образование белков, участвующих в переносе в клетку дисахарида лактозы и в её расщеплении. Z – **β -галактозидаза** (расщепляет лактозу на глюкозу и галактозу). Y – **β - галактозидпермеаза** (переносит лактозу через мембрану клетки). A – **тиогалактозидтрансацилаза** (ацетилирует галактозу).

В отсутствие в клетке лактозы *Lac*-оперон выключен. Активный белок-репрессор, кодируемый в моноцистронном опероне (*LacI*), связан с оператором *lac*-оперона. Поскольку оператор перекрывается с промотором, даже посадка РНК-полимеразы на промотор невозможна. Как только некоторое количество лактозы попадает в клетку, две молекулы субстрата (лактозы) взаимодействуют с белком-репрессором, изменяют его конформацию – и он теряет сродство к оператору. Тут же начинается транскрипция *Lac*-оперона и трансляция образующейся мРНК; три синтезируемых белка участвуют в утилизации лактозы. Когда вся лактоза переработана, очередная порция репрессора, свободного от лактозы, выключает *Lac*-оперон.

Кроме того, *Lac*-оперон у *Escherichia coli* может контролироваться двумя различными регуляторами транскрипции – и *Lac*-репрессором, и белком-активатором CAP (***Catabolite Activator Protein***).

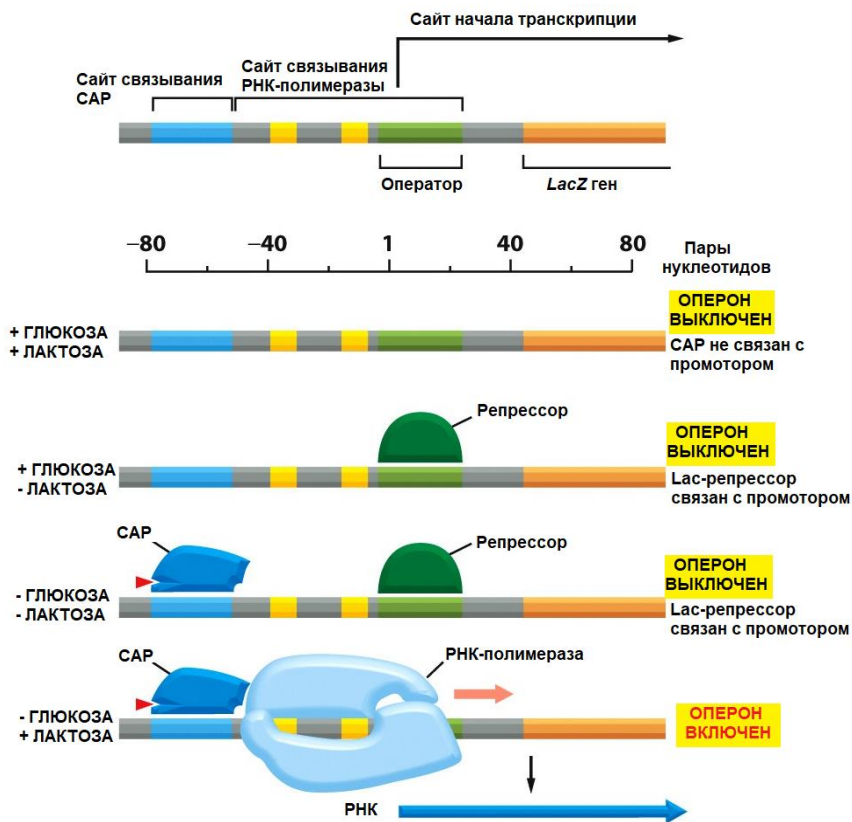


Рис. 5.10. Лактозный оперон *Escherichia coli* (по Альбертсу Б. с соавт., 2015)

Примечание: Инициация транскрипции *Lac*-оперона контролируется концентрациями глюкозы и лактозы через *Lac*-репрессор и CAP. Когда лактозы в среде нет, *Lac*-репрессор связывается с *Lac*-опероном и выключает экспрессию оперона. Добавление лактозы увеличивает концентрацию внутри клетки производного лактозы, аллолактозы. Аллолактоза связывается с *Lac*-репрессором, вызывая в нём конформационные изменения, в результате которых репрессор отсоединяется от ДНК оператора (*не показано*). Когда в среде нет глюкозы, клетка производит циклический АМР (красный треугольник), и CAP связывается с ДНК. *LacZ*, первый ген оперона, кодирует фермент β -галактозидазу, который расщепляет лактозу на галактозу и глюкозу.

2) Схема позитивной индукции – арабинозный оперон (*Ara-оперон*) *Escherichia coli* (рис. 5.11).

Эта схема регуляции называется позитивной индукцией, поскольку контролирующий элемент – **белок-активатор** «включает» работу оперона. В этом опероне 3 цистрона, которые кодируют ферменты, расщепляющие сахар арабинозу. В норме оперон закрыт. Белок-репрессор связан с оператором. Когда в клетку попадает арабиноза, она взаимодействует с белком-репрессором. Белок-репрессор меняет конформацию и превращается из репрессора в активатор, взаимодействующий с промотором и облегчающий посадку РНК-полимеразы на промотор.

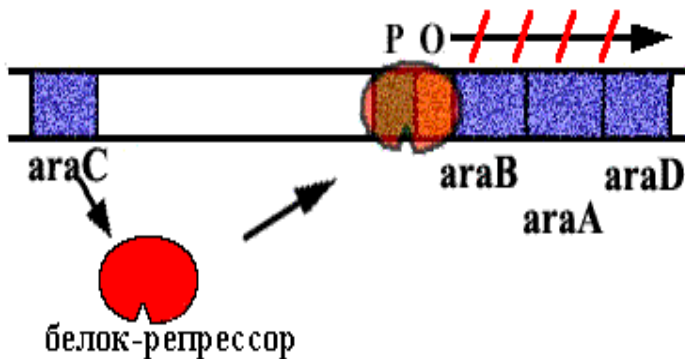


Рис. 5.11. Арабинозный оперон *Escherichia coli*

3) Схема позитивной репрессии – оперон синтеза рибофлавина у *Vacillus subtilis* (рис. 5.12).

Позитивная репрессия – в регуляции участвует белок-активатор, а сама регуляция заключается в выключении транскрипции.

В опероне располагаются цистроны ферментов синтеза рибофлавина. Есть белок-активатор, обеспечивающий посадку РНК-полимеразы на промотор. В норме оперон открыт. Образуется *N* молекул рибофлавина. *N*+1-ая молекула (лишняя) взаимодействует с активатором, и он теряет способность активировать посадку РНК-полимеразы на промотор.

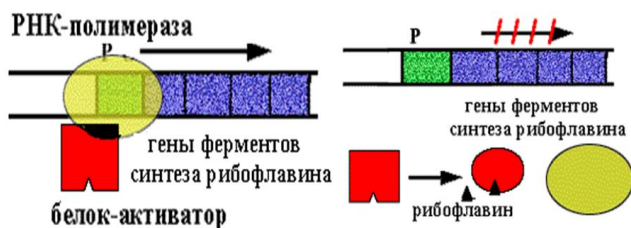


Рис. 5.12. Оперон синтеза рибофлавина у *Bacillus subtilis*

4) Схема негативной репрессии – оперон синтеза триптофана у *Escherichia coli* (рис. 5.13).

Негативная репрессия, потому что белок репрессор «выключает» оперон. В опероне имеется 5 цистронов, которые кодируют ферменты последовательной цепи реакций синтеза триптофана (рис. 5.14). В норме оперон включен. Белок-репрессор неактивен (в форме апо-репрессора), он не способен садиться на оператор. Клетке нужно N молекул триптофана. N+1-ая молекула взаимодействует с апо-репрессором. Он меняет конформацию, садится на оператор и синтез РНК прекращается.

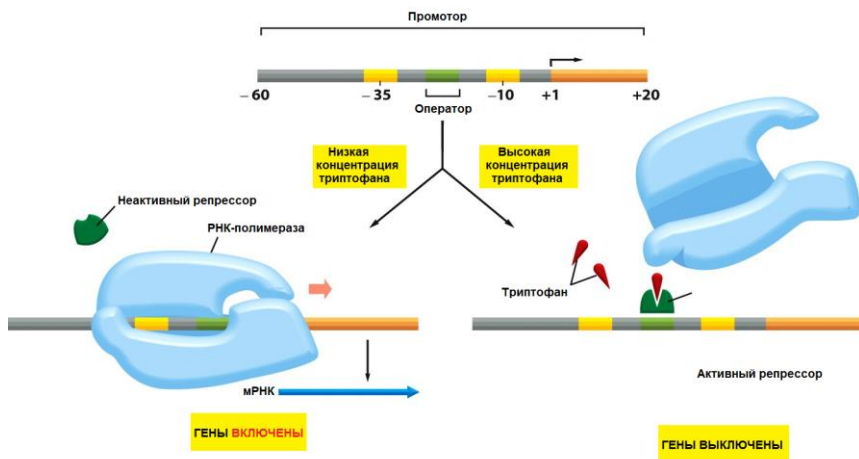


Рис. 5.13. Оперон синтеза триптофана *Escherichia coli*
(по Альбертсу Б. с соавт., 2015)

Примечание: если концентрация триптофана в клетке низкая, РНК-полимераза (голубая) связывается с промотором и транскрибирует пять

генов оперона триптофана (*слева*). Но когда концентрация триптофана высокая, белок-репрессор (*тёмно-зелёный*) активируется и связывается с оператором (*светло-зелёный*), таким образом блокируя связь РНК-полимеразы с промотором (*справа*). Если концентрация триптофана понижается, репрессор теряет связанный с ним триптофан и отсоединяется от ДНК, при этом полимеразы снова получают возможность транскрибировать оперон. Оператор содержит два важных участка последовательности ДНК, находящихся в позициях –10 и –35 нуклеотидов, выделенных жёлтым. Целиком оперон показан на рис. 5.14.

5.4. Регуляция транскрипции у эукариот

У эукариот составные части синтеза РНК те же, что и у прокариот. Однако инициация транскрипции у эукариотических клеток имеет несколько важных отличий от того, как это происходит у бактерий:

1) Первое отличие заключается в самих РНК-полимеразах. Бактерии содержат один тип РНК-полимераз, эукариотические клетки имеют три типа: РНК-полимераза I, РНК-полимераза II и РНК-полимераза III. Все они отвечают за транскрипцию разных типов генов (табл. 5.1).

2) Бактериальная РНК-полимераза (вместе со своей σ -субъединицей) способна инициировать транскрипцию самостоятельно, тогда как эукариотическая РНК-полимераза требует помощи большого числа вспомогательных белков. Наиболее важными из них являются **универсальные транскрипционные факторы**, которые для начала транскрипции должны собраться на промоторе и соединиться там с полимеразой.

Таблица 5.1. Три типа РНК-полимераз у эукариот

Тип полимеразы	Транскрибируемые гены
РНК-полимераза I	Большая часть генов рРНК
РНК-полимераза II	Белок-кодирующие гены, микроРНК, гены некоторых малых РНК (например, участвующих в сплайсинге)
РНК-полимераза III	Гены тРНК 5S рРНК Гены многих других малых РНК

3) Механизм инициации транскрипции у эукариот организован значительно сложнее, чем у прокариот. У бактерий гены уложены плотно один за другим с очень короткими участками нетранскрибируемой ДНК между ними (рис. 5.14). Но у растений и животных (включая человека) отдельные гены расположены на больших расстояниях друг от друга: между соседними генами может находиться 100 000 пар нуклеотидов. Такое строение позволяет для каждого гена иметь практически неограниченное число регуляторных последовательностей, разбросанных по ДНК (рис. 5.15). Это даёт эукариотам возможность использовать более сложные формы транскрипционной регуляции, недоступные бактериям.

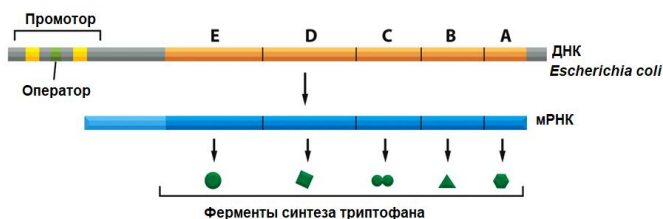


Рис. 5.14. Структура молекулы ДНК *Escherichia coli* (по Альберту Б. с соавт., 2015)

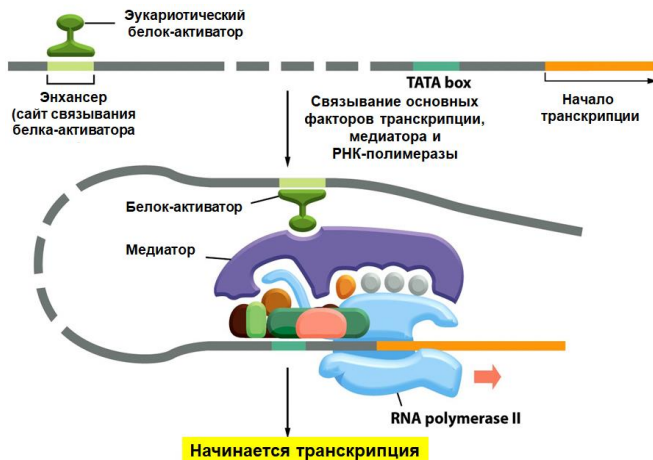


Рис. 5.15. Расположение участков, регулирующих транскрипцию у эукариот (по Альберту Б. с соавт., 2015)

4) Системе инициации транскрипции эукариот приходится иметь дело с ДНК, упакованной в нуклеосомы и другие, более компактные формы хроматина (рис. 5.16).

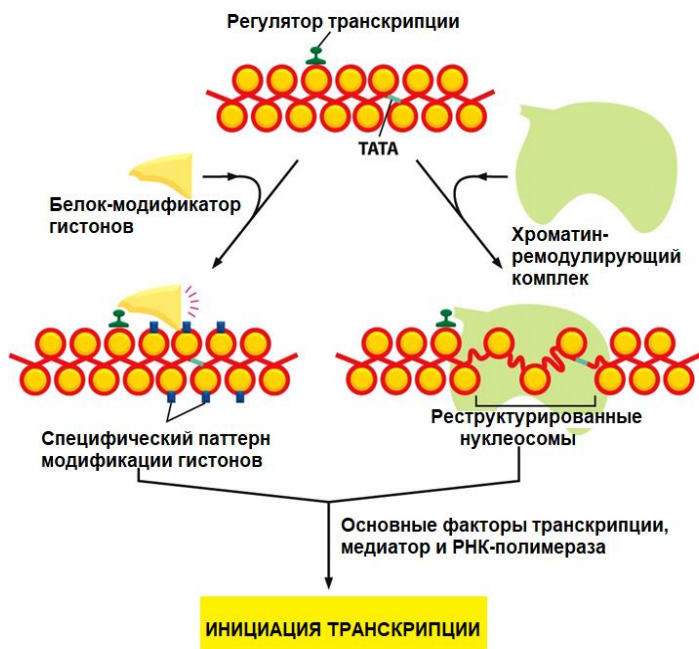


Рис. 5.16. Локальные изменения в структуре хроматина в результате действия белков-активаторов (по Альберту Б. с соавт., 2015)

Примечание: белки-активаторы могут стимулировать присоединение белков-модификаторов гистонов и белковых комплексов, вызывающих перестройку хроматина, к промотору гена. Под действием этих белков ДНК, упакованная в виде хроматина, становится более доступной для других белков клетки, включая белки, необходимые для инициации транскрипции. Кроме того, ковалентно модифицированные гистоны также могут служить сайтами связывания для белков, стимулирующих инициацию транскрипции.

Универсальные факторы транскрипции

Эти вспомогательные белки собираются на промоторном участке ДНК, ориентируют РНК-полимеразу относительно ДНК,

расплетают двойную спираль так, чтобы сделать доступной матричную цепь, и запускают работу РНК-полимеразы – начало транскрипции (табл. 5.2).

Процесс сборки начинается с того, что универсальный транскрипционный фактор ТFIID связывается с коротким участком двойной спирали ДНК, состоящим преимущественно из нуклеотидов Т и А – с **ТАТА-боксом** (рис. 5.17 Б). По мере связывания с ДНК ТFIID вызывает значительные изменения её структуры; они служат ориентиром для ассоциации других белков на промоторе. ТАТА-бокс – ключевой компонент многих промоторов РНК-полимеразы II. Он обычно расположен на расстоянии 25 нуклеотидов от сайта начала транскрипции. Как только первый транскрипционный фактор связался с промотором на ДНК, остальные факторы, а также РНК-полимераза II присоединяются к нему, образуя полный **комплекс инициации транскрипции** (рис. 5.17 В, Г).

Таблица 5.2.

Белки, необходимые для инициации транскрипции с промоторов РНК-полимеразы II у эукариот			
Белок	Кол-во субъединиц	Mr, кДа	Функции
Pol II	12	10–220	Катализирует синтез РНК
ТВР	1	38	Распознаёт ТАТА-бокс (ТАТА-связывающий белок)
ТFIIА	3	12, 19, 35	Стабилизирует связывание ТFIIВ и ТВР с промотором
ТFIIВ	1	35	Связывается с ТВР; собирает комплекс Pol II – ТFIIF
ТFIIЕ	2	34, 57	Собирает ТFIIН; обладает АТФазной и хеликазной активностями
ТFIIF	2	30, 74	Прочно связывается с Pol II; связывается с ТFIIВ
ТFIIН	12	35–89	Раскручивает ДНК у промотора (хеликазная активность); фосфорилирует Pol II; собирает белки эксцизионной репарации

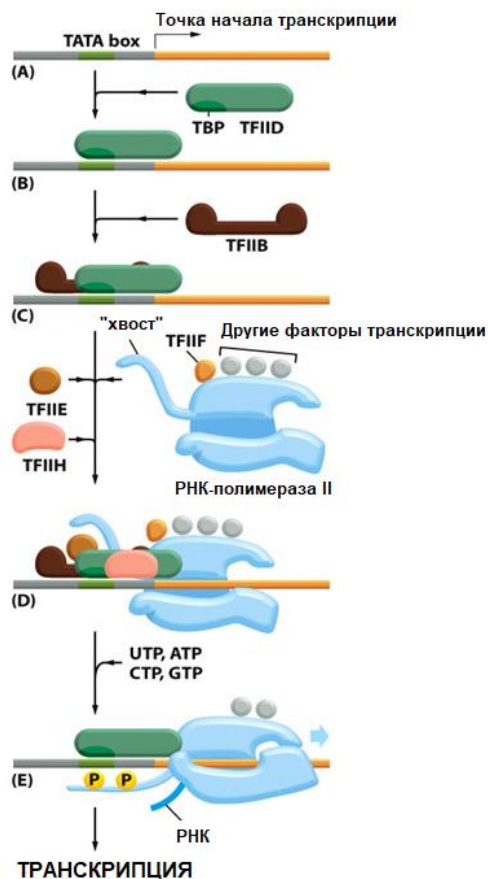


Рис. 5.17. Комплекс инициации транскрипции (по Альбертсу Б. с соавт., 2015)

Чтобы начать синтезировать молекулу РНК, РНК-полимераза II в составе комплекса инициации транскрипции должна освободиться от транскрипционных факторов. Для этого к «хвосту» РНК-полимеразы II (на С-конце самой крупной субъединицы фермента имеется длинный домен из многократно повторяющейся консенсусной последовательности семи аминокислот – Тир-Сер-Про-Тре-Сер-Про-Сер. В ферменте дрожжей содержится 27 таких повторов, а в ферменте мыши и человека – по 52 повтора) присоединяется несколько фосфатных групп (рис. 5.17 Д). Процесс осуществляется фактором TFIIH, одной

из субъединиц которого служит протеинкиназа. Фосфорилирование помогает полимеразе освободиться от транскрипционных факторов и начать транскрипцию. Сразу после запуска процесса транскрипции большая часть универсальных транскрипционных факторов уходят с ДНК и могут принять участие в инициации следующего раунда транскрипции (с другой молекулой РНК-полимеразы II). Когда РНК-полимераза II завершает транскрипцию, она также отсоединяется от молекулы ДНК, а фосфатные группы удаляются с неё фосфатазами. После этого она снова способна принимать участие в инициации транскрипции. В инициации транскрипции участвует только дефосфорилированная РНК-полимераза II.

Несмотря на то, что матричный принцип, в соответствии с которым ДНК транскрибируется в РНК, одинаков у всех организмов, судьба РНК-транскриптов у бактерий и эукариот существенно различается (Альбертс Б. с соавт., 2015). У бактерий ДНК локализована непосредственно в цитоплазме, в которой также содержатся рибосомы, осуществляющие синтез белка: они присоединяются к свободному 5'-концу транскрибированной молекулы мРНК и сразу же начинают синтез белка.

В клетках эукариот транскрипция идёт в **ядре**, где локализована ДНК, а синтез белка происходит в цитоплазме, в которой расположены рибосомы. Таким образом, перед тем как транслироваться, мРНК должна выйти в цитоплазму через поры в ядерной оболочке. Однако перед выходом из ядра эукариотическая РНК проходит несколько этапов **процессинга** (созревания).

5.5. Процессинг РНК

Образующиеся в результате транскрипции первичные РНК-транскрипты представляют собой функционально неактивные молекулы. Прежде чем стать активными они, как правило, должны претерпеть ряд модификаций, которые превращают их в зрелые РНК, пригодные к выполнению соответствующих функций – **процессинг**.

Процессинг – модификация первичного транскрипта (пре-РНК) и образование зрелых молекул РНК.

Процессинг пре-РНК эукариот происходит в ядре и в митохондриях (рис. 5.18). В зависимости от типа синтезированной РНК транскрипты процессируются по-разному. Присоединение кэпа (кэпирование) и полиаденилирование характерно, например, только для процессинга молекул РНК, которые должны стать мРНК. Эти две модификации – присоединение кэпа и полиаденилирование – выполняют следующие функции:

- 1) они увеличивают устойчивость молекулы мРНК;
- 2) способствуют экспорту мРНК из ядра в цитоплазму и позволяют распознавать РНК-молекулу в качестве мРНК;
- 3) эти модификации также узнаются системой синтеза белка для того, чтобы убедиться в целостности молекулы мРНК. Наличие обеих модификаций указывает на то, что в этой молекуле содержится полная информация о белке, и что можно приступать к его синтезу (Альбертс Б. с соавт., 2015).

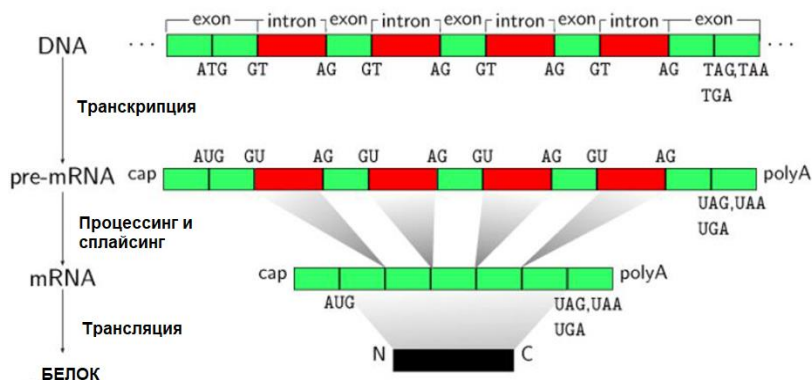


Рис. 5.18. Этапы реализации генетической информации

Кэпирование представляет собой образование на 5'-конце растущей молекулы РНК особой структуры – кэпа (шапочки), нуклеотидной последовательности, содержащей 7-метилгуанозин (рис. 5.19). Кэп соединён в 5'–5'-ориентации с первым нуклеотидом мРНК. Кэп нужен для защиты мРНК от экзонуклеаз, а также играет сигнальную роль в присоединении мРНК к рибосоме и участвует в трансляции. Кэпирование происходит после того, как длина синтезированной мРНК достигает 25 нуклеотидов,

но задолго до завершения транскрипции всего гена. Осуществляется с участием фермента **гуанозил-7-метилтрансферазы** и GTP из которого GMP переносится на 5'-дифосфат первого нуклеотида мРНК.

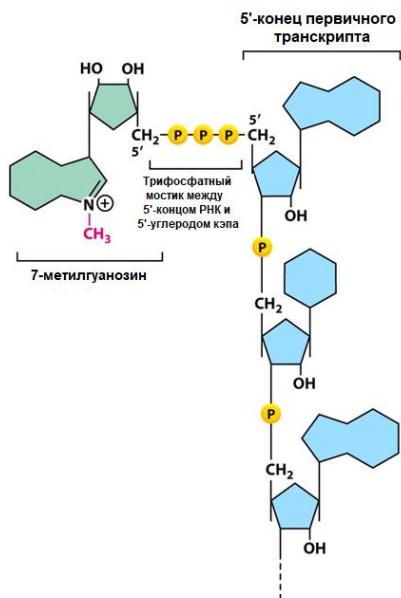


Рис. 5.19. Кэпирование 5'-конца пре-мРНК

Полиаденилирование осуществляется ферментом **поли(А)-полимеразой** и приводит к образованию на 3'-конце олиго(А)-фрагмента, содержащего 100–200 остатков адениловой кислоты и называемого также «поли(А)-хвостом» (рис. 5.20). Поли(А)-хвост определяет время жизни мРНК в клетке, способствует переносу мРНК из ядра в цитоплазму и принимает участие в трансляции. Сигналом к началу полиаденилирования является последовательность **-AAUAAA-** на растущей цепи РНК. Фермент поли-А-полимераза, проявляя экзонуклеазную активность, разрывает 3'-фосфоэфирную связь после появления в цепи РНК специфической последовательности **-AAUAAA-**. К 3'-концу в точке разрыва поли-А-полимераза наращивает поли-(А)-хвост.

Ферменты, осуществляющие полиаденилирование, избирательно связываются с РНК-полимеразой II, и в отсутствие полимеразы неактивны. Полиаденилирование защищает молекулы мРНК от быстрой деградации. Лишённые поли(А)-участка молекулы мРНК быстро разрушаются в цитоплазме клеток эукариот рибонуклеазами.

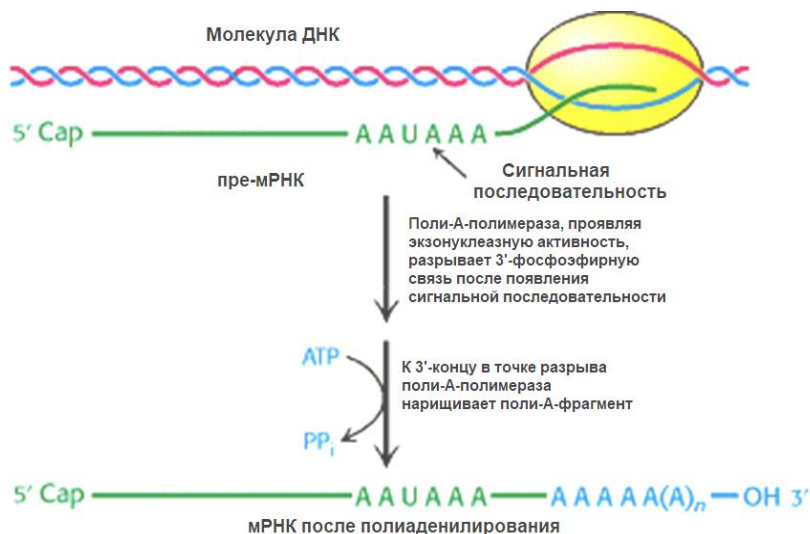


Рис. 5.20. Полиаденилирование 3'-конца пре-мРНК

У эукариот большая часть молекул РНК, перед тем, как стать функциональными, должны пройти дополнительные этапы процессинга, которые включают более существенные изменения, чем экпирование и полиаденилирование. Эти изменения возникают из-за специфических особенностей эукариотических генов (Альбертс Б. с соавт., 2015). У бактерий большая часть белков кодируется непрерывной последовательностью ДНК, которая после транскрипции в РНК, может выполнять функции мРНК без дальнейших структурных преобразований. У эукариот большая часть **кодирующих последовательностей** – **экзонов** прерывается длинными, **некодирующими участками** – **интронами** (рис. 5.21). Экзоны обычно значительно короче, чем интроны. Их суммарная длина составляет

лишь небольшую часть от общей длины гена. Длина интронов варьирует от одного до более чем 10 000 нуклеотидов. При этом одни эукариотические гены не содержат интронов, другие – имеют несколько, но большая часть содержит множество интронов (рис. 5.22).

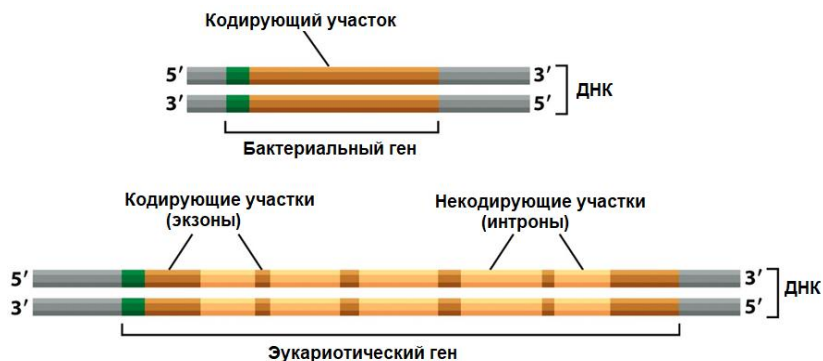


Рис. 5.21. Структура генов бактерий и эукариот (по Альберту Б. с соавт., 2015)

Примечание: зелёным обозначены промоторы генов.

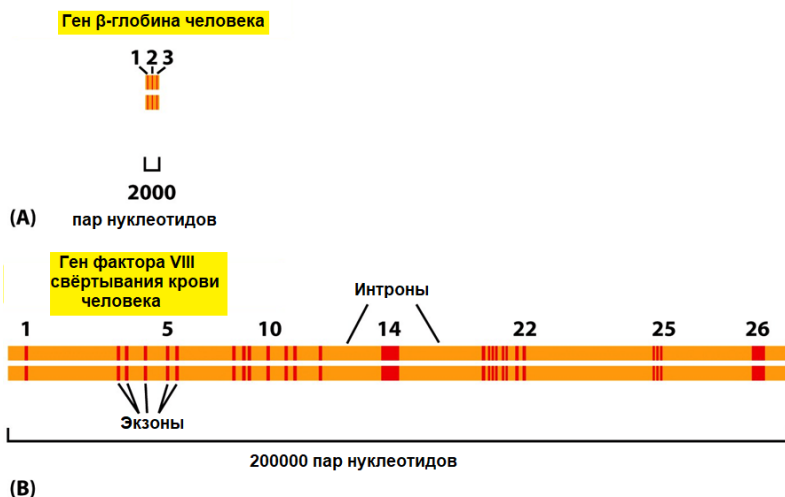


Рис. 5.22. Структура генов эукариот (по Альберту Б. с соавт., 2015)

После присоединения кэпа, но до того, как РНК-полимераза завершит процесс транскрипции, начинается **сплайсинг** РНК.

Сплайсинг состоит в вырезании из предшественников мРНК некодирующих областей – **интронов** – и сшивании кодирующих структуру белка участков – **экзонов**. Важным моментом рассматриваемого механизма является **обеспечение точности** разрезания цепи пре-РНК: ошибка даже на один нуклеотид приведёт к изменению смысла всех кодонов мРНК или антикодона тРНК. Точность достигается благодаря двум факторам:

1) сочленения экзона с интроном «помечены» консенсусными последовательностями: интроны всегда начинаются с G-U на 5'-конце, а кончаются A-G на 3'-конце (рис. 5.23);

2) для узнавания этих последовательностей используются специальные РНК – **малые ядерные РНК** (мяРНК). Они связаны с ферментами, катализирующими сплайсинг. Такие рибонуклеопротеидные комплексы называются **сплайсосомами**.

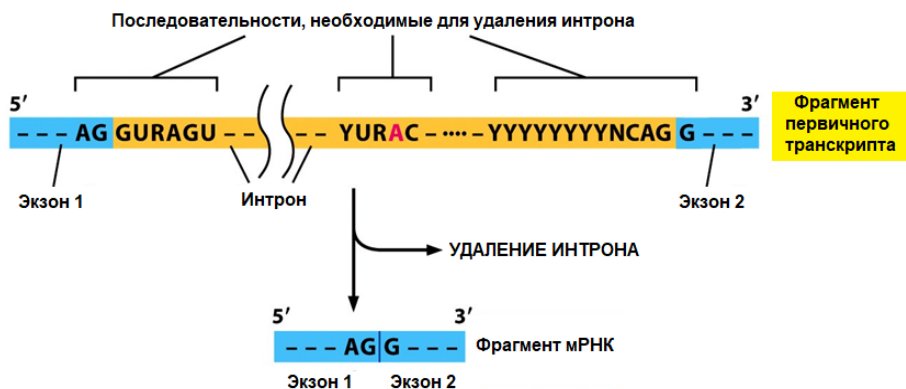


Рис. 5.23. Границы интронов и экзонов (по Альбертсу Б. с соавт., 2015)

В зависимости от специфичности механизма сплайсинга, интроны можно разделить на несколько групп:

1) тип I – интроны подвергаются автосплайсингу в присутствии только ионов Mg^{+2} и гуанозина (пре-рРНК инфузории *Tetrahymena thermophila*);

2) тип II – интроны подвергаются автосплайсингу и имеют концевые последовательности 5'-GU и AG-3' (некоторые РНК митохондрий у дрожжей);

3) тип III – интроны мРНК, имеющие концевые последовательности 5'-GU и AG-3', подвергаются сплайсингу в ядре с участием мРНК.

Сплайсинг интронов группы I

Интроны группы I находятся в разных геномах, и в настоящее время их идентифицировано свыше двух тысяч. Интроны этой группы не играют существенной роли в жизнеспособности, поскольку они находятся в генах, кодирующих рРНК в ядрах примитивных эукариот *Tetrahymena thermophila* и *Physarum polycephalum* (плесневый гриб) (Кребс Дж. с соавт., 2017).

Реакция сплайсинга у *Tetrahymena thermophila* идёт по механизму трансэтерификации с участием гуанозина и ионов магния (рис. 5.24). При этом гуанозин взаимодействует с первичным транскриптом и действует как кофактор. Для удаления интронов I не требуются дополнительных компонентов, они сами обладают ферментативной активностью, необходимой для их вырезания (**автосплайсинг**, 1982 г. Томас Чек). При реакции трансэтерификации один фосфатный эфир переводится в другой фосфатный эфир без какого-либо промежуточного гидролиза. Обмен связями происходит напрямую; вся энергия сохраняется, поэтому реакция не требует дополнительного гидролиза макроэргических связей (ни АТР, ни GTP не расходуются).

Во время сплайсинга молекула РНК принимает особую вторичную и третичную структуры, в которых функционально значимые химические группы сближены. Так формируется сайт связывания гуанилового нуклеотида; именно это связывание запускает реакции разрыва и воссоединения химических связей. Способность РНК к участию в реакциях автосплайсинга записана в самой нуклеотидной последовательности интрона. Поэтому вырезанный линейный интрон продолжает быть реакционноспособным (Кребс Дж. с соавт., 2017).

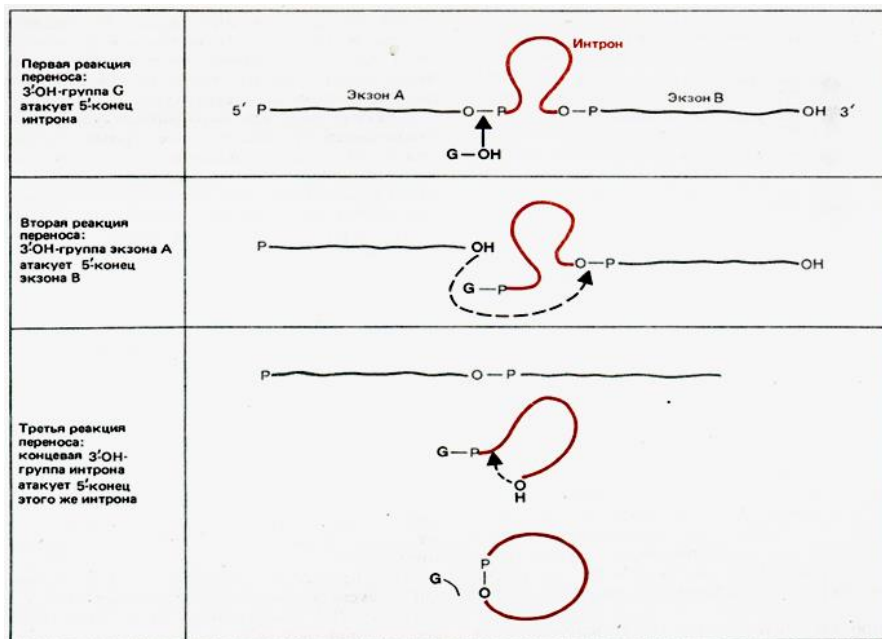


Рис. 5.24. Механизм сплайсинга интронов группы I

Сплайсинг интронов группы II

Автосплайсинг действует и при удалении интронов группы II – интроны первичных транскриптов мРНК и тРНК в митохондриях и хлоропластах. Для вырезания интронов группы II также необходимы последовательности 5'-GU и 3'-AG, две автокаталитические реакции, но гуанозин не требуется (рис. 5.25; 5.26).



Рис. 5.25. Структура интрона группы II

Примечание: показаны два экзона (красным и зелёным цветом) и один интрон. На границе экзон – интрон находятся последовательности GU – AG. Для вырезания интронов также необходим сайт ветвления – А.

Другой пример сплайсинга интронов группы II это процессинг мРНК цитохромоксидазы *b* в митохондриях дрожжей: в гене *bax*, кодирующем цитохромоксидазу *b*, имеется 2 интрона. Из первичного транскрипта автокаталитически (без участия каких-либо белков) вырезается копия большей части первого интрона. Оставшаяся РНК служит матрицей для образования фермента **мутаразы**, участвующей в сплайсинге. Часть её аминокислотной последовательности закодирована в оставшихся копиях интронов. Мутараза вырезает их, разрушая свою собственную мРНК, копии экзонов сшиваются и образуется мРНК для цитохромоксидазы *b* (рис. 5.27).

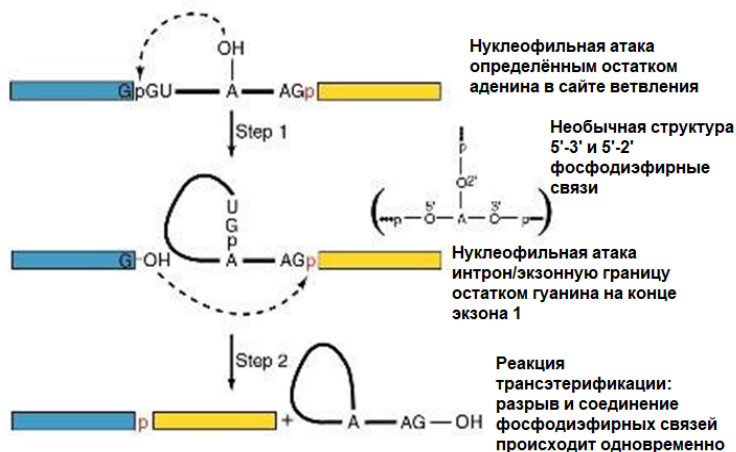


Рис. 5.26. Сплайсинг интронов группы II

Сплайсинг мРНК (интронов группы III)

Первичные транскрипты мРНК представляют собой полную копию гена. В отличие от кодирующей последовательности экзонов большая часть интронов бессмысленна. Однако у всех интронов имеется сходство в их нуклеотидной последовательности – каждый интрон содержит небольшие участки, служащие подсказкой, что его надо удалить (Альбертс Б. с соавт., 2015). Эти участки представляют собой последовательности, расположенные рядом с границами интронов (рис. 5.23).

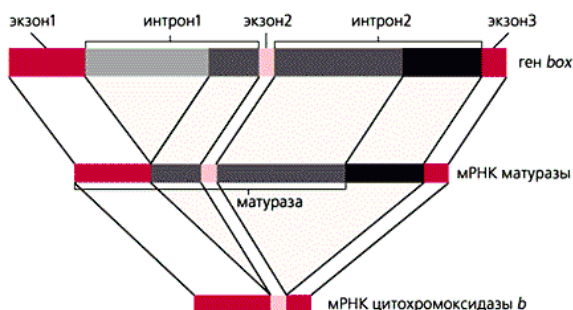


Рис. 5.27. Процессинг мРНК цитохромоксидазы *b* в митохондриях дрожжей

Примечание: на первом этапе сплайсинга образуется мРНК, по которой синтезируется мутараза, необходимая для второго этапа сплайсинга.

Сплайсинг интронов группы III начинается с взаимодействия двух малых ядерных РНК (мяРНК) с началом и концом интрона. Это определяет местоположение подлежащих удалению интронов (рис. 5.28).

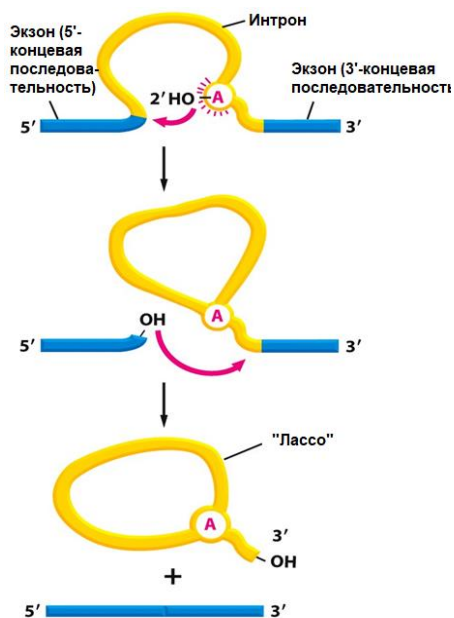


Рис. 5.28. Сплайсинг пре-мРНК

Примечание: на начальном этапе аденозин (красная А) в последовательности интрона (точка ветвления) атакует 5'-концевой участок и разрезает сахаро-фосфатный остов РНК. У интрона 5'-конец ковалентно связывается с 2'-ОН-группой рибозы в составе аденозина, формируя разветвленную структуру. Затем свободная ОН-группа на 3'-конце экзона реагирует с первым нуклеотидом следующего экзона. Таким образом два экзона соединяются в непрерывную кодирующую последовательность, а интрон высвобождается в виде структуры типа «лассо», которая в дальнейшем подвергается деградации.

Экзон-интронный тип организации генов эукариот на первый взгляд кажется очень расточительным, но он одновременно даёт и определённые преимущества (Альбертс Б. с соавт., 2015). Несколько интронов содержащихся в мРНК, могут сшиваться в разных комбинациях с образованием различных матричных последовательностей. Такая дифференциация путей созревания мРНК получила название **альтернативного сплайсинга**.

У эукариот альтернативный сплайсинг мРНК, содержащих большое количество интронов является эффективным способом регуляции активности генов, создаёт возможность для возникновения изоформ белков, наборы которых могут существенно отличаться в различных клетках, тканях и органах многоклеточных организмов. По современным данным более чем 90 % генов человека претерпевают альтернативный сплайсинг.

В формировании альтернативных мРНК задействованы три основных механизма (рис. 5.29, 5.30 и 5.31):

- Первый состоит в том, что для образования различных мРНК могут использоваться разные промоторы. В этом случае образуются транскрипты, имеющие разные по длине 5'-концы и разное количество экзонов. Такой механизм сплайсинга выявлен для пре-мРНК лёгкой цепи миозина позвоночных животных (рис. 5.29).

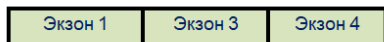
- Второй тип альтернативного сплайсинга имеет место при изменении сайта полиаденилирования первичного транскрипта. В этом случае изменяются размеры 3'-концевого участка пре-мРНК. Таким способом образуются два вида мРНК тяжёлой цепи иммуноглобулинов и проходит сплайсинг пре-мРНК гена кальцитонина (рис. 5.30).

- Третий тип сплайсинга включает выбор различных экзонов из одинаковых пре-мРНК. При этом для формирования зрелых РНК могут использоваться различные экзоны, а часть из них не включается в сплайсинг. Таким образом происходит сплайсинг пре-мРНК тропонина Т скелетных мышц млекопитающих, содержащих 18 экзонов (рис. 5.31).



1. Схема фрагмента гена, содержащего 2 промотора, 4 экзона и 3 интрона.

2. Фрагмент мРНК после сплайсинга (выбор промотора P1)



3. Фрагмент мРНК после сплайсинга (выбор промотора P2)



Направление транскрипции -



Рис. 5.29. Сплайсинг пре-мРНК путём выбора разных промоторов

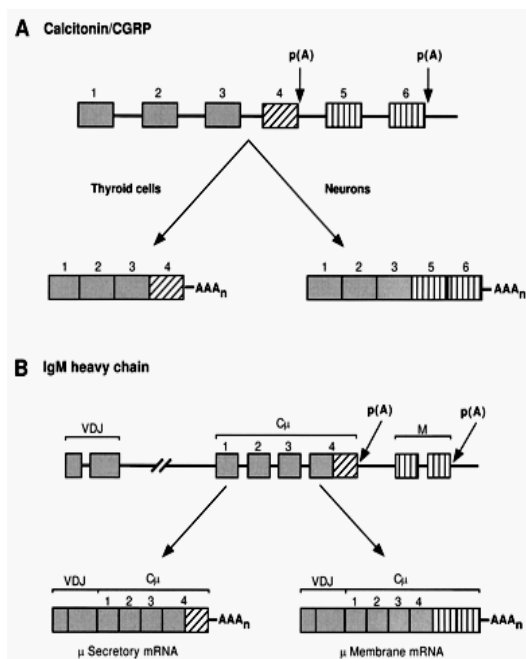


Рис. 5.30. Сплайсинг пре-мРНК кальцитонинового гена млекопитающих (крыса)

Примечание: во всех клетках есть кальцитониновый ген, но в клетках щитовидной железы он экспрессируется в виде гормона

кальцитонина, а в клетках гипофиза – нейропептида CGRP (пептида, имеющего отношение к гену кальцитонина). Ген один, а белки получаются разные в результате сплайсинга мРНК и процессинга полипептидов. В клетках других тканей этот ген не экспрессируется.

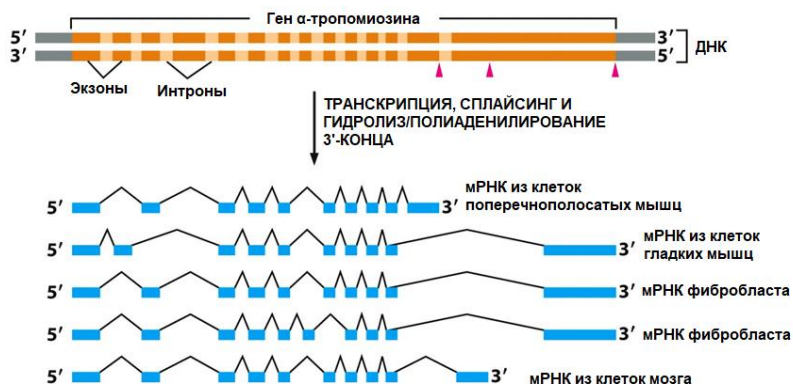


Рис. 5.31. Сплайсинг путём альтернативного выбора разных наборов экзонов

Примечание: из одинаковых пре-мРНК образуются разные функциональные мРНК. α -Тропомиозин – белок, имеющий двуспиральную структуру и регулирующий сокращение мышечных клеток. Сплайсинг первичного транскрипта гена α -тропомиозина может осуществляться несколькими альтернативными способами. Продуктом такого сплайсинга являются различные мРНК, с которых затем считываются разные формы белка. Для заданного типа клеток способ сплайсинга может быть уникальным.

Реакции процессинга осуществляются **специфическими рибонуклеазами**, способными расщеплять фосфодиэфирные связи в молекулах РНК. Рибонуклеазы, участвующие в процессинге разделяют на два класса: экзонуклеазы и эндонуклеазы.

Эндонуклеазы расщепляют связи внутри молекул РНК, что приводит к образованию более коротких фрагментов. Эти ферменты участвуют в реакциях разрезания молекул РНК, в которых нуклеотидные последовательности, соответствующие зрелой РНК, отделяются от концевых последовательностей.

Экзонуклеазы удаляют остатки нуклеотидов с 3'-конца молекулы по одному с образованием мононуклеотидов. При последовательном отщеплении нуклеотидов фермент остаётся

связанным с одной и той же РНК, и удаляет один нуклеотид за другим с целью подравнивания молекул РНК.

Помимо участия в специфических реакциях созревания рибонуклеазы осуществляют деградацию «избыточной» РНК. К таким «избыточным» молекулам относятся зрелые РНК, которые уже выполнили свои функции, а также материал, образовавшийся при разрезании предшественников.

Присоединение и модификация нуклеотидов

В процессе созревания пре-РНК теряют значительную часть нуклеотидов. Поэтому происходит не транскрипционное присоединение отдельных нуклеотидов. В случае ***пре-мРНК*** со стороны 5'-конца присоединяется ***7-метилгуаниловый нуклеотид*** – компонент кэпа. А со стороны 3'-конца наращивается ***поли(А)-фрагмент***. В случае ***пре-тРНК*** с 3'-конца по очереди присоединяются три нуклеотида – С, С и А, образующие акцепторную ветвь.

Важным моментом в созревании пре-РНК является образование в их составе ***модифицированных нуклеотидов***. Как и в случае метилирования ДНК, минорные нуклеотиды появляются в цепи РНК не на стадии полимеризации, а по завершении её. Так, в ***пре-мРНК*** происходит метилирование рибозных остатков нуклеотидов кэпа, а в ***пре-рРНК*** – метилирование рибозных остатков по всей длине полинуклеотидной цепи. В ***пре-тРНК*** процессы модификации нуклеотидов наиболее разнообразны, например, определённые остатки уридина подвергаются восстановлению с образованием дигидроуридина, другие – изомеризации, что даёт псевдоуридин, третьи – метилированию, образуя метилинозин.

Модификация нуклеотидов необходима для коррекции информационного значения кодонов мРНК, а, следовательно, и для первичной структуры кодируемых ими белков. Например, при изучении экспрессии митохондриальных генов *Trypanosoma brucei* было выявлено отклонение от одной из основных аксиом молекулярной биологии – последовательность нуклеотидов в мРНК в точности соответствует таковой в кодирующих участках

ДНК. Так, мРНК одной из субъединиц цитохромоксидазы **с** редактируется за счёт изменения её первичной структуры после транскрипции – вставляются четыре урацила. В результате этого образуется новая мРНК, служащая матрицей для синтеза дополнительной субъединицы фермента, последовательность аминокислот в которой не имеет ничего общего с последовательностью, кодируемой нередактированной мРНК (рис. 5.32).

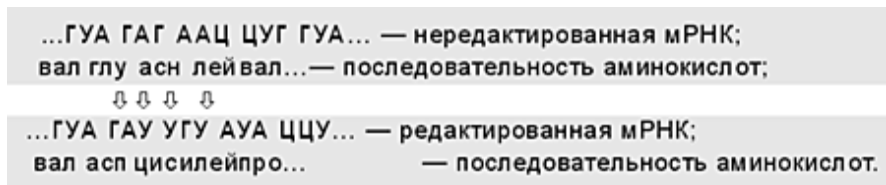


Рис. 5.32. Редактирование мРНК одной из субъединиц цитохромоксидазы с *Trypanosoma brucei*

Примечание: Глу – глутаминовая кислота, Асп – аспарагиновая кислота, Цис – цистеин, Иле – изолейцин.

Происходит это за счёт сдвига рамки считывания на число нуклеотидов, не кратное размеру триплета (в данном случае на четыре). Новая белковая субъединица, необходимая для работы фермента, образуется в митохондриях паразита только тогда, когда он попадает в организм холоднокровной мухи и нуждается в окислительном фосфорилировании для получения большого количества молекул АТФР. Если трипаносома живёт в организме теплокровных млекопитающих, ей достаточно АТР, образующейся в процессе гликолиза.

Все вышеперечисленные события приводят, в конце концов, к образованию в ядре зрелых молекул РНК (табл. 5.3). Это:

- а)** 4 вида рРНК – 28S-, 18S-, 5,8S- и 5S-РНК;
- б)** несколько десятков видов тРНК – по 1–3 для каждой из 20 аминокислот;
- в)** тысячи различных мРНК.

Зрелые РНК эукариот избирательно экспортируются из ядра (рис. 5.33). Из всей синтезированной мРНК лишь небольшая часть – зрелая мРНК – необходима клетке. Оставшаяся

часть – вырезанные интроны, повреждённая РНК и неправильно процессированные транскрипты – не только бесполезны, но могут быть опасны, если не будут уничтожены вовремя. **Как клетка отличает зрелые мРНК?**

Таблица 5.3. Типы РНК, синтезирующихся в клетках

Тип РНК	Функция
мРНК	Кодирование структуры белков
рРНК	Служат структурной основой рибосом и катализируют синтез белка
микроРНК	Регуляция экспрессии генов
тРНК	Служат адаптерами между мРНК и аминокислотами в процессе синтеза белка
другие малые РНК	Участвуют в сплайсинге РНК, поддержании теломера и многих других процессах

Транспорт мРНК из ядра в цитоплазму, где происходит синтез белка избирательный процесс – пропускаются только корректно процессированные РНК (Альбертс Б. с соавт., 2015). За избирательность транспорта РНК отвечают ядерные поры, которые узнают и переносят только зрелые молекулы мРНК. Эти поры соединяют нуклеоплазму с цитоплазмой и, служат своего рода воротами, контролирующими вход и выход макромолекул. Чтобы подготовиться к экспорту из ядра, молекулы мРНК должны связаться с соответствующим набором белков, каждый из которых сигнализирует, что мРНК процессирована верно. Эти белки включают поли-А-связывающие белки, кэп-связывающие белки и белки, сигнализирующие о завершении сплайсинга. Важно, что вся совокупность этих связанных белков определяет покинет ли молекула РНК ядро или нет. Оставшиеся в ядре «мусорные» РНК деградируют, поставая строительный материал, повторно использующийся для транскрипции.

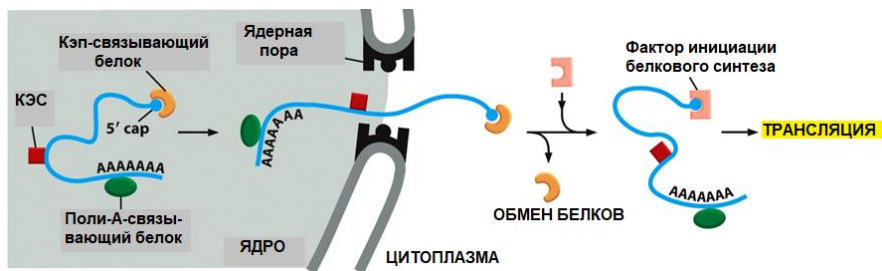


Рис. 5.33. Транспорт зрелой мРНК из ядра в цитоплазму
(по Альбертсу Б. с соавт., 2015)

Примечание: кэп и полиаденилированный хвост молекулы мРНК «метятся» белками, узнающими эти модификации. Кроме того, после успешного завершения сплайсинга с мРНК остаётся связанной группа белков, называемая комплексом экзонного соединения (КЭС). В тот момент, когда мРНК определяется как «готовая к выходу», она связывается с рецептором ядерного транспорта и выходит через ядерную пору. Попад в цитоплазму, мРНК сбрасывает связанные с ней ранее белки и присоединяет новые.

Некодирующие РНК млекопитающих – микроРНК человека (Рогаев Е. И. с соавт., 2008).

Некодирующие РНК млекопитающих выполняют множество функций. Участвуют в:

- 1) процессинге и трансляции РНК;
- 2) модификации тканеспецифичного редактирования РНК;
- 3) работе сплайсосомы, теломеразного комплекса;
- 4) компенсации дозы генов X-хромосомы;
- 5) регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции;
- 6) геномном импринтинге и других клеточных процессах.

Среди некодирующих РНК важную роль играют **микро-РНК** (мкРНК), класс регуляторных РНК длиной 19–24 нуклеотида. мкРНК образуются из более длинных предшественников – 70–100 нуклеотидов. Предшественники мкРНК имеют структуру «стебель – петля», а зрелые мкРНК образуются из первичных транскриптов путём последовательного процессинга с участием белковых комплексов (рис. 5.34) (Котельников Р. Н. с соавт., 2008).

для различных мкРНК (Lim L.P. et al., 2005). Регуляторные функции мкРНК осуществляются на нескольких уровнях:

1) некоторые мкРНК взаимодействуют с факторами транскрипции, снижая тем самым уровень определённых мРНК и белков;

2) мкРНК вовлечены в регуляцию альтернативного сплайсинга, вызывая его переключение на тканеспецифический режим.

Таким образом, регуляция экспрессии генов посредством мкРНК отличается от регуляции, осуществляемой факторами транскрипции, большей скоростью воздействия, обратимостью и возможностью локально изменять уровень мРНК-мишеней и белков в отдельных компартментах клетки. Это крайне важно, например, для обеспечения синаптической пластичности нейронов (Martin K. C. et al., 2000; Schratt G. M. et al., 2006) или при ответе клетки на воздействия окружающей среды адаптивным изменением экспрессии генов, необходимых для поддержания гомеостаза (Hobert O., 2008).

Показана тканеспецифичность образования мкРНК, а в ряде случаев мкРНК специфичны для определённых компартментов (Рогаев Е. И. с соавт., 2008). Так, miR-122 образуется в печени, miR-375 – в тканях островков поджелудочной железы, miR-1 и miR-133 – в мышечной ткани и miR-223 – в миелоидной ткани. Около половины из исследованных мкРНК синтезируются в мозге млекопитающих (Бурмистрова О. А. с соавт., 2007; Semper L.F. et al., 2004), при этом лишь некоторые из них – miR-9, miR-124 и miR-128 – специфичны для мозга (Landgraf P. et al., 2007).

Задания для внеаудиторной работы

1. Структура и функции рибонуклеиновых кислот.
2. Транскрипция и структура оперонов и транскриптонов.
3. Рибозимы. Обратная транскрипция.
4. Регуляция транскрипции у прокариот.
5. Регуляция транскрипции у эукариот.
6. Процессинг РНК – кэпирование, полиаденилирование.
7. Сплайсинг и его виды.
8. Редактирование РНК.

Основные термины и понятия

Кэпирование
Обратная транскрипция
Оператор
Оперон
Полиаденилирование
Промотор
Процессинг
Рибозимы
Рибонуклеаза
РНК-полимераза
РНК-транскрипт
Сайленсер
Сплайсинг
Сплайсосома
Терминатор
Транскриптон
Транскрипция
Цистрон
Экзонуклеазы
Эндонуклеазы
Энхансеры

Задания для аудиторной работы

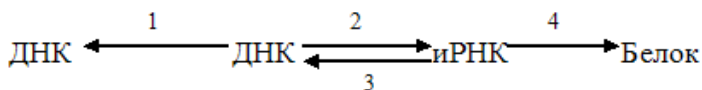
Тема: Транскрипция. Процессинг

Решите задачи.

Задача 1. Составьте таблицу «Особенности строения и функции разных видов РНК».

Задача 2. Составьте список транскрипционных факторов и дайте им молекулярно-биологическую характеристику.

Задача 3. Изучите упрощённую схему, иллюстрирующую пути передачи генетической информации, которые имеют место у тех или иных форм живой материи.



Условные обозначения:

- трансляция;
- редупликация;
- транскрипция;
- обратная транскрипция.

Задача 4. На рисунке представлена упрощенная схема строения оперона прокариот.

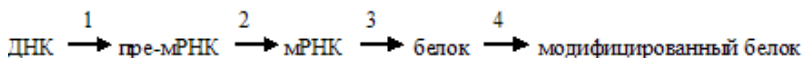
1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

Условные обозначения:

- первый структурный ген (А)
- второй структурный ген (В)
- третий структурный ген (С)
- промотор (П)
- терминатор транскрипции (tt)
- регуляторный участок после промотора (оператор) (О).

Расставьте на схеме условные обозначения вышеуказанных участков оперона прокариот.

Задача 5. Изучите упрощённую схему, иллюстрирующую последовательность основных событий при экспрессии генов.



Условные обозначения:

- трансляция;
- процессинг;
- транскрипция;
- посттрансляционные изменения белка.

Задача 6. Эукариотический ген содержит 5 экзонов, которые представляют собой последовательности, кодирующие соответствующие им участки первичной структуры белка. Первый экзон содержит 93, второй – 36, третий – 150, четвертый – 66,

а пятый – 48 нуклеотидов. Сколько аминокислотных остатков будет содержать белок, синтезированный в ходе трансляции по молекуле мРНК, которая после альтернативного сплайсинга содержит только те участки, которые соответствуют первому, второму и четвёртому экзонам этого гена?

Задача 7. Выполните «цепное» задание:

а) в процессе синтеза РНК активация промотора происходит с помощью:

- А. РНК-полимеразы
- Б. Фактора терминации
- В. ТАТА-фактора
- Г. Фактора элонгации

б) присоединение этого вещества облегчает взаимодействие промотора с:

- А. ДНК-полимеразой
- Б. РНК-полимеразой
- В. ДНК-лигазой
- Г. ДНК-хеликазой

в) активность выбранного фермента повышается при взаимодействии с:

- А. РНК-праймером
- Б. мРНК
- В. Факторами элонгации
- Г. Факторами терминации

г) взаимодействие фермента с выбранным в пункте «в» компонентом:

- А. Изменяет стабильность РНК
- Б. Устраняет интроны из первичного транскрипта
- В. Облегчает расхождение цепей ДНК-матрицы и синтез продукта
- Г. Ускоряет отделение первичного транскрипта от матрицы

д) это процесс использует в качестве источников энергии и субстратов:

- А. АТФ
- Б. ГТФ
- В. 4×НТФ
- Г. 4×ΔНТФ

е) эти нуклеотиды обеспечивают рост цепи (выберите правильные ответы):

- А. От 5'- к 3'-концу
- Б. От 3'- к 5'-концу
- В. Антипараллельно матрице
- Г. Параллельно матрице

Задача 8. Установите соответствие.

- А. Пре-тРНК
- Б. тРНК
- В. рРНК
- Г. мРНК
- Д. мяРНК

1. Содержит специфическую последовательность – ССА на 3'-конце
2. Имеет «кэп» на 5'-конце
3. Входит в состав сплайсосом

Задача 9. Фрагмент одной из цепей ДНК имеет последовательность нуклеотидов: -САТАGGGCTTAGCCG-. Определите последовательность нуклеотидов в мРНК и последовательность аминокислот в молекуле белка. Объясните, что произойдёт со структурой молекулы белка, если в четвёртом триплете цепи ДНК произойдёт удвоение первого нуклеотида.

Задача 10. Все виды РНК синтезируются на ДНК-матрице. Фрагмент молекулы ДНК, на котором синтезируется участок антикодоновой петли тРНК, имеет следующую последовательность нуклеотидов: 5'-ТТАGGCCATGTCTAC-3'. Установите нуклеотидную последовательность участка молекулы тРНК, который синтезируется на данном фрагменте ДНК, и аминокислоту, которую будет переносить эта тРНК в процессе биосинтеза белка, если третий триплет соответствует антикодону тРНК. Ответ поясните. Для выполнения задания используйте таблицу генетического кода.

Глава 6

Трансляция. Фолдинг белков

В каждый момент времени клетке требуются тысячи разных белков. Они должны синтезироваться в соответствии с потребностями клетки, доставляться к месту локализации и разрушаться, если в них больше нет нужды.

У эукариот в синтезе белка участвуют более 70 различных рибосомных белков, 20 или более ферментов для активации аминокислот, 10 или более вспомогательных ферментов и других белковых факторов для инициации, элонгации и терминирования синтеза полипептидов, около 100 дополнительных ферментов для заключительного процессинга белков и 40 или более типов транспортных и рибосомных РНК. В целом в синтезе полипептидов задействовано почти 300 различных макромолекул.

На синтез белка может расходоваться до 90 % химической энергии, затрачиваемой клеткой на все реакции биосинтеза.

Трансляция очень сложный процесс, но он происходит исключительно быстро – полипептид из 100 аминокислотных остатков синтезируется в клетке *Escherichia coli* (при 37°C) примерно за 5 секунд.

Синтез тысяч различных белков в клетке регулируется таким образом, что их количество точно соответствует текущему метаболическому состоянию.

6.1. Генетический код

Современные представления о биосинтезе белка основаны на трёх больших научных открытиях:

1. В начале 1950-х гг. Пол Замечник с сотрудниками выяснили, где в клетке происходит синтез белков – на рибосомах (рис. 6.1.)

2. Малон Хогланд и Пол Замечник в своих экспериментах обнаружили, что аминокислоты «активировались» при инкубации с АТФ и цитозольной фракцией клеток печени. Аминокислоты оказывались прикреплёнными к термостабильной

растворимой РНК определённого типа; в результате образовывались молекулы **аминоацил-тРНК**. Ферменты, которые катализируют этот процесс, называются **аминоацил-тРНК-синтетазы**.



Пол Замечник, 1912–2009

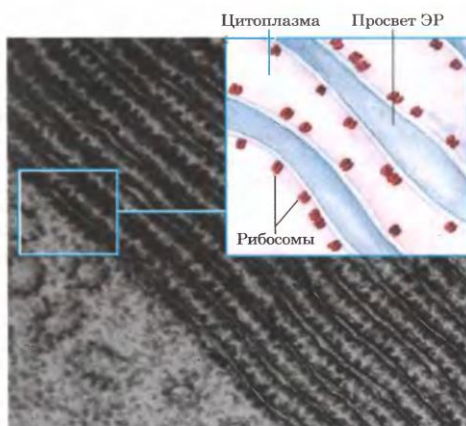


Рис. 6.1. Место синтеза белков (по Нельсон Д., Коке М., 2012)

3. Исследования Френсиса Крика. Он поставил важный вопрос: **каким образом генетическая информация, закодированная в четырёхбуквенном языке нуклеиновых кислот, может переводиться на 20-буквенный язык белков?**

Роль адаптера могли бы выполнять небольшие молекулы нуклеиновой кислоты (возможно РНК) – одна часть адаптерной молекулы связывается со специфической аминокислотой, другая часть распознаёт нуклеотидную последовательность, кодирующую данную аминокислоту в составе мРНК. Оказалось, что **адаптерная молекула это тРНК** (открыта и описана Робертом Холли).

4. Маршалл Ниренберг, Генрих Маттеи, Филипп Ледер, Гобинд Корана – результаты многочисленных экспериментов этих учёных позволили установить природу 61 из 64 возможных кодонов (рис. 6.2). Оставшиеся три кодона оказались стоп-кодонами – они прерывают синтез белка. Рамка считывания устанавливается на первом этапе трансляции мРНК и сохраняется на всём протяжении процесса при переходе от одного

триплета к следующему. Несколько кодонов выполняют особые функции. Инициаторный кодон AUG – самый распространённый сигнал начала синтеза полипептида во всех клетках, а внутри последовательности он же кодирует метионин. Стоп-кодоны UAA, UAG и UGA (нонсенс-кодоны) – дают сигнал окончания синтеза полипептида и не кодируют никаких аминокислот.

Биосинтез белков (трансляция) отличается от других типов матричного биосинтеза – репликации и транскрипции тем, что между матрицей и продуктом нет комплементарного соответствия.

Поскольку матрица построена из 4 нуклеотидов, а продукт, полипептидная цепь, – из 20 аминокислот, существует определённый закон шифрования аминокислот в нуклеотидной последовательности матрицы, то есть **генетический код**.

К 1960-м гг. стало очевидно, что для кодирования каждой аминокислоты необходимы по меньшей мере три нуклеотидных остатка в ДНК.



Рис. 6.2. Маршал Ниренберг (1927–2010) и Х. Гобинд Корана (1922–2011)

Генетический код – это способ записи информации об аминокислотной последовательности белков с помощью последовательности нуклеотидов в ДНК или РНК.

Свойства генетического кода (рис. 6.3):

1. Триплетность – кодовое число равно 3. Три нуклеотидных остатка (триплет) кодируют одну аминокислоту. Терминирующие триплеты – UAA, UAG и UGA не кодируют аминокислоты и являются сигналами к прекращению синтеза белка.

2. Специфичность – каждый триплет кодирует только одну аминокислоту.

3. Вырожденность – одну аминокислоту могут кодировать несколько (от 2 до 6) триплетов.

4. Универсальность – у всех видов организмов биологический код одинаков.

5. Коллинеарность – последовательность кодонов в зрелой мРНК соответствует последовательности аминокислот в синтезированном белке.

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Рис. 6.3. Генетический код

Для пунктуации генетической информации во время её трансляции имеют значение 5 кодонов. Кодоны AUG и GUG – иницирующие. Они определяют правильное начало синтеза генного продукта при трансляции мРНК. Эти кодоны располагаются на границе последовательностей мРНК списываемых с регуляторной и структурной частей гена. Они указывают точку от которой начинается синтез полипептидной цепи, поскольку регуляторная часть гена не транслируется. Если эти кодоны располагаются в структурной части гена, они теряют своё иницирующее значение и направляют включение метионина или валина, соответственно. Помимо двух иницирующих кодонов генетический код содержит три терминирующих или нонсенс (бессмысленных) кодона (UAA, UAG, UGA), определяющих окончание синтеза полипептидной цепи.

Код внутри кодонов! С 1960-х годов в генетическом коде выявили целый ряд закономерностей, смысл которых можно понять если рассматривать генетический код как продукт биосинтеза, то есть продукт клеток, способных синтезировать собственные «строительные блоки» из водорода и углекислого газа (Лейн Н., 2013).

С каждой буквой триплетного кода (*особенно с первой!*) связан биохимический процесс превращения несложного вещества-предшественника в аминокислоты. В клетках современных организмов аминокислоты синтезируются посредством целого ряда биохимических реакций, начинающихся с нескольких несложных веществ-предшественников. Между первой буквой триплетного кодона и этими несложными предшественниками существует определённая связь. Например, если первая буква кодона – С, то кодируемая им аминокислота будет производным α -кетоглутарата, если А – то оксалоацетата, если U – то пирувата. Со второй буквой триплета связана степень растворимости (или нерастворимости) аминокислоты в воде, то есть гидрофильности (или гидрофобности). Все аминокислоты можно распределить по своего рода спектру, начиная от «очень гидрофобных» до «очень гидрофильных». Именно этот спектр имеет связь со второй буквой триплетного кода. Пяти из шести самых гидрофобных аминокислот соответствуют кодоны с буквой U в середине, а всем самым гидрофильным – кодоны с буквой А в середине. Промежуточным аминокислотам спектра соответствуют кодоны с буквой G или C в середине. Последняя буква в триплете приводит к вырожденности кода: восьми аминокислотам свойственна четырёхкратная вырожденность. Третья буква кода не несёт никакой информации. Независимо от того, какое азотистое основание стоит на этом месте, во всех четырёх случаях триплет кодирует одну и ту же аминокислоту. Например, в триплете GGG, кодирующем глицин, можно заменить последнюю G на U, A или C – и все три новых триплета будут по-прежнему кодировать глицин.

6.2. Строение рибосом

Местом синтеза белка являются рибосомы, состоящие на 50–60 % из рРНК и на 35–50 % из белка. Рибосомы располагаются на мембранах эндоплазматического ретикулума, который пронизывает цитоплазму всей клетки.

Каждая рибосома полностью прочитывает одну молекулу мРНК и в соответствии с её программой синтезирует одну молекулу белка. В процессе работы рибосома потребляет энергию гидролиза гуанозинтрифосфата (GTP).

Полные рибосомные частицы и их субъединицы принято обозначать в соответствии с их коэффициентами седиментации (скоростями осаждения) в ультрацентрифуге, выражаемыми в единицах Сведберга (S).

Выделяют четыре класса рибосом:

1. Прокариотические 70S (бактерии).
2. Эукариотические 80S (животные, растения и грибы).
3. Рибосомы митохондрий (55S – у животных, 75S – у грибов).
4. Рибосомы хлоропластов (70S у высших растений).

Рибосома всегда состоит из двух субъединиц: большой 60S и малой 40S (рис. 6.4). Основу структуры каждой субъединицы составляет сложным образом свёрнутая рРНК. В большой субъединице это 28S рРНК (4700–4800 нуклеотидов), а в малой 18S (около 1900 нуклеотидов). Кроме того, каждая субъединица состоит из нескольких десятков рибосомных белков, которые держатся как на каркасе на рРНК. Помимо высокомолекулярной рРНК большая рибосомная субъединица содержит одну или две молекулы низкомолекулярных рРНК – это 5S рРНК и 5,8S рРНК. Кроме того, в составе рибосом обнаружены ионы магния и кальция.

Функции рРНК:

1. Составляют каркас субъединиц рибосом.
2. Принимают непосредственное участие в синтезе полипептидов: 28S рРНК входит в каталитический пептидилтрансферазный центр, 18S рРНК необходима для установки на малой

субъединице иницирующего кодона мРНК, 5S рРНК – для правильной ориентации аминоксил-тРНК на рибосоме.

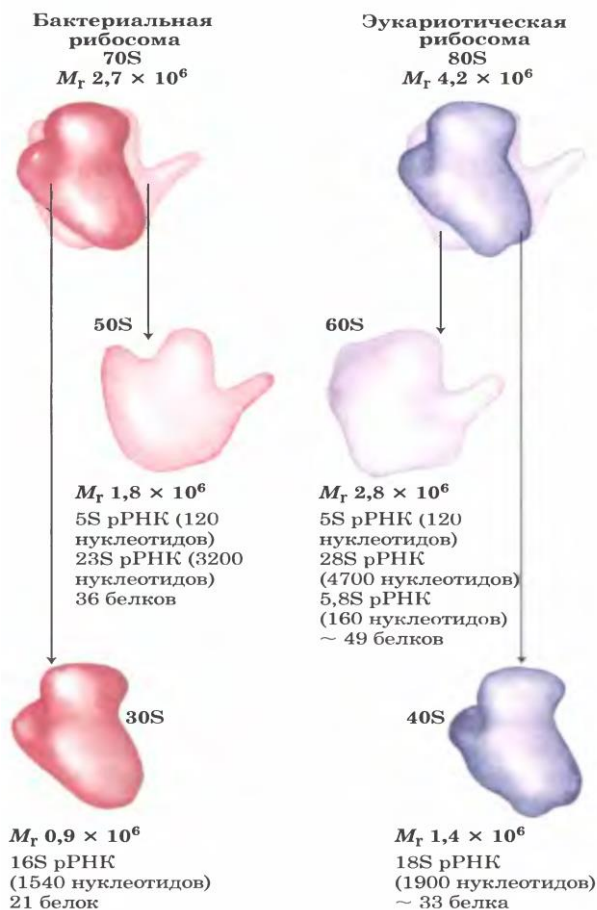


Рис. 6.4. Структура бактериальных и эукариотических рибосом
(по Нельсон Д., Коке М., 2015)

6.3. Трансляция

Для биосинтеза (трансляции) белка необходимы следующие компоненты:

Необходимые компоненты	Функции
Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
тРНК	тРНК выполняют функцию адаптеров. Они акцепторным концом взаимодействуют с аминокислотами, а антикодоном с кодоном мРНК
Аминоацил-тРНК-синтетазы	Каждая аминоацил-тРНК-синтетаза катализирует реакцию специфического связывания одной из 20 аминокислот с соответствующей тРНК
мРНК	Матрица содержит линейную последовательность кодонов, определяющих первичную структуру белков
Рибосомы	Рибонуклеопротеиновые субклеточные структуры, являющиеся местом синтеза белков
АТФ, GTP	Источники энергии
Белковые факторы инициации, элонгации и терминации	Специфические вне ribосомные белки, необходимые для процесса трансляции (12 факторов инициации – eIF; элонгации – EF1, EF2; терминации – RF1, RF2, RF3)
Ионы магния	Кофактор, стабилизирующий структуру рибосом

Большая часть аминокислот находится в цитоплазме клеток не в свободном состоянии, а в виде **аминоацил-тРНК**. Это предохраняет аминокислоты от метаболических превращений и способствует сохранению набора аминокислот для синтеза белка. Образованию комплекса аминокислота-тРНК предшествует активация аминокислоты и нахождение соответствующей тРНК (рекогниция). **Рекогниция** происходит с участием фермента **аминоацил-тРНК-синтетазы**. Эти ферменты имеют два активных центра, один из которых соответствует определённой тРНК, а другой строго специфичен соответствующей аминокислоте. Таким образом, в клетке должно быть не менее 20 аминоацил-тРНК-синтетаз, хотя фактически их несколько больше.

Каждый из этих ферментов катализирует реакцию активации только одной из 20 аминокислот. Реакции взаимодействия аминокислот с тРНК нуждаются в энергии (рис. 6.5).

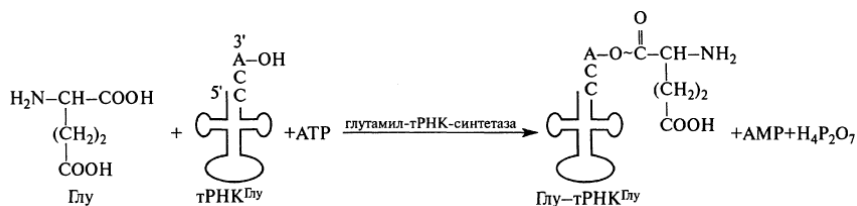


Рис. 6.5. Реакция активации аминокислоты

Весь процесс биосинтеза белка можно разделить на три стадии – инициация, элонгация и терминация.

I. Инициация начинается с образования иницирующего комплекса. В этом процессе участвуют рибосомы, мРНК, аминоацил-тРНК, белковые факторы инициации (IF1, IF2 и IF3) и GTP (рис. 6.6).

Поступившая из ядра в цитоплазму мРНК соединяется с малой субъединицей рибосомы и иницирующей аминоацил-тРНК, роль которой у эукариот при синтезе любого белка выполняет **метионин-тРНК^{Met}** (Met-тРНК^{Met}). В мРНК обнаружен специальный иницирующий кодон AUG, с которым и взаимодействует Met-тРНК^{Met}. Затем к этому комплексу присоединяется большая субъединица рибосомы. При ассоциации малой и большой рибосомных субъединиц происходит образование **пептидильного** (Р-центр) и **аминоацильного** (А-центр) центров трансляции. Met-тРНК^{Met} взаимодействует с иницирующим кодоном мРНК в пептидильном центре большой субъединицы рибосомы. Аминоацильный центр остаётся свободным.

Кроме того, в образовании иницирующего комплекса участвуют белковые факторы инициации, которые доставляют Met-тРНК^{Met} к формирующемуся комплексу. После образования комплекса они вновь переходят в цитоплазму. Энергию необходимую для образования иницирующего комплекса предоставляет GTP.

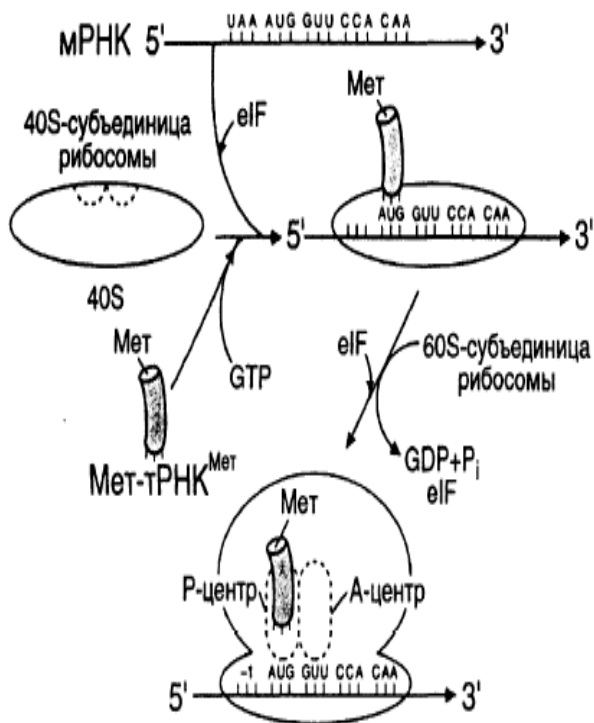


Рис. 6.6. Стадия инициации трансляции у эукариот

Бактериальные рибосомы имеют три сайта связывания аминокислот-тРНК – **аминоацильный (А)**, **пептидилный (Р)**, а также **сайт выхода (Е)** (рис. 6.7). С сайтами А и Р связываются молекулы аминокислот-тРНК, тогда как с сайтом Е связывается исключительно ненагруженная тРНК. Сайты А и Р образованы обеими субъединицами рибосомы (30S и 50S), а сайт Е локализован в основном в 50S субъединице.

II. Элонгация представляет собой образование и удлинение полипептидной цепи, формирующейся на рибосоме. Этап элонгации включает три последовательные стадии (рис. 6.8).

1) Связывание *aa*-тРНК в А-центре. В рибосому, у которой в Р-центре находится $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$, в А-центр присоединяется первая *aa*-тРНК. Выбор *aa*-тРНК определяется строением

кодона мРНК, поскольку между кодоном мРНК и антикодомом тРНК возникает комплементарное взаимодействие. Связывание аа-тРНК с мРНК происходит с использованием энергии ГТФ и при участии фактора элонгации EF1.

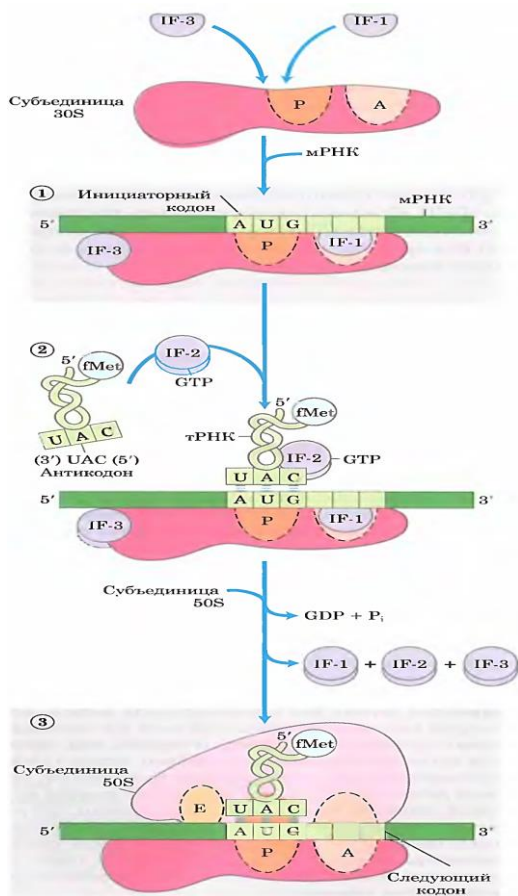


Рис. 6.7. Стадия инициации трансляции у прокариот
(по Нельсон Д., Коке М., 2015)

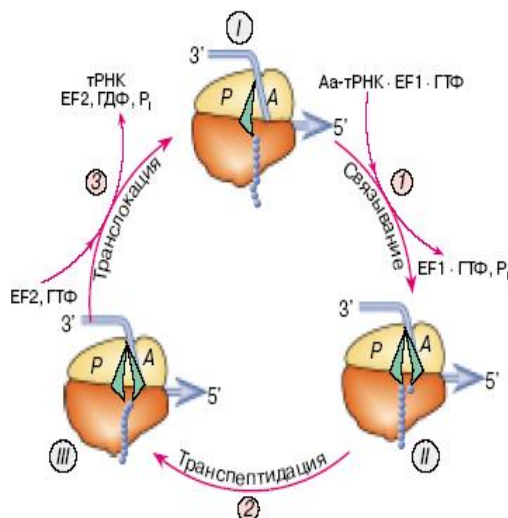


Рис. 6.8. Три реакции стадии элонгации трансляции (по Спирину А. С., 1999)

2) Образование пептидной связи. Первая пептидная связь возникает за счёт реакции транспептидации, в ходе которой метионин от инициаторной тРНК переносится на аминокгруппу аа-тРНК в А-центре с образованием дипептида, связанного с тРНК. Катализирует пептидилтрансферазную реакцию рРНК большой субъединицы рибосомы (28S рРНК). В результате в А-центре находится дипептидил-тРНК, а в Р-центре – свободная тРНК^{Met}.

3) Транслокация. В ходе этой стадии за счёт энергии GTP и при участии фактора элонгации EF2 рибосома перемещается на один кодон в направлении от 5'- к 3'-концу мРНК. В результате дипептидил-тРНК из А-центра попадает в Р-центр, а в А-центре оказывается следующий кодон. тРНК^{Met} покидает рибосому. Далее процесс продолжается по описанной схеме, повторяя стадии: 1 → 2 → 3.

Скорость элонгации значительна: синтез пептида из 100 аминокислот занимает примерно 2 мин.

III. Терминация биосинтеза (трансляции) белка. Терминация представляет собой завершение синтеза полипептидной

цепи и освобождение её от рибосомы. Сигналами, определяющими окончание синтеза, являются стоп-кодоны на мРНК, для которых не существует тРНК: это триплеты – UAG, UUA и UGA. В области этих триплетов при участии вне ribосомных белков – факторов терминации – происходит гидролитическое расщепление связи между пептидом и последней тРНК, и освобождается готовый белок, «пустая» рибосома легко диссоциирует на субъединицы.

6.4. Фолдинг белков

Функционально активные белки образуются в результате *посттрансляционных модификаций* полипептидных цепей, синтезированных на рибосомах. Эти модификации включают:

- 1) Частичный протеолиз.
- 2) Модификации аминокислот – карбоксилирование, фосфорилирование, йодирование, гидроксिलирование, ацилирование и гликозилирование.
- 3) Формирование пространственной структуры, или *фолдинг*, в котором принимают участие белки-шапероны, обеспечивающие правильную укладку полипептидной цепи.
- 4) Образование дисульфидных связей между остатками цистеина, участвующими в формировании трёхмерной структуры белка.
- 5) Присоединение простетических групп.
- 6) Образование олигомерных структур, которое также осуществляется при участии шаперонов.

Фолдинг – это процесс сворачивания пептидной цепи в правильную трёхмерную структуру. Если белок состоит из нескольких субъединиц, то фолдинг включает и объединение последних в единую макромолекулу. Для фолдинга необходимы специальные белки – *шапероны* и *ферменты фолдазы*. Они не определяют то, какой должна быть пространственная конфигурация белка, но создают возможность для быстрого её формирования.

Выделяют две модели сворачивания белков.

Модель промежуточных состояний (рис. 6.9).

Фолдинг белка совершается не одномоментно, а в несколько стадий.

1. Исходная форма глобулярного белка (непосредственный продукт трансляции) – случайный клубок, или развёрнутая пептидная цепь. Характеризуется отсутствием вторичной и третичной структуры.

2. Состояние – предшественник расплавленной глобулы. Вначале формируется вторичная структура – различные участки пептидной цепи образуют α -спирали, β -структуры или остаются бесструктурными. По завершению этого процесса происходит сжимание клубка в так называемую расплавленную глобулу. Движущей силой сжатия является взаимодействие между радикалами аминокислот. Причём с помощью радикалов фактически взаимодействуют отдельные элементы вторичной структуры. Однако в этой глобуле радикалы аминокислот ещё не нашли своих окончательных партнёров, не заняли «правильного» положения, взаимодействуют «с кем придётся». Поэтому общее количество одновременно существующих связей относительно не велико и связи, а с ними, и конфигурация молекулы являются неустойчивыми.

3. Нативный белок – формируется термодинамически наиболее оптимальная структура, при которой между радикалами образуется максимально возможное количество связей. В случае достаточно больших белков вначале формируется третичная структура доменов, а затем последние занимают правильное положение друг относительно друга. Позже всего происходит связывание мономеров в олигомеры (если нативный белок состоит из нескольких субъединиц).

Модель сворачивания белков по принципу «всё или ничего».

У очень маленьких белков (до 100 аминокислотных остатков) промежуточные стадии (расплавленная глобула и состояние – предшественник) отсутствуют, и фолдинг проходит по принципу «всё ли ничего». Из-за малого числа аминокислотных остатков «неправильные» взаимодействия, лежащие в основе расплавленной глобулы, практически не случаются.

Поэтому нет сжатия клубка до образования нативной третичной структуры. В этих случаях фолдинг проходит следующим образом. Развёрнутая пептидная цепь в течение достаточно длительного времени существует без образования контактов между аминокислотными остатками, так как способные к взаимодействию остатки не сближаются друг с другом. Затем случайно цепь достигает состояния, в котором может образоваться несколько «правильных», или нативных контактов. Тем самым как бы появляется ядро сворачивания (ядро нуклеации). После этого фолдинг завершается очень быстро. Наличие нескольких «правильных» связей удерживает цепь в такой конфигурации, в которой легко находят друг друга «правильные» пары. Например, белок химотрипсиновый ингибитор-2 (белок CI2) включает 65 аминокислотных остатка, во вторичной структуре имеет одну α -спираль и 5 тяжёлых β -структур ($\beta 1 \dots \beta 5$). Критическим моментом фолдинга этого белка является:

1) образование α -спирали и тяжёлых $\beta 4, \beta 5$;

2) гидрофобное взаимодействие трёх аминокислотных остатков в составе этих элементов – Ала16 (α -спираль), Лей49 ($\beta 4$) и Иле59 ($\beta 5$). Они участвуют в образовании ядра нуклеации.

В обеих моделях фолдинга важную роль играет феномен **кооперативности** – образование одной или нескольких «правильных» связей резко ускоряет замыкание других нативных связей.

А. С. Спирин выдвинул гипотезу о ко-трансляционном сворачивании белков. Согласно этой гипотезе фолдинг полипептидной цепи происходит по мере её роста на рибосоме в направлении от N- к C-концу.

Доказательства ко-трансляционного сворачивания белков.

1) Фермент – протеиндисульфидизомераза (ПДИ), катализирующий перемещение в новосинтезированных белках дисульфидных связей должна присутствовать во время трансляции (необходима для правильного замыкания дисульфидных связей). Показано на примере одной из цепей иммуноглобулина.

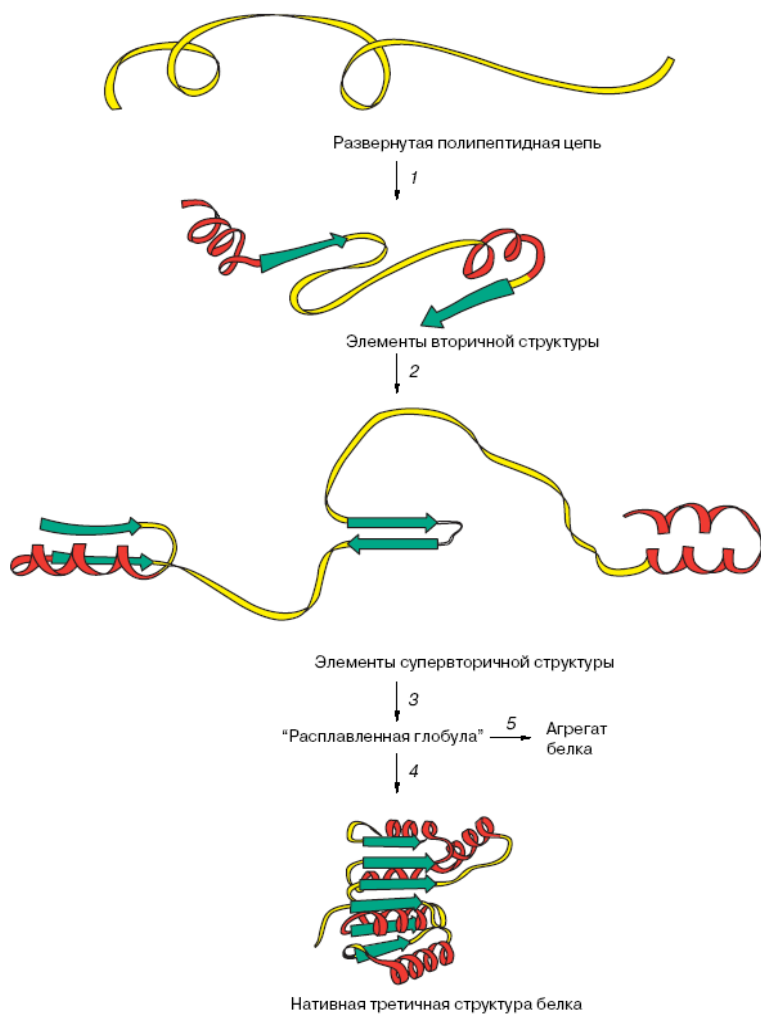


Рис. 6.9. Модель промежуточных состояний (по Наградовой Н. К., 1996)

2) При синтезе белковых субъединиц гемоглобина они приобретают способность связывать гем ещё до окончания трансляции – по достижении примерно $\frac{2}{3}$ своей полной длины. Следовательно, гем-связывающий центр формируется во время трансляции.

3) Фермент светлячков люцифераза оказывается активным сразу после образования на рибосоме. Следовательно, и в этом случае фолдинг произошёл во время трансляции.

Факторы фолдинга

Выделяют 2 группы факторов фолдинга:

- 1) белки с каталитической активностью – ферменты фолдинга или **фолдазы**,
- 2) молекулярные шапероны.

Ферменты фолдинга

Протеиндисульфидизомераза (ПДИ) – катализирует перемещение в белках дисульфидных связей, то есть под её влиянием в сворачиваемом белке разрываются одни и вместо них замыкаются другие дисульфидные связи (рис. 6.10). Если образовалась ошибочная S–S-связь, то в силу своей ковалентной природы она не может быть разорвана спонтанно, и поэтому полипептид будет зафиксирован в неправильной конфигурации. Разрушая и вновь образуя S–S-связи между различными остатками цистеина, ПДИ способствует коррекции фолдинга. Лабелизация дисульфидных связей в формирующемся белке даёт ему возможность найти (путём случайного перебора) такую комбинацию этих связей, которой соответствует энергетически наиболее оптимальная пространственная структура. Необходимость в ПДИ при фолдинге того или иного белка связана не с размером этого белка, а с количеством в нём S–S-мостиков.

В клетке ПДИ связана, в основном с эндоплазматическим ретикулумом и участвует в фолдинге белков, которые синтезируются мембраносвязанными рибосомами (например, мембранные белки, лизосомные белки).

Пептидилпролилизомераза (ППИ). Среди 20 аминокислот, встречающихся в белке, есть пролин, а также продукт его гидроксирования – **гидроксипролин**, которые являются иминокислотой (их радикал связан не только с C α атомом,

но и с азотом). Вместе, где располагается пролин в пептидной цепи не образуются ни α -спирали, ни β -структуры, и пептидная цепь образует изгиб. Причём возможность изгиба определяется транс- и цис-конфигурацией радикала соседней аминокислоты и радикала пролина (рис. 6.11). Фермент ППИ катализирует переход радикалов в области пептидной связи пролина из транс- в цис-конфигурацию и обратно. При этом происходит временный разрыв данной пептидной связи, отчего становится возможным поворот вокруг её плоскости. После поворота связь снова замыкается.

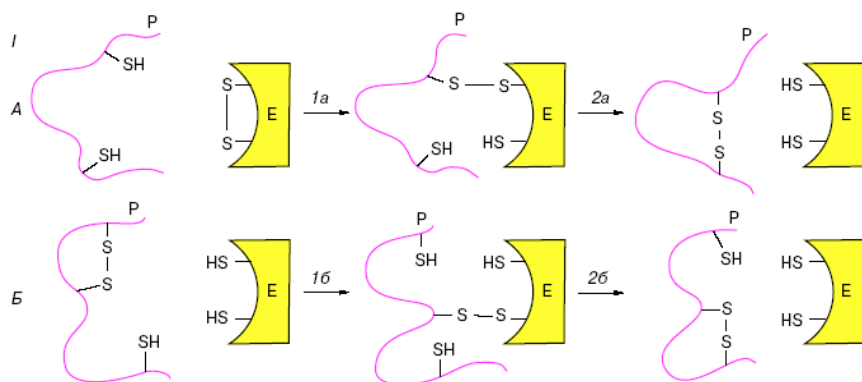


Рис. 6.10. Работа фермента протеиндисульфидизомеразы
(по Наградовой Н. К., 1996)

Примечание: **А.** Схема действия протеиндисульфидизомеразы. **Р** – Сворачивающийся белок, **Е** – протеиндисульфидизомераза. **А** – Окисление SH-групп белка дисульфидной группой активного центра фермента: **1а** – образование смешанного дисульфида, **2а** – образование дисульфидного мостика в молекуле белка и восстановленной формы фермента. **Б** – Изомеризация дисульфидной группы в молекуле белка: **1б** – образование смешанного дисульфида, **2б** – образование нового дисульфидного мостика в молекуле белка.

Таким образом, благодаря ППИ пептидная связь получает возможность делать в области остатка пролина такие изгибы, которые приводят к наиболее оптимальной пространственной структуре.

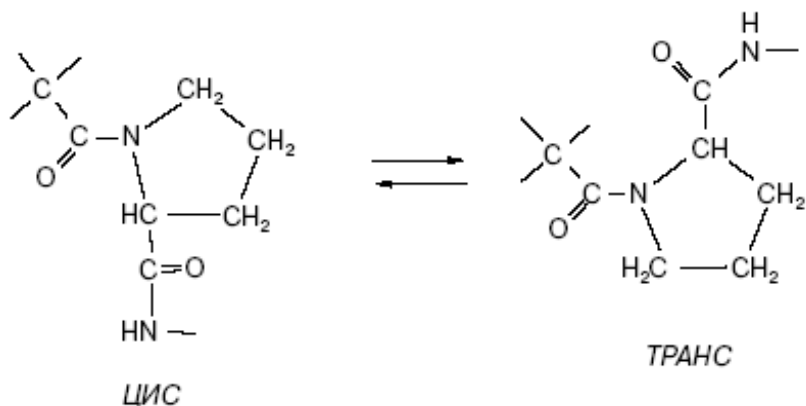


Рис. 6.11. Транс- и цис-конфигурация радикала пролина и радикала соседней аминокислоты

Молекулярные шапероны

Шапероны (HSP) выполняют разнообразные функции.

1) Обеспечение правильного фолдинга новообразованных белков: **а)** предупреждают агрегацию новых белков, то есть «неправильные» внешние взаимодействия в ходе фолдинга; **б)** предупреждают «неправильные» внутренние взаимодействия в пределах одной пептидной цепи; **в)** лабильзация слабых «неправильных» связей.

2) Контроль за рефолдингом. При стрессе некоторые белки клетки могут денатурировать. Такие белки могут подвергаться рефолдингу (ренатурировать) при активной помощи шаперонов.

3) Внутриклеточный транспорт белков. Так в лизосомы транспортируются белки, отслужившие свой срок, а в митохондрии новосинтезированные белки.

4) Поддержание ряда белков в определённой конформации – в состоянии как бы незавершённого фолдинга. Например, локализующийся в цитоплазме белковый рецептор к глюкокортикоидным гормонам (ГКГ) – в отсутствие ГКГ рецептор связан с комплексом шаперонов. В таком состоянии у рецептора закрыта (экранирована) так называемая **ядерная**

метка – та часть пептидной цепи, которая необходима для проникновения белка внутрь ядра. После связывания ГКГ с рецептором белки HSP диссоциируют, фолдинг завершается, и ядерная метка оказывается на поверхности. Поэтому рецептор проникает в ядро, переходит в димерную форму и связывается с определённым участком ДНК.

В последнее время показано, что у шаперонов имеются белковые помощники – ко-шапероны, молекулярная масса которых в несколько раз меньше. Взаимодействующие шаперон и ко-шаперон образуют единую систему. Например, в активный комплекс с HSP70 (молекулярная масса 70 kDa) входят следующие белки ко-шапероны HSP40 и HSP10. Ко-шаперон HSP40 (молекулярная масса 40 kDa, в *E. coli* – DnaJ) взаимодействуя с HSP70 способствует эффективным процессам фолдинга и рефолдинга и участвует в регуляции активности HSP70. Ко-шаперон HSP10 необходим для проявления шаперонной активности комплекса Hsp70-Hsp40 (DnaK-DnaJ), в *E. coli*, – GrpE – «nucleotide exchange factor» (молекулярная масса – 10 кДа) (рис. 6.12).

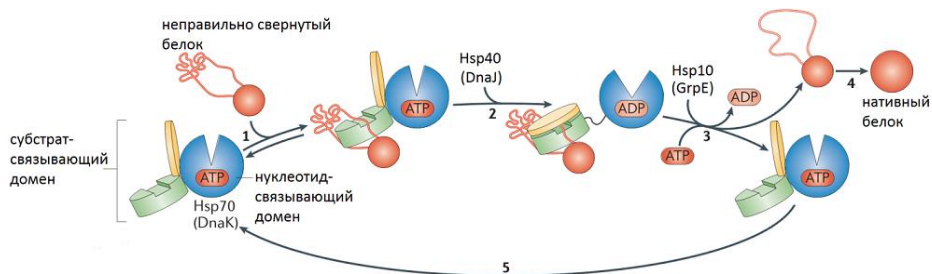


Рис. 6.12. Механизм действия шаперонов HSP70 при рефолдинге белков
(по Doyle S. et al., 2013)

Примечание: **1.** HSP70 (DnaK в *E. Coli*), связывающий ATP, слабо взаимодействует с неправильно свёрнутым белком; **2.** Ко-шаперон HSP40 (DnaJ, содержащий J-домен) стимулирует HSP70 к гидролизу ATP, что запускает конформационные изменения и стабилизирует связывание с неправильно свёрнутым белком; **3.** HSP10 (GrpE, «Nucleotide Exchange Factor») стимулирует нуклеотидный обмен HSP70 – HSP70 взаимодействует с ATP, приобретая низкую связывающую

активность; **4.** Высвобождение белка в нативной конформации;
5. Если рефолдинг белка произошёл не до конца, он снова связывается с HSP70 и цикл рефолдинга повторяется.

Задания для внеаудиторной работы

1. Аминокислоты – мономерные звенья белков. Заполните таблицу «Свойства аминокислот»:

№	Аминокислота	Английское обозначение	Физиологическая роль
1.	Аланин		
2.	Аргинин		
3.	Аспарагиновая кислота		
4.	Аспарагин		
5.	Гистидин		
6.	Глицин		
7.	Глутаминовая кислота		
8.	Глутамин		
9.	Валин		
10.	Изолейцин		
11.	Лейцин		
12.	Лизин		
13.	Метионин		
14.	Пролин		
15.	Серин		
16.	Тирозин		
17.	Треонин		
18.	Триптофан		
19.	Фенилаланин		
20.	Цистеин		

2. Пространственная структура белков.

3. Функции белков.

4. Характеристика генетического кода.

5. Структура рибосом.

6. Синтез полипептидов на рибосоме (Трансляция). Составьте таблицу, в которой сравните процессы трансляции у про- и эукариот.

7. Фолдинг белков. Характеристика моделей и факторов фолдинга.

8. Рефолдинг. Механизмы рефолдинга в клетке.

Основные термины и понятия

Аминоацил-тРНК-синтетазы

Аминокислоты

Белки

Белки теплового шока

Генетический код

Домен

Ко-шапероны

Пептиды

Протеомика

Рамка считывания

Рефолдинг

Рибосома

Трансляция

Фолдазы

Фолдинг

Шапероны

Задания для аудиторной работы

Тема: Трансляция

Решите задачи.

Задача 1. Что такое генетический код? Дайте его характеристику.

Задача 2. Что называется геномом?

Задача 3. Что такое кодон и антикодон?

Задача 4. Какую длину имеет участок молекулы ДНК, в которой закодирована первичная структура рибонуклеазы, если молекула этого фермента содержит 124 аминокислотных остатка, а один нуклеотид занимает 0,34 нм в цепи ДНК? Сколько молекул тРНК будет участвовать в переносе этого количества аминокислот к месту синтеза? Ответ поясните.

Задача 5. Фрагмент цепи мРНК имеет следующую последовательность нуклеотидов: 5'-AACUCGUUAGCGUUAUAG-3'. Определите последовательность нуклеотидов на участке молекулы ДНК, антикодоны соответствующих тРНК и аминокислотную

последовательность соответствующего фрагмента молекулы полипептида, используя таблицу генетического кода.

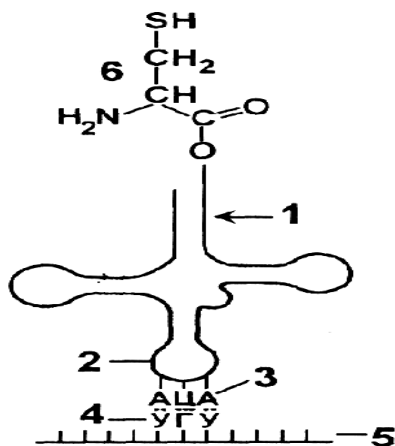
Задача 6. Последовательность нуклеотидов в цепи ДНК:



В результате мутации одновременно выпадают пятый нуклеотид и четвёртый триплет нуклеотидов. Запишите новую последовательность в цепи ДНК. Определите по ней последовательность нуклеотидов в мРНК и последовательность аминокислот в молекуле белка. Для выполнения задания используйте таблицу генетического кода.

Задача 7. Напишите любую последовательность нуклеотидов РНК, которая кодирует участок полипептидной цепи, имеющий следующую последовательность аминокислотных остатков: **NH₂-аланин-лизин-лизин-фенилаланин-серин-тирозин-метионин-пролин-СООН**. Обозначьте начальный и концевой участки последовательности этой мРНК.

Задача 8. Изучите рисунок.



Назовите процесс, один из этапов которого изображён на рисунке. Укажите химические соединения и их участки, изображённые на рисунке: – мРНК; – тРНК; – триплет, кодирующий аминокислоту; – антикодон; – остаток аминокислоты; – петля с антикодоном; – участок, содержащий последовательность ЦЦА. Обозначьте начальный и концевой участки молекул мРНК и тРНК. Назовите аминокислоту, остаток которой изображен на рисунке.

Задача 9. Какие аминокислоты могут переносить к рибосомам транспортные РНК со следующими антикодонами: AUG, AAA, GUC, GCU, CGA, CUC, UAA, UUC?

Задача 10. Фрагмент молекулы адренокортикотропного гормона (АКТГ) человека, вырабатываемого передней долей гипофиза, имеет структуру – **-Сер-Тир-Сер-Мет-**. Определите перечень антикодонов в тРНК, участвующих в биосинтезе фрагмента АКТГ.

Задача 11. Белок состоит из 250 аминокислотных остатка. Определите, во сколько раз молекулярная масса участка гена, кодирующего этот полипептид, превышает молекулярную массу белка (средняя масса молекулы аминокислоты – 110, а нуклеотида – 300). Ответ поясните.

Задача 12. Сколько нуклеотидов содержит ген (обе цепи ДНК), в котором закодирован белок, состоящий из 330 аминокислотных остатка? Какую он имеет длину (расстояние между нуклеотидами в ДНК составляет 0,34 нм)? Какое время понадобится для синтеза этого белка, если скорость передвижения рибосомы по мРНК составляет 6 триплетов в секунду?

Задача 13. Сколько витков имеет участок двойной спирали ДНК, контролирующей синтез белка с молекулярной массой 3300, если молекулярная масса одной аминокислоты составляет 110, а на один виток спирали приходится 10 нуклеотидов? Ответ поясните.

Глава 7

Межмолекулярные взаимодействия и их роль в функционировании живых систем

Для нормального функционирования многоклеточного организма необходима взаимосвязь между отдельными клетками, тканями и органами. Эту взаимосвязь осуществляют:

- **нервная система** (центральная и периферическая) через нервные импульсы и нейромедиаторы;
- **эндокринная система** через эндокринные железы и гормоны, которые синтезируются специализированными клетками этих желёз, выделяются в кровь и транспортируются к различным органам и тканям;
- **паракринная и аутокринная системы** посредством различных соединений, которые секретируются в межклеточное пространство и взаимодействуют с рецепторами либо близлежащих клеток, либо той же клетки (простагландины, гормоны желудочно-кишечного тракта, гистамин и др.);
- **иммунная система** через специфические белки (цитокины, антитела).

7.1. Сигнальные молекулы

Сигнальные молекулы – это вещества, способные контролировать и регулировать различные стороны клеточного метаболизма.

Выделяют следующие типы сигнальных молекул:

- **Гормоны** – регуляторы, образуемые эндокринными клетками и попадающие к клеткам-мишеням через кровь.
- **Нейромедиаторы** – соединения, передающие сигнал в синапсах от пресинаптического окончания к постсинаптической мембране.
- **Гистогормоны** (цитокины и факторы роста) – регуляторы, выделяемые неэндокринными клетками во внесосудистое пространство и обладающие поэтому местным действием.

Восприятие клетками сигнальных молекул или внешних сигналов в основном происходит благодаря взаимодействию

этих факторов с определёнными рецепторами, расположенными на поверхностной мембране клеток (рис.7.1). Эти рецепторы распознают приходящие сигналы и приводят в действие внутриклеточные пути передачи информации, ведущие к запуску и регуляции различных клеточных процессов.

Показано, что клетки животных могут передавать сигналы разными способами (рис. 7.1). Важнейшие различия между этими способами – **скорость** и **избирательность**, с которой сигнал передаётся клеткам-мишеням.

На рис. 7.2 показан принцип работы контактной сигнализации, с помощью которой происходит контроль дифференцировки нервных клеток у плодовой мушки *D. melanogaster*. Нервная системы мухи развивается в ходе эмбриогенеза из пласта эпителиальных клеток. Некоторые клетки этого пласта превращаются в нейроны, в то время как их соседи остаются эпителиальными и поддерживают целостность пласта. Сигналы, контролирующие этот процесс, передаются при прямых межклеточных контактах: каждый будущий нейрон передаёт окружающим клеткам сигнал, подавляющий их превращение в нейроны. Как сигнальная молекула Delta, так и её рецептор Notch относятся к трансмембранным белкам.

Гормоны (по Мушкабарову Н. Н., Кузнецову С. А., 2007).

Все гормонпродуцирующие структуры делятся на 4 типа (табл. 7.1):

1. Центральные эндокринные органы – гипоталамус, гипофиз и эпифиз.

2. Периферические эндокринные железы – щитовидная, паращитовидные, надпочечники (содержащие, по существу, две железы в виде коркового и мозгового вещества).

3. Органы, объединяющие эндокринные и неэндокринные функции – поджелудочная железа, почки, тимус, гонады, плацента, сердце.

4. Одиночные гормонпродуцирующие клетки (составляют диффузную эндокринную систему) – эндокринные клетки в разных отделах нервной, пищеварительной и дыхательной систем.

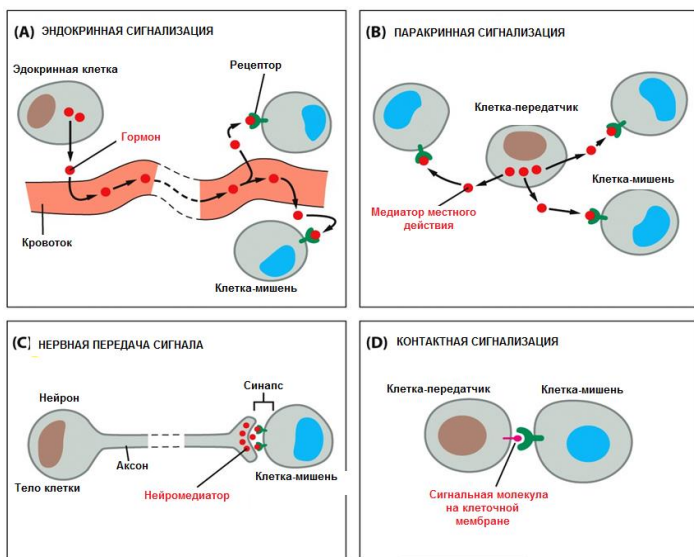


Рис. 7.1. Способы передачи сигнала в животных клетках
(по Альбертсу Б. и др., 2015)

Примечание: *D* – не требует секреции сигнальных молекул. Клетки вступают в прямой физический контакт, при котором взаимодействуют сигнальные молекулы, закреплённые на плазмалемме клетки-передатчика, и белки-рецепторы на мембране клетки-мишени.

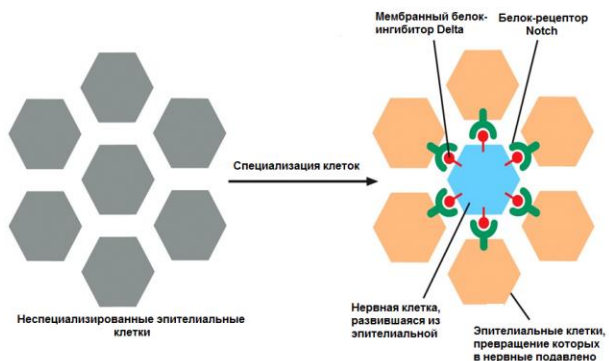


Рис. 7.2. Образование нервных клеток из неспециализированных эпителиальных клеток у *D. Melanogaster* (по Альбертсу Б. и др., 2015)

Таблица 7.1. Гормоны

Гормоны гипоталамуса

	Гормоны		Химическая природа	Действие
	Либерины: тиролиберин, гонадолиберин, кортиколиберин, соматоталиберин	Статины: соматостатин, меланостатин		
Аденогипофизо- тропные гормоны			Пептиды (тиролиберин – трипептид, гонадолиберин – декапеп- тид и т. д.)	А) Попадая в аденогипофиз стимулируют (ли- берины) или тормозят (статины) выработку соответствующих гормо- нов Б) Оказывают влияние на эмоции, поведение, соматические функции
Нейрогормоны (попадают в кровь через заднюю долю гипофиза)		ААГ, или вазопрессин	Циклические нонапептиды (содержат по 9 аминокислотных остатков)	А) Усиливает реабсорбцию воды в каналах почек и Б) Вызывает сокращение гладких миоцитов в сосудах сердца и лёгких
		Окситоцин		Стимулирует сокращение: миометрия, миоэпи- тимальных клапок молочных желёз, миоцитов семявыносящих путей

Гормоны гипофиза

Передняя доля гипофиза: тонадотропные гормоны		Гормоны	Химическая природа	Действие
Передняя доля гипофиза: тонадотропные гормоны		ФСГ (фолликуластимулирующий гормон)	Белки с молекулярной массой ~30 кДа, содержат α и β -субъединицы	Стимулирует: А) в яичниках – рост фолликулов Б) в семенниках – рост семенных канальцев и сперматогенез
		ЛГ или ИКСГ (лютеинизирующий или интерстициальные клетки стимулирующий гормон)		Стимулирует: А) в яичниках – окончательное созревание одного из фолликулов и секрецию эстрогенов Б) в семенниках – секрецию тестостерона
		ЛТГ (лактотропный или лютетотропный гормон, пролактин)	Белок с молекулярной массой 23,5 кДа	Стимулирует: А) выработку прогестерона жёлтым телом яичника Б) секрецию молочных желёз
		ТТГ (тиреотропный гормон)	Белок с молекулярной массой 28,3 кДа	Стимулирует образование и секрецию гормонов щитовидной железы
		АКТГ (адренокортикотропный гормон)	Пептид, состоящий из 39 аминокислотных остатка	Стимулирует образование гормонов в двух зонах коры надпочечников: А) в пучковой зоне – глюкокортикоидов Б) в сетчатой зоне – андрогенов
Передняя доля гипофиза: нетонадотропные гормоны		СТГ (соматотропный гормон)	Белок с молекулярной массой 21 кДа	Стимулирует рост тела (или его частей) за счёт усиления: А) синтеза белков Б) распада жиров

Промежуточная доля типифиза (её гормоны, видимо, вначале образуются в нейронах ЦНС в виде единого полипептидного предшественника. Причём при его последующем расщеплении на фрагменты высвобождаются не только меланоцитостимулирующий гормон (МСГ) и липотропин, но и несколько эндорфинов – пептидов с морфиноподобным действием.	МСГ	Полипептид; 2 формы: α – 13 а. к. о. β – 22 а. к. о.	Стимулирует в меланоцитах образование меланина (но не вызывает образование новых меланоцитов)
	Липотропин	Полипептид	Стимулирует освобождение жирных кислот из депо

В задней доле типифиза гормоны не синтезируются: здесь лишь происходит поступление в кровь нейротормонов, образованных в гипоталамусе, АДГ и окситоцина.

Гормоны эпифиза (гипофизарной железы)

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Антигонадотропные гормоны (выделяются в темноте)	Мелатонин	Производное аминокислоты триптофан	Угнетает продукцию гонадоталиберина в гипоталамусе (отчего ночью в гипофизе тормозится выработка ФСГ, ЛГ и АТГ)
	Антигонадотропин	Пептид	Угнетает продукцию ЛГ в гипофизе
	Тиролиберин, гонадолиберин и др	Пептиды	Как и такие же гормоны гипоталамуса, стимулируют образование в аденогипофизе соответствующих гормонов
«гормоны гормонов» (в определённое время суток)	ТТГ и др.	Белки	Как и такие же гормоны гипофиза, стимулируют соответствующие периферические железы
Калитропин		Белок	Приводит к повышению содержания ионов кальция в крови

Таким образом, функция эпифиза зависит от внешней освещённости (за счёт связи со зрительным трактом), а сам эпифиз определяет (путём циклической продукции соответствующих гормонов) суточные и иные ритмы работы других эндокринных желёз, а через них – и подчинённых органов.

Гормоны гипофизарных и парагипофизарных желёз

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Щитовидная железа	Тироксин (тетрагидрокси- и его предшественники – тригидрокси- и др	Производные аминокислоты тирозина	А) Стимулируют синтез белков, в том числе тканеспецифических, что обеспечивает процессы роста и развития Б) Ускоряют процессы образования энергии в митохондриях и её расходования – вплоть до разобщения (при высоком содержании гормонов) окисления веществ и фосфорилирования (синтеза АТФ)

Щитовидная железа	Кальцитонин	Полипептид: молекулярная масса 3600 Да, 32 а. к. о.	Снижает содержание кальция в крови, уменьшая его всасывание в ЖКТ и увеличивая выведение в кости и мочу
Парашитовидные железы	Паратгормон	Белок: молекулярная масса 9500 Да, 84 а. к. о.	Повышает содержание кальция в крови, усиливая его поступление из ЖКТ, костей (за счёт резорбции костного вещества остеокластами) и первичной мочи (в почках)

Гормоны надпочечников

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Клубочковая зона коры	Минералокортикостероиды:	Стероиды (производные холестерина)	Индукция в почках синтез транспортного белка, усиливает реабсорбцию ионов Na^+ из первичной мочи (в обмен на ионы K^+ и H^+) Осуществляют приспособление к хроническому стрессу: А) стимулируют распад веществ в соединительной, лимфатической, мышечных тканях Б) стимулируют использование высвобождающихся аминокислот и глюкозы для обеспечения деятельности мозга и сердца (при этом концентрация глюкозы в крови возрастает) В) повышают чувствительность сердца и сосудов к адреналину
Пучковая зона коры	Глюкокортикоиды: кортикостерон, кортизол, гидрокортизон		
Сетчатая зона коры	Андрогены (и у мужчин, и у женщин)		

Мозговое вещество	Катехоламины: адреналин, норадреналин	Производные аминокислоты тирозина	Обеспечивают приспособление к острому стрессу: А) попадая в кровоток , вызывают эффекты, сходные с действием симпатической нервной системы Б) стимулируют распад углеводов и жиров для энергообеспечения интенсивной мышечной работы
-------------------	--	-----------------------------------	--

Гормоны поджелудочной железы

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Гормоны, влияющие на обмен углеводов и липидов	Инсулин	Белок с молекулярной массой 5700 Да, две полипептидные цепи, 51 а. к. о.	Обеспечивает усвоение тканями питательных веществ после приёма пищи: А) облегчает проникновение в ткани (из крови) глюкозы, аминокислот, жирных кислот Б) стимулирует их превращение в гликоген, белки и жиры. При этом, в частности, снижается концентрация глюкозы в крови
	Глюкагон	Полипептид: 29 а. к. о.	Мобилизует из тканей питательные вещества (углеводы и жиры) между приёмами пищи. Концентрация глюкозы в крови повышается
Гормоны, влияющие на функцию самой поджелудочной железы (помимо других действий)	Соматостатин	Циклический пептид, 14 а. к. о.	Образуется также в гипоталамусе, снижает выработку желудка и кишечника. Угнетает выработку ряда гормонов: А) в гипофизе – СТГ Б) в поджелудочной железе – инсулина и глюкагона

Гормоны, влияющие на функцию самой поджелудочной железы (помимо других действий)			В в слизистой ЖКТ – гастринов и секретина (где последний стимулирует экзокринную часть поджелудочной железы). Поэтому, в частности, тормозятся оба отдела поджелудочной железы – и экзокринной, и экзокринной
	ВИП (вазоактивный интестинальный полипептид)	Полипептид, 28 а. к. о.	АБ) Кроме того, расширяя сосуды, снижает артериальное давление
	ПП (панкреатический полипептид)	Полипептид, 36 а. к. о.	Стимулирует выделение не только панкреатического, но и поджелудочного сока

Гормоны почек

	Гормоны	Химическая природа	Действие
	Эритропоэтин	Белок	Стимулирует в красном костном мозгу ранние и, возможно, также более поздние стадии эритропоэза
Гормоны, влияющие на кровяное давление	Ренин	Белок	В отличие от обычных гормонов, является ферментом: катализировать в крови активацию ангиотензина – пептида, синтезируемого печенью в неактивном виде. После активации ангиотензин суживает сосуды и стимулирует продукцию альдостерона в надпочечниках
	Простагландины (образуются также во многих других органах)	Производные полиненасыщенных жирных кислот	Синтезируемый в почках вид простагландинов, видимо, расширяет сосуды и снижает давление

Гормоны тимуса

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Гормоны, влияющие на созревание лимфоцитов	Тимопоэтины (Т-лимфопоэтины)	Белки?	Способствуют тому, что в красном костном мозгу некоторые предшественники лимфопоэза превращаются в предшественники Т-лимфоцитов
Гормоны, влияющие на созревание лимфоцитов	Тимозин	Белок	Стимулирует дальнейшее созревание Т-лимфоцитов: <i>А)</i> миграцию пре-Т-клеток в тимус <i>Б)</i> пролиферацию Т-лимфобластов в тимусе и <i>В)</i> пролиферацию Т-иммунобластов в периферической лимфоидной ткани
	АСГ (лимфоцитстимулирующие гормоны)	Белки	Увеличивают антителообразование – возможно, за счёт стимуляции Т-хелперов
	ГТГ (гомостатический тимусный гормон, или фактор роста)	Белок?	Является синергистом СТГ гипофиза, то есть тоже способствует росту тела
Гормоны, подобные гормонам других желёз	Инсулиноподобный фактор	Белок	Как и инсулин, приводит к снижению концентрации глюкозы в крови
	Кальцитонин подобный фактор	Белок	Как и кальцитонин, понижает в крови концентрацию ионов кальция

Гормоны гонад

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Семенники (яички)	Андрогены: тестостерон и его производные	Стероиды (производные холестерина)	Вызывают: А) мобилизацию жира из адено и синтез белков в мышцах; Б) развитие вторичных мужских половых признаков
Яичники	Эстрогены: эстрадиол и его производные		Образуются в фолликулах яичника. А) Стимулируют развитие вторичных женских половых признаков. Б) Вызывают ряд изменений в органах женщины в процессе менструального цикла, в том числе: <i>в матке</i> – регенерацию эндометрия, <i>в молочных железах</i> – рост протококов, <i>в гипофизе</i> – торможение продукции ФСГ
	Прогестин: прогестерон		Образуется жёлтым телом яичника. Подготавливает соответствующие органы женщины к беременности, в том числе вызывает: в матке – набухание и секрецию эндометрия, понижение чувствительности к окситоцину (сокращающему матку); в молочных железах – рост альвеол (концевых отделов желёз); в гипофизе – торможение продукции ЛГ

Гормоны плаценты

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Аналоги гормонов гипофиза	ХТГ (хорионический гонадотропин); ЛТГ (пролактин); АКТГ ; Гормон роста	Белки	Дополняют при беременности действие соответствующих гормонов гипофиза. Так, ХТГ попадает в большей степени в организм эмбриона и оказывает действие, близкое к действию ФСГ и ЛГ. Плацентарный ЛТГ в первые недели беременности (пока сама плацента ещё не продуцирует половые гормоны) стимулирует рост и функционирование жёлтого тела в яичнике матери
	Эстрогены, прогестерон	Стероиды	Секреция плацентой этих гормонов компенсирует тот факт, что при беременности яичники практически не продуцируют эстрогены и через определённое время не синтезируют также и прогестерон
Женские половые гормоны	Релаксин	Белок, 6000 Да, две цепи, всего 54 а. к. о.	Подготавливает к родам ткани и органы женщины. Вызывает: А) расширение и размягчение шейки матки; Б) релаксацию лонного и других тазовых сочленений; В) торможение сокращений матки

Гормоны сердца

	Гормоны	Химическая природа	Действие
Предсердные кардиомоцины	Натрийуретический фактор типа С	Белок	Выделяясь в ответ на раздражение барорецепторов (при высоком давлении или большом объёме крови), усиливает выведение ионов натрия и воды почками.
	Атриоцептин	Гликопротеин	Является антагонистом альдостерона и АДГ Обладает противосвёртывающей активностью

Примечание: а. к. о. — аминокислотные остатки

Из таблицы 7.1 видно, что гормоны являются:

- 1) белками или пептидами;
- 2) производными аминокислот;
- 3) стероидами;
- 4) производными полиненасыщенных жирных кислот.

Если сгруппировать гормоны по их полярным свойствам, то окажется, что выделяют 2 неравные группы:

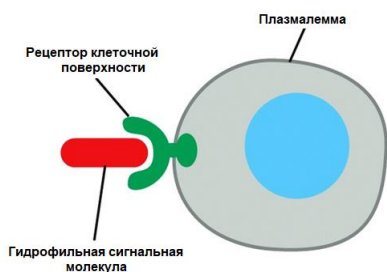
- 1) полярные, или гидрофильные гормоны – белки, пептиды и производные аминокислот (кроме тиреоидных гормонов);
- 2) неполярные, или гидрофобные гормоны – стероиды, производные жирных кислот и плюс тиреоидные гормоны.

Подразделение гормонов на гидрофильные и гидрофобные имеет принципиальное значение: с принадлежностью гормона к гидрофильным или гидрофобным соединениям связан **механизм его действия** на клетку-мишень (рис. 7.3).

Гидрофильные гормоны не способны проникать через плазматическую мембрану, поэтому на поверхности мембраны имеются для них белки-рецепторы.

Гидрофобные гормоны проходят через мембраны клеток и связываются с рецепторами в цитозоле или ядре.

(А) РЕЦЕПТОРЫ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ



(В) ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

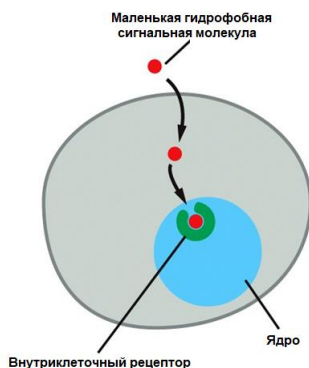


Рис. 7.3. Механизм действия гидрофильных и гидрофобных гормонов

Факторы роста – это регуляторные белки, выделяемые клетками той же ткани, к которой они принадлежат, например, гепатоцитами, лимфоцитами и др. Обнаружено много разнообразных факторов, например, фактор роста тромбоцитов (*PDGF* – platelet-derived growth factor), фактор роста эпидермиса (*EGF* – epidermal growth factor), фактор роста нейронов. Большинство факторов роста было открыто благодаря их митогенному (ростовому) влиянию на клетки. При определённых условиях один и тот же фактор может стимулировать или ингибировать клеточную дифференцировку, оказывая совершенно различное воздействие на одну и ту же клетку. Несмотря на разнообразие биологических эффектов, все факторы роста взаимодействуют с внешними рецепторами клетки и опосредованно влияют на инициацию транскрипции специфических генов. Большинство факторов роста в своем действии **паракринны** – они диффундируют на короткие расстояния и действуют местно только на близлежащие клетки.

Цитокины участвуют в воспалительных, иммунных и других защитных реакциях. Поэтому они вырабатываются не постоянно. Цитокины можно разделить на: **1) интерлейкины** – они выделяются активированными лейкоцитами и обеспечивают взаимодействие клеток в ходе защитных реакций; **2) интерфероны** – это небольшие сигнальные молекулы, которые выделяются клетками, инфицированными вирусами. Действуя на клетки-продуценты и на соседние клетки (особенно если на их поверхности имеются вирусные РНК), интерфероны ограничивают белковый синтез (путём усиления распада мРНК и торможения трансляции). Тем самым предупреждается образование в клетках новых вирусных частиц.

Нейромедиаторы – соединения, передающие сигнал в синапсах от пресинаптического окончания к постсинаптической мембране. Эти сигнальные молекулы участвуют в обеспечении координированной работы нейронов.

Будет ли клетка отвечать на сигнальное вещество, зависит в первую очередь от наличия у неё **рецептора**, или **белка рецептора**, воспринимающего данный сигнал. Без подходящего

рецептора клетка будет глуха к сигнализации и не станет на неё отвечать. Синтезируя только определённый набор рецепторов из тысяч возможных, клетки ограничивают число сигналов, способных повлиять на них.

От мембранного рецептора сигнал передаётся внутрь клетки-мишени при участии набора **внутриклеточных сигнальных молекул**. Они действуют последовательно, изменяя активность **эффektorных белков**, влияющих на поведение клеток. Эта внутриклеточная система передачи сигналов и набор эффекторных белков, на которые она влияет, **различаются в разных типах** специализированных клеток (рис. 7.4). Поэтому **различные клетки по-разному отвечают на один и тот же сигнал!**

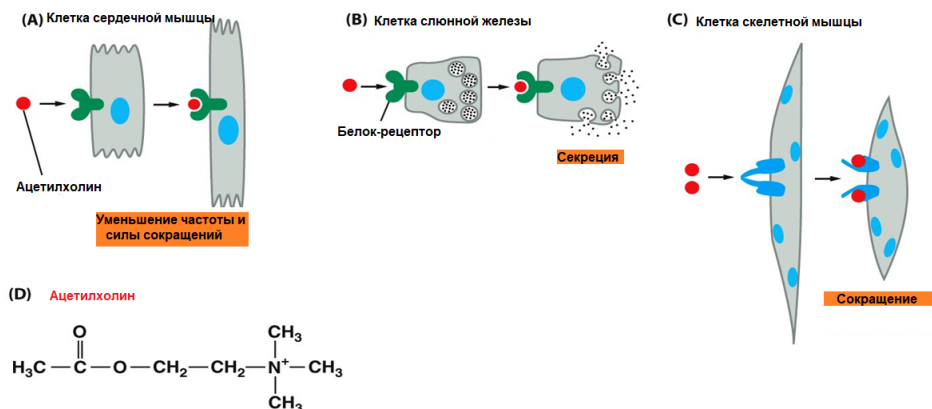


Рис. 7.4. Ответы различных клеток-мишеней на одну сигнальную молекулу
(по Альбертсу Б. и др., 2015)

Примечание: Нейромедиатор ацетилхолин связывается со сходными белками-рецепторами на клетках сердечной мышцы (А) и слюнной железы (В), но вызывает различные ответы в каждом типе клеток. Клетки скелетных мышц (С) синтезируют для восприятия того же сигнала другой белок-рецептор; этот рецептор генерирует внутриклеточные сигналы, отличные от сигналов, передаваемых рецепторами клеток сердечной мышцы. При таком многогранном действии ацетилхолин имеет простое химическое строение (D).

У типичной клетки есть множество видов рецепторов (10–100 000 каждого из них). Такое разнообразие рецепторов делает клетку **чувствительной одновременно ко многим внеклеточным сигналам** и позволяет сравнительно небольшому числу сигнальных молекул, используемых в разных сочетаниях, осуществлять тонкий и сложный контроль поведения клеток. Комбинации сигналов могут вызывать эффекты, отличающиеся от суммы ответов, которые вызывает каждый из сигналов по отдельности. Это происходит из-за того, что **внутриклеточные системы передачи сигнала, активируемые разными веществами, могут взаимодействовать**. Поэтому наличие одного сигнала может изменять ответ на другой. Одна комбинация сигнальных веществ позволяет выживать клетке; другая направляет её дифференцировку по определённому пути; ещё одна группа сигналов может вызвать её деление. В отсутствие каких-либо сигналов большинство животных клеток запрограммированы на самоубийство (рис. 7.5).

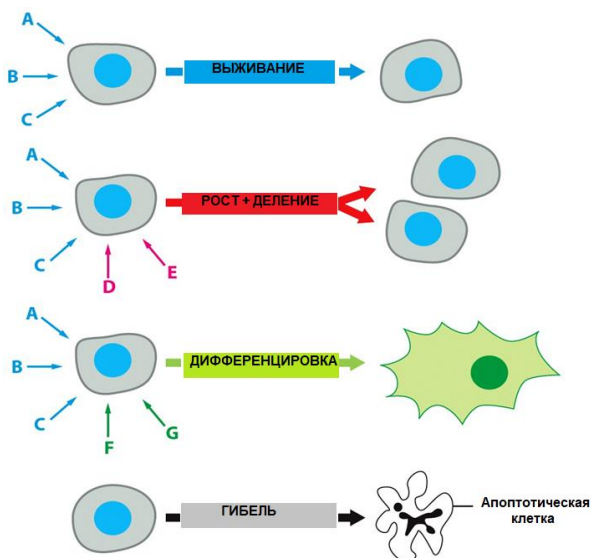


Рис. 7.5. Варианты ответа клеток на сигнальные молекулы
(по Альберту Б. и др., 2015)

Внеклеточные сигналы могут действовать медленно и быстро (рис. 7.6 и 7.7). При этом, главной и отличительной особенностью молекулярных механизмов действия двух основных классов гормонов является: **1)** действие пептидных гормонов реализуется в основном путём посттрансляционных модификаций белков в клетках; **2)** стероидные гормоны (а также тиреоидные гормоны, ретиноиды, витамин D₃-гормоны) выступают в качестве регуляторов экспрессии генов.

Например, **стероидные гормоны** – кортизол, эстрадиол, тестостерон, и **тиреоидные гормоны** – тироксин – проходят сквозь плазмалемму и связываются с белками-рецепторами в цитозоле или в ядре (рис. 7.8, 7.9). Эти рецепторы относят к группе **ядерных рецепторов**, так как после связывания гормона все они действуют как регуляторы транскрипции внутри ядра. При отсутствии гормона рецепторы находятся внутри клетки в неактивном состоянии. После связывания гормона рецептор претерпевает крупные изменения конформации. В результате он активируется и может стимулировать или подавлять транскрипцию специфичных генов-мишеней.

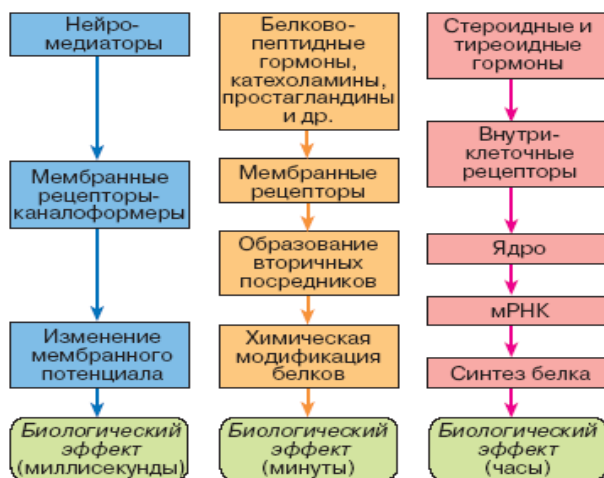


Рис. 7.6. Три основных механизма нейроэндокринной регуляции физиологической активности клеток (по Ткачуку В. А., 1998)

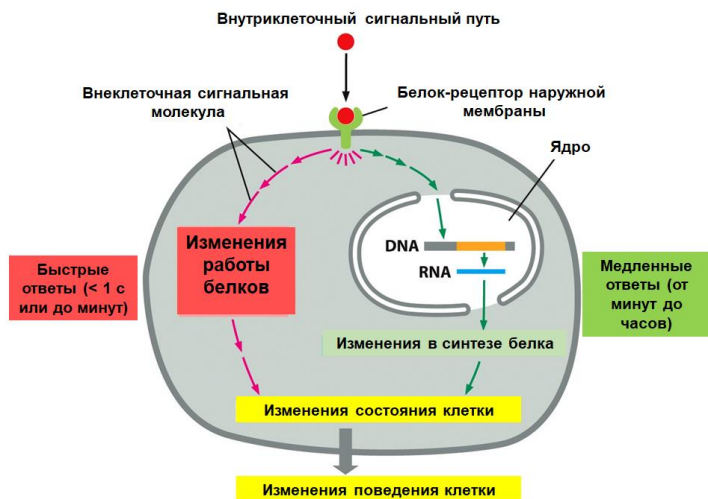


Рис. 7.7. Быстрый и медленный ответ клеток на внеклеточные сигналы (по Альберту Б. и др., 2015)

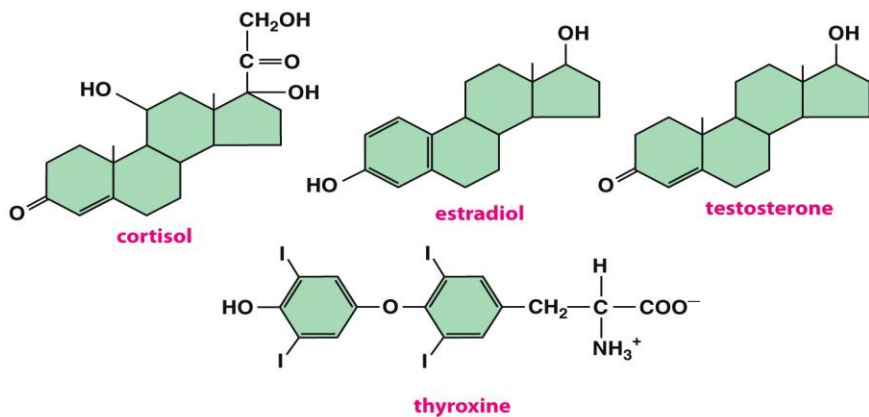


Рис. 7.8. Структура стероидных и тиреоидных гормонов

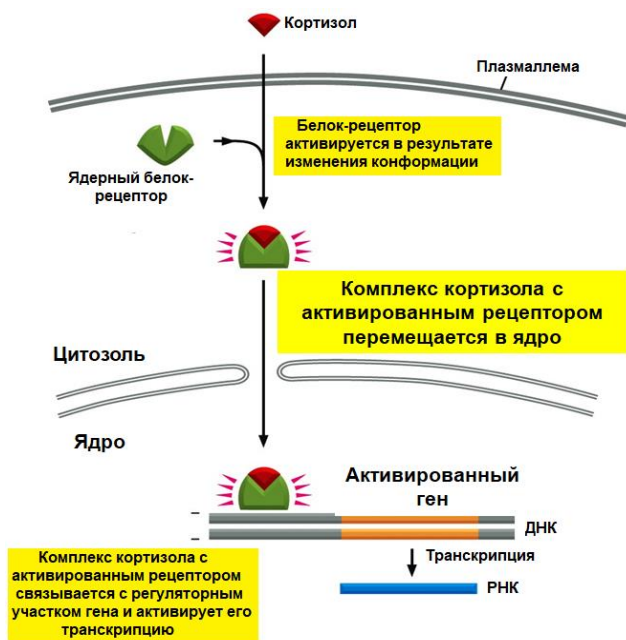


Рис. 7.9. Молекулярный механизм действия кортизола

Кортизол – гормон, выделяемый надпочечниками в ответ на стресс. Он диффундирует сквозь плазмалемму клеток-мишеней и связывается с белком-рецептором в цитозоле (рис. 7.9.). Затем гормон-рецепторный комплекс проникает в ядро через ядерные поры. Связывание с кортизолом активирует белок-рецептор, и он приобретает способность взаимодействовать с определёнными регуляторными последовательностями ДНК и активировать или подавлять транскрипцию соответствующих генов-мишеней. В результате: **1)** повышается активность ключевых ферментов глюконеогенеза и метаболизма аминокислот в печени; **2)** усиливается гидролиз белков до аминокислот; **3)** ускоряется трансаминирование аминокислот; **4)** повышается уровень содержания глюкозы, лактата и пирувата в крови; **5)** изменяется липолиз и липогенез. Всё это направлено на то, чтобы путём глюконеогенеза обеспечить легкодоступный источник энергии при стрессе.

Ядерные рецепторы и активирующие их гормоны играют важную роль в физиологической активности человека (Альбертс Б. с соавт., 2015). Утрата этих систем сигнализации может иметь драматические последствия. Например, **гормон тестостерон** у людей управляет формированием наружных половых органов и влияет на развитие головного мозга у плода. В период полового созревания этот гормон запускает развитие мужских вторичных половых признаков. Важную роль в этих процессах играют **рецепторы к тестостерону**. Утрата этих рецепторов приводят к патологическим изменениям. Встречаются люди, имеющие мужской генотип – X- и Y-половые хромосомы, но из-за мутации утратившие рецептор тестостерона. Поэтому, хотя тестостерон в их организме производится, их клетки не могут реагировать на него. В результате такие люди развиваются как женщины, так как этот путь развития половых признаков и головного мозга выбирается в отсутствие мужских половых гормонов. Такая реверсия пола демонстрирует важную роль тестостерона в развитии половых признаков, а также то, что рецептор к тестостерону необходим не единственному типу клеток для развития всего комплекса признаков, отличающих мужчин и женщин.

Стероидные и тиреоидные гормоны – не единственные внеклеточные сигнальные молекулы, способные проходить через плазмалемму. Некоторые растворённые газы могут проникать сквозь мембрану внутрь клетки и напрямую регулировать активность специфических внутриклеточных белков. Прямое действие позволяет таким сигналам изменять поведение клетки в течение секунд или минут.

Таким путём действует **оксид азота (NO)**. Этот газ легко диффундирует из клеток, где он образуется, и проникает в соседние клетки. NO синтезируется из аминокислоты аргинина и играет роль медиатора местного действия во многих тканях. NO действует локально, поскольку быстро превращается в нитриты и нитраты (с периодом полужизни 5–10 с), реагируя с кислородом и водой вне клеток. Например, клетки эндотелия – уплотнённые клетки, выстилающие изнутри все кровеносные сосуды

(рис. 7.10) – выделяют NO в ответ на сигнал от нервных окончаний. В свою очередь, NO вызывает расслабление гладких мышц в стенке сосуда и его расширение, так что кровоток через сосуд усиливается (рис. 7.11).

Так, молекулы ацетилхолина высвобождаются нервными окончаниями в стенке кровеносного сосуда. Затем они диффундируют через слой гладких мышц и базальную пластинку и достигают ацетилхолиновых рецепторов на поверхности эндотелиальных клеток, выстилающих сосуд. В результате он стимулирует синтез и выделение NO клетками эндотелия. NO выходит из эндотелиальных клеток и проникает в соседние гладкомышечные клетки, где регулирует активность специфичных белков, вызывая расслабление мышечных клеток.

Внутри многих клеток-мишеней NO связывается с ферментом **гуанилатциклазой** и активирует его, стимулируя образование **циклического ГМФ** (цГМФ; cGMP) из нуклеотида ГТФ. Сам cGMP – тоже небольшая сигнальная молекула, представляющая следующее звено в цепи внутриклеточной передачи сигнала, приводящей в конечном счёте к клеточному ответу (рис.7.12).

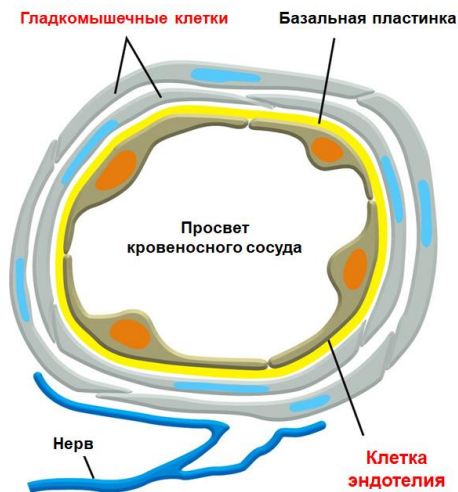


Рис. 7.10. Строение кровеносного сосуда

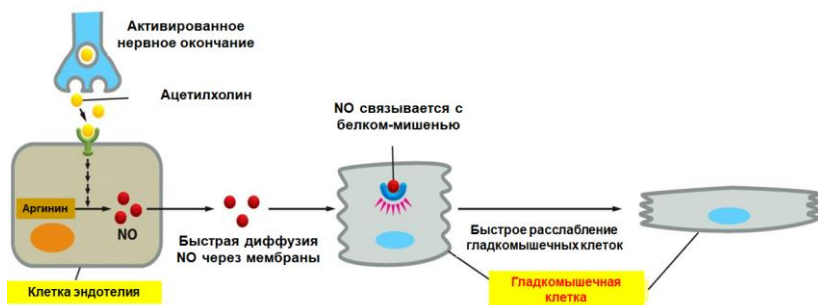


Рис. 7.11. Механизм действия NO на гладкомышечные клетки кровеносных сосудов (по Альберту Б. и др., 2015)

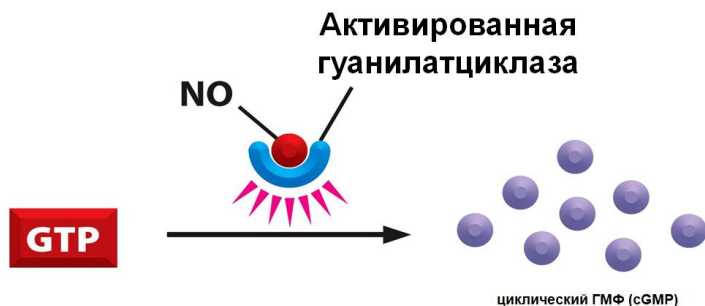


Рис. 7.12. Образование циклического ГМФ ферментом гуанилатциклазой

Подавляющее большинство сигнальных молекул слишком крупные или слишком гидрофильные, поэтому они не проходят сквозь плазмалемму клеток-мишеней. Эти белки, пептиды или мелкие водорастворимые молекулы связываются с белками-рецепторами клеточной поверхности, пронизывающими плазмалемму (рис. 7.13). Такие трансмембранные рецепторы воспринимают сигнал на внешней стороне мембраны и передают его, преобразуя в новую форму, внутрь клетки.

Белок-рецептор осуществляет первый шаг в цепи передачи сигнала: он связывает внеклеточную сигнальную молекулу и образует в ответ новые внутриклеточные сигнальные молекулы. В дальнейшем сигнальный процесс внутри клетки обычно представляет собой молекулярную эстафету, в ходе которой

сообщение передаётся «вниз по течению» от одной **внутриклеточной сигнальной молекулы** к другой. Каждая из них активирует или образует следующую сигнальную молекулу, что продолжается до тех пор, пока в действие не вступит фермент, не изменится конфигурация цитоскелета или не произойдёт включение либо выключение гена. Этот конечный результат называется **клеточным ответом**.

Компоненты таких внутриклеточных сигнальных путей выполняют несколько важных функций:

1) могут просто **передавать** сигнал далее и **распространять** его по клетке;

2) могут **усиливать** сигнал, делая его мощнее, благодаря чему немногочисленные внеклеточные сигнальные молекулы могут вызывать сильный клеточный ответ;

3) могут **воспринимать сигнал** от нескольких внутриклеточных сигнальных путей, тем самым **интегрируя сигналы**, а затем передавать сигнал далее;

4) могут **распределять** сигнал между несколькими сигнальными путями или эффекторными белками, **вызывая разветвления** потока передачи информации и обеспечивая сложные ответы.

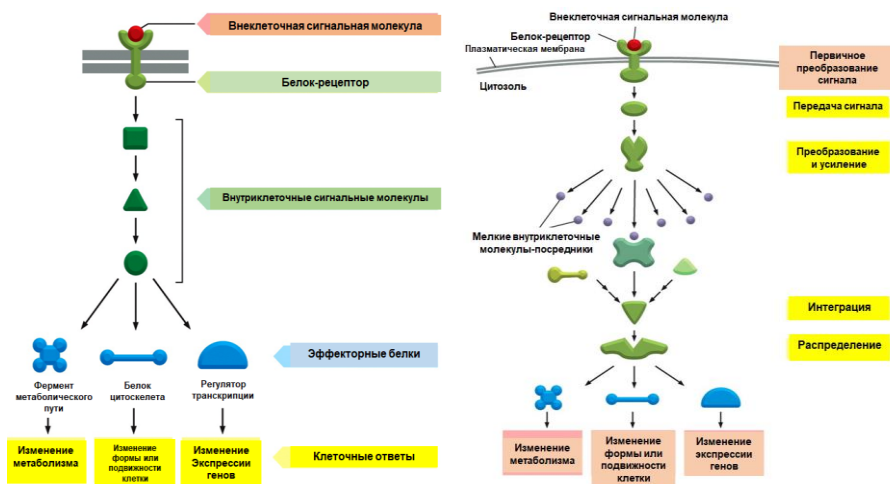


Рис. 7.13. Компоненты внутриклеточных сигнальных путей
(по Альберту Б. и др., 2015)

7.2. Механизмы внутриклеточной сигнализации

Для каждого фактора, действующего на клетку, можно, как правило, выделить основную сигнальную систему, преимущественно определяющую характер формируемого ответа. Однако в большинстве случаев, процесс активации находится под контролем не одной, а нескольких систем внутриклеточной сигнализации, так что важным фактором формирования ответа клеток становится взаимосвязь этих систем.

Передача сигнала в клетку состоит из нескольких стадий:

- 1) взаимодействие рецептора со стимулом или сигнальной молекулой;
- 2) активация находящейся в мембране эффекторной молекулы, которая отвечает за синтез вторичных посредников (мессенджеров);
- 3) образование вторичных посредников (например, диацилглицерина, инозитол-1,4,5-трифосфата, оксида азота);
- 4) активация вторичными посредниками белков-мишеней или специализированных клеточных элементов, приводящих к физиологическому ответу;
- 5) исчезновение вторичного посредника.

Несмотря на огромное разнообразие стимулов, сигнальных молекул, рецепторов и процессов, сопровождающих их взаимодействие, существует всего несколько универсальных сигнальных систем, передающих при взаимодействии стимула с рецептором информацию различным клеточным органеллам и запускающих определённые физиологические процессы в клетке. Сигнальные системы являются древнейшими системами, имеющимися у животных и растений.

Механизмы передачи информации в живых системах так же универсальны, как передача генетического кода или трансформация энергии. Во всех клетках животных и растений имеются два основных пути передачи сигнала, различающихся по вторичным посредникам — **аденилатциклазный** и **фосфоинозитидный**. Эти пути передачи сигнала имеют много общего. В обоих случаях информацию от первого звена рецептора получают и передают через мембрану в цитоплазму

так называемые G-белки, активирующиеся при связывании гуанозинтрифосфата (GTP). G-белки активируют «усилительный» фермент на внутренней стороне мембраны, который способствует превращению молекул вещества-предшественника в молекулы вторичного посредника. Конечные стадии разных способов передачи сигналов также сходны: вторичные мессенджеры вызывают изменение структуры клеточных белков или регулируют экспрессию гена.

В *аденилатциклазном пути* передачи информации сигнальная молекула, например, **адреналин**, после взаимодействия со стимулирующим рецептором – β_2 -адренорецептором через G-белок активирует «усилительный» фермент **аденилатциклазу** (AC) (рис. 7.14). AC катализирует превращение АТФ в **циклический аденозинмонофосфат** (сАМР). Она локализована на внутренней стороне клеточной мембраны. сАМР в цитоплазме взаимодействует с ферментом протеинкиназой **A**, которая фосфорилирует определённые белки-мишени по остаткам серина или треонина. Так, в печени протеинкиназа **A** фосфорилирует фермент фосфорилазу **b** (неактивная форма), которая в результате фосфорилирования превращается в активную фосфорилазу **a**, катализирующую процесс отщепления от гликогена глюкозы.

Помимо участия в контроле активности ферментов, сАМР-зависимые протеинкиназы являются частью важного механизма регуляции экспрессии гена (рис. 7.15). Промоторы некоторых генов содержат сАМР-чувствительные элементы (CREs). Протеинкиназа **A** через ядерные мембраны проникает в ядро, где она фосфорилирует белок, связывающий сАМР-чувствительные элементы некоторых генов (CREB – сАМР-responsive element binding protein). В результате этого CREB становится активным фактором транскрипции для ряда специфических генов, например, участвующих в индукции синтеза белков теплового шока.

Таким образом, сАМР является вторичным посредником в передаче внешнего сигнала функциональным элементам, как в цитоплазме, так и в ядре.

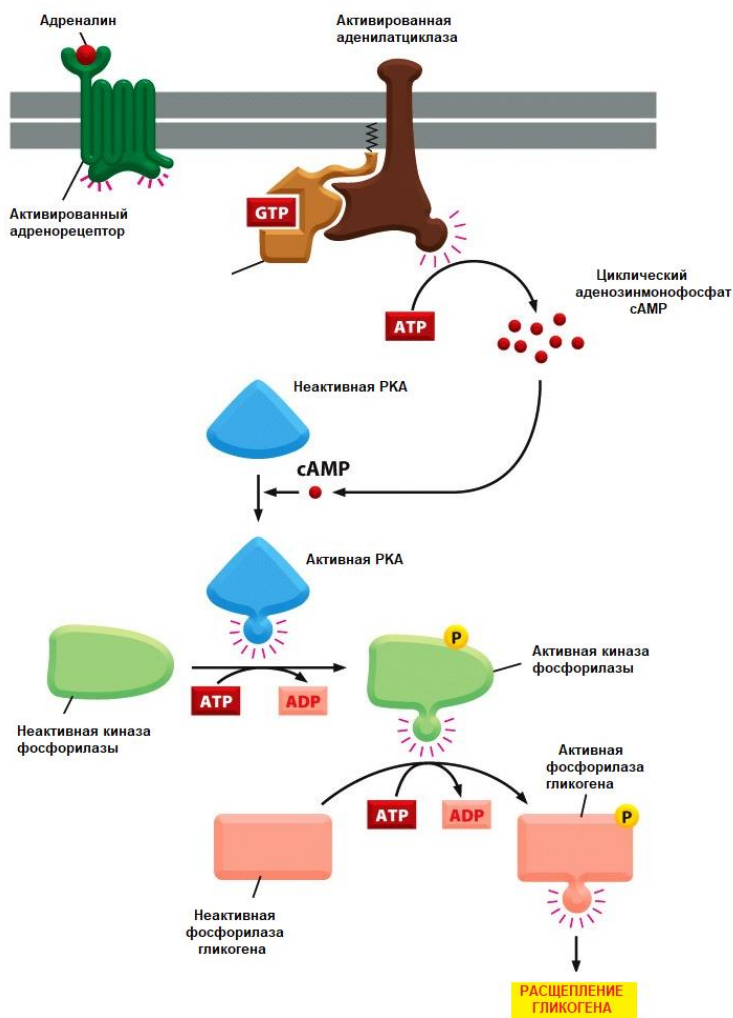


Рис. 7.14. Аденилатциклазный путь передачи сигнала
(по Альбертс Б. и др., 2015)

Ряд сигнальных молекул, например, **натрийуретический фактор предсердий** (вырабатывается эндотелиальными клетками и стимулирует секрецию натрия почками), вызывает увеличение уровня внутри клетки другого циклического нуклеотида – **cGMP**, что в свою очередь приводит к активации

фермента протеинкиназы **G**. Образование cGMP из GTP катализируют мембраносвязанная и растворимая формы фермента **гуанилатциклазы**. Эффекты cGMP более специализированы по сравнению с cAMP. Они включают расслабление гладкой мускулатуры, воздействие на нервные клетки и зрение. Растворимая гуанилатциклаза активируется внутриклеточным и межклеточным мессенджером – короткоживущей мембранопроницаемой молекулой оксида азота (NO). NO играет важную роль в регуляции процессов Ca^{2+} -сигналикации и Ca^{2+} -гомеостаза в различных типах клеток.

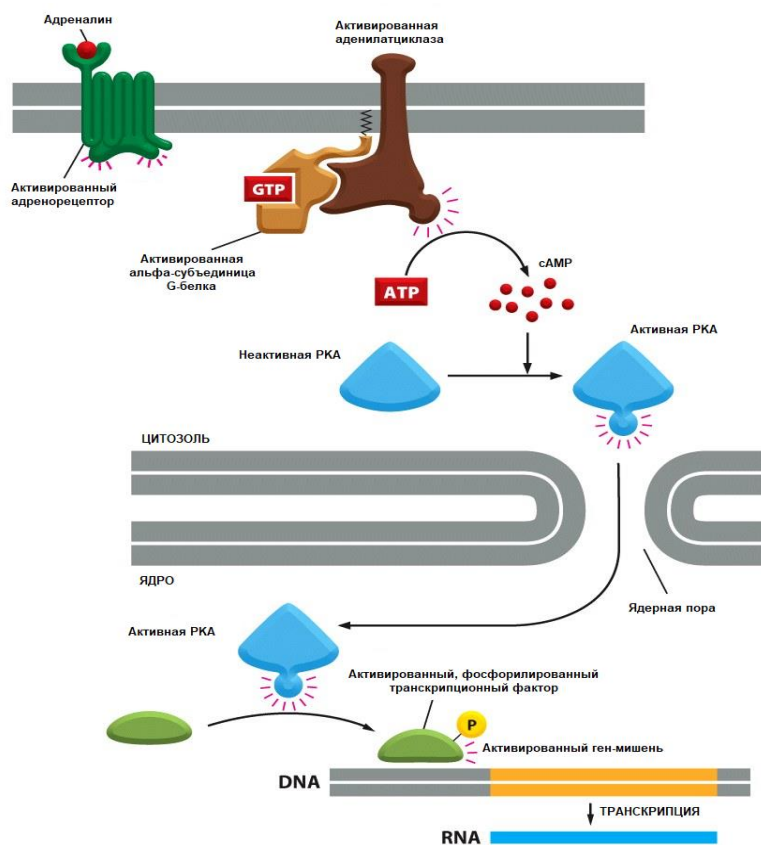


Рис. 7.15. Ядерные эффекты cAMP-зависимой протеинкиназы
(по Альбертсу Б. и др., 2015)

Другая группа гормонов и факторов роста использует для передачи сигналов **фосфоинозитидный путь**. Примерами гормонов, использующих такой механизм, могут служить тиротропин-рилизинг гормон, гонадотропин-рилизинг гормон и фактор роста тромбоцитов.

Взаимодействие гормона с рецептором через G-белок активирует усилительный мембраносвязанный фермент фосфолипазу **С** (PLC) (рис. 7.16). PLC расщепляет мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) на два соединения, служащие внутриклеточными мессенджерами: водорастворимый инозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) и липидорастворимый диацилглицерин (DAG). С помощью IP_3 происходит изменение проницаемости Ca -каналов плазматической мембраны и вход Ca^{2+} в клетку, а также осуществляется индуцированный IP_3 выход кальция из эндо- и саркоплазматического ретикула (СР), благодаря открыванию Ca -каналов в этих внутриклеточных депо Ca^{2+} .

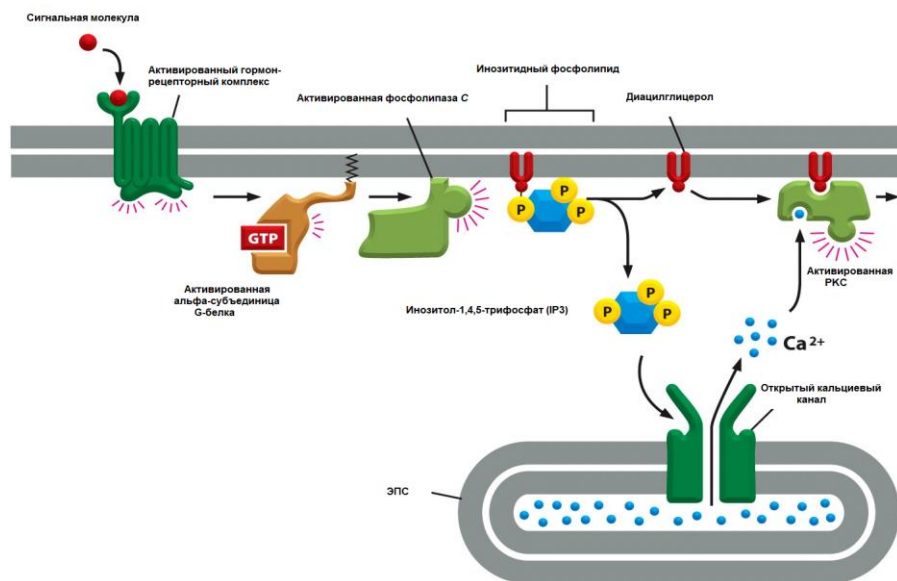


Рис. 7.16. Фосфоинозитидный путь передачи сигнала
(по Альбертсу Б. и др., 2015)

Другой вторичный мессенджер, образующийся в результате работы фосфолипазы **C** – DAG – активирует протеинкиназу **C** (PKC). Протеинкиназа **C** фосфорилирует по остаткам треонина и серина многие белки клетки с последующим изменением их функции. Стадия фосфорилирования белков является одним из основных механизмов регуляции клеточных процессов, поэтому в клетке существует несколько типов протеинкиназ, активирующихся с помощью различных эффекторов. К ним относятся протеинкиназа **A**, активатором которой является cAMP – вторичный мессенджер при стимуляции β -рецепторов; протеинкиназа **G**, активируемая cGMP; Ca^{2+} -кальмодулин-зависимая протеинкиназа и протеинкиназа **C**, активатором которых является DAG. Одним из эффектов DAG является фосфорилирование Ca -канала плазматической мембраны, что вызывает вход кальция в клетку.

Таким образом, оба продукта фермента фосфолипазы C – IP_3 и DAG – приводят к повышению уровня Ca^{2+} в клетке.

В таблицах 7.2 и 7.3 суммированы некоторые клеточные ответы, опосредуемые cAMP и фосфолипазой **C**. Видно, что благодаря множеству регуляторных веществ и многообразию путей их действия достигается тонкая и многосторонняя регуляция метаболизма в пределах не только отдельной клетки, но и целого организма.

Таблица 7.2. Клеточные ответы, опосредуемые cAMP

Внеклеточная сигнальная молекула	Ткань-мишень	Основные эффекты
Адреналин	Сердце	Увеличение частоты и силы сокращений сердца
Адреналин	Скелетные мышцы	Расщепление гликогена
Адреналин, АКТГ, глюкагон	Жировая ткань	Расщепление жиров
АКТГ	Надпочечники	Секреция кортизола

Таблица 7.3. Клеточные ответы, опосредуемые фосфолипазой C

Внеклеточная сигнальная молекула	Ткань-мишень	Основные эффекты
Вазопрессин (пептидный гормон)	Печень	Расщепление гликогена
Ацетилхолин	Поджелудочная железа	Секреция амилазы (пищеварительного фермента)
Ацетилхолин	Гладкие мышцы	Сокращение
Тромбин (протеолитический фермент)	Тромбоциты	Агрегация тромбоцитов

Задания для внеаудиторной работы

1. В таблице «Различные гормоны человека» распределите гормоны по: **а)** особенности химического строения; **б)** механизм действия и **в)** время полужизни.

2. Межклеточные сигнальные вещества (особенности строения гормонов, нейромедиаторов, нейромодуляторов, гистогормонов).

3. Рецепторы гормонов, их типы и G-белки.

4. Внутриклеточные сигнальные пути – цАМФ-опосредованные пути, цГМФ-опосредованные пути, NO-опосредованные пути, пути, опосредованные липидами и ионами Ca^{2+} .

5. Соберите информацию об особенностях биосинтеза и механизме действия одного из гормонов (на выбор) животных и человека.

6. Соберите информацию об особенностях биосинтеза и механизме действия одного из фитогормонов (на выбор).

Основные термины и понятия

Составьте словарь в тетради для практических работ.

G-белок

Аденилатциклаза

Внеклеточная сигнальная молекула

Внутриклеточная сигнальная молекула

Внутриклеточный сигнальный путь

Вторичный посредник
Гормон
Диацилглицерин
Инозитолтрифосфат
Медиатор местного действия
Межклеточная сигнализация
Нейромедиатор
Оксид азота
Протеинкиназа
Протеинфосфатаза
Рецептор
Рецептор с ферментативной активностью
Стероидный гормон
Тирозинкиназа
Трансдукция сигнала
Фактор роста
Фосфолипаза **C**
Циклический АМР
Цитокин
Ядерный рецептор

Задания для аудиторной работы

Тема. Межмолекулярные взаимодействия и их роль в функционировании живых систем

Решите задачи.

Задача 1. Укажите сходства и различия в передаче сигналов нейронами, которые выделяют нейромедиаторы в синаптическую щель, и эндокринными клетками, секретирующими гормоны в кровь. Обсудите относительные преимущества обоих механизмов.

Задача 2. Заполните таблицу «Характеристика гормонов, регулирующих водно-солевой обмен»:

Гормон	Место синтеза	Стимулы	Механизм действия	Органы-мишени	Эффекты
АДГ					
Альдостерон					
Предсердный натрийуретический пептид					

Задача 3. Опишите этапы длинного непрямого сигнального пути, ведущего от рецептора клеточной поверхности и меняющего экспрессию генов в ядре. Сравните этот путь с двумя прямыми и короткими путями, ведущими от клеточной поверхности в ядро.

Задача 4. Заполните таблицу «Характеристика гормонов, регулирующих обмен кальция и фосфатов»:

Гормон	Место синтеза	Стимулы	Механизм действия	Органы-мишени	Эффекты
ПТГ					
Кальцитриол					
Кальцитонин					

Задача 5. Заполните таблицу «Инсулин и основные контринсулярные гормоны»:

Гормон	Строение и место синтеза	Стимул секреции	Клетки (органы)-мишени	Механизм передачи гормонального сигнала	Изменение метаболизма в клетках-мишенях
Инсулин					
Глюкагон					
Кортизол					
Адреналин					
Соматотропин					
Йодтиронины					

Задача 6. Решите тест.

1. Выберите правильные ответы.

Гормоны:

А. Проявляют свои эффекты через взаимодействие с рецепторами

Б. Синтезируются в задней доле гипофиза

В. Изменяют активность ферментов путём частичного протеолиза

Г. Индуцируют синтез ферментов в клетках-мишенях

Д. Синтез и секреция регулируется по механизму обратной связи

2. Выберите правильные ответы.

Йодтиронины:

А. Синтезируются в гипофизе

Б. Взаимодействуют с внутриклеточными рецепторами

В. Стимулируют работу Na^+, K^+ -АТФазы

Г. В высоких концентрациях ускоряют процессы катаболизма

Д. Участвуют в ответной реакции на охлаждение

3. Выберите правильные ответы.

Под влиянием инсулина в печени ускоряются:

А. Биосинтез белков

Б. Биосинтез гликогена

В. Глюконеогенез

Г. Биосинтез жирных кислот

Д. Гликолиз

4. Выберите правильные ответы.

К стероидным гормонам относятся:

А. Кальцитонин

Б. Вазопрессин

В. Окситоцин

Г. Тестостерон

Д. Адреналин

5. Выберите правильные ответы.

Стероидные гормоны:

А. Проникают в клетки-мишени

Б. Транспортируются кровью в комплексе со специфическими белками

В. Стимулируют реакции фосфорилирования белков

Г. Взаимодействуют с хроматином и изменяют скорость транскрипции

Д. Участвуют в процессе трансляции

6. Вторичными посредниками гормонов в клетке являются:

А. Ионы кальция

Б. цАМФ

В. ГДФ

Г. АТФ

Д. Кальмодулин

Задача 7. Укажите сходства и различия в передаче сигналов нейронами, которые выделяют нейромедиаторы в синаптическую щель, и эндокринными клетками, секретирующими гормоны в кровь. Обсудите относительные преимущества обоих механизмов.

Глава 8

Молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла.

Программируемая клеточная гибель

8.1. Молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла

Клетки организма находятся в одном из трёх возможных состояний:

- **в клеточном цикле** (митотическом цикле; это многие клетки базального слоя эпителия, гемопоэтические клетки);
- **в стадии покоя с сохранением возможности вернуться в цикл** (сюда относятся клетки печени, а также стволовые клетки костных, скелетных мышечных тканей) и, наконец,
- **в стадии терминальной дифференцировки**, при которой способность делиться полностью утрачена (таковы, например, нейроны головного мозга, клетки сердечной мышцы, волокна скелетных мышц).

В жизни клетки различают **жизненный цикл** и **клеточный цикл**. **Жизненный цикл** – период от образования клетки из материнской до следующего деления или гибели клетки.

Клеточный цикл включает подготовку к митозу (интерфазу) и митоз. Другое название **митотический цикл**. Детали клеточного цикла различаются у разных организмов и на разных этапах индивидуального развития одного организма. Однако некоторые черты клеточного цикла универсальны, так как они позволяют каждой клетке выполнять одну и ту же основную задачу – **копировать генетическую информацию и передавать её следующему поколению клеток**.

Для образования двух генетически идентичных дочерних клеток ДНК каждой хромосомы должна быть удвоена без ошибок, а удвоенные хромосомы аккуратно распределены, или **сегрегированы**, по двум дочерним клеткам; при этом каждая клетка получает полную копию всего генома (рис. 8.1). Большинство клеток кроме того удваивают число других макромолекул

и органелл и вдвое увеличиваются в размерах между делениями. Для сохранения размеров делящиеся клетки должны координировать процессы роста и деления.

Длительность клеточного цикла сильно варьирует у разных типов клеток (табл. 8.1). Одноклеточные дрожжи в оптимальных условиях делятся примерно один раз в 2 часа, а клетка печени млекопитающих в среднем делится реже одного раза в год.

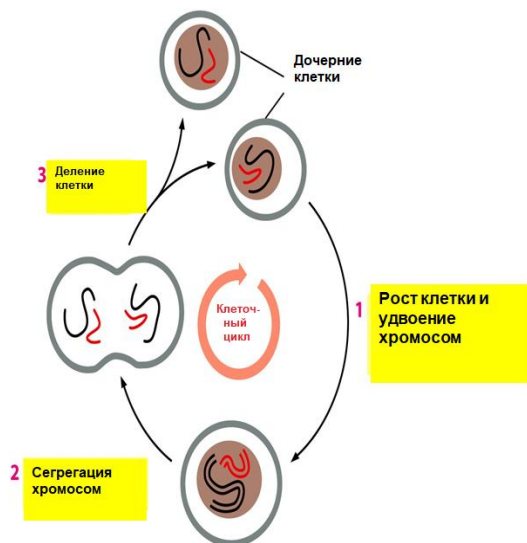


Рис. 8.1. Размножение клеток путём удвоения своего содержимого и деления надвое – клеточный цикл (по Альберту Б. и др., 2015)

Таблица 8.1. Длительность клеточного цикла

Тип клеток	Длительность клеточного цикла
Клетки зародыша лягушки на ранней стадии	30 мин
Дрожжевые клетки	1,5–3 ч
Клетки кишечного эпителия млекопитающих	~12 ч
Фибробласты млекопитающих в культуре	~20 ч
Клетки печени человека	~1 год

Клеточный цикл эукариотической клетки подразделяется на 4 фазы (рис. 8.2). В микроскоп мы видим два события клеточного цикла: деление ядра, или **МИТОЗ**, и последующее деление

клетки пополам **цитокинез**. Вместе эти два процесса входят в **М-фазу** клеточного цикла. В типичной клетке млекопитающего вся М-фаза занимает около часа, что составляет небольшую часть клеточного цикла. Период между двумя М-фазами – **интерфаза**. Интерфаза включает 3 фазы клеточного цикла – **G₁**, **S** и **G₂**. В течении интерфазы клетка растёт и готовится к митозу.

Во время **S-фазы** в клетке удваивается ядерная ДНК, что служит необходимой предпосылкой для деления клетки. В течение предшествующей S-периоду и следующих за ним фаз клетка продолжает расти. После репликации ДНК в S-периоде две копии каждой хромосомы остаются тесно связанными между собой (рис. 8.3). Первый видимый признак того, что клетка готовится вступить в М-фазу – нарастающая **конденсация** хромосом. В ходе конденсации удвоенные хромосомы сначала выглядят в световой микроскоп как длинные нити; постепенно они становятся всё толще и короче. Конденсация уменьшает опасность переплетения хромосом и облегчает сегрегацию по двум формирующимся дочерним клеткам в ходе митоза.

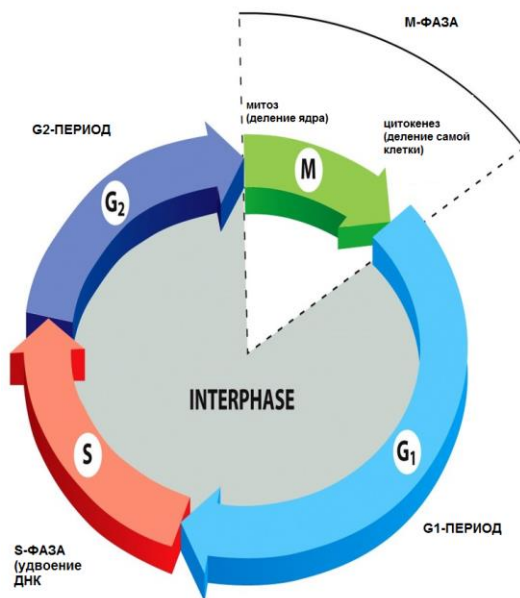


Рис. 8.2. Четыре фазы клеточного цикла (по Альбертсу Б. и др., 2015)

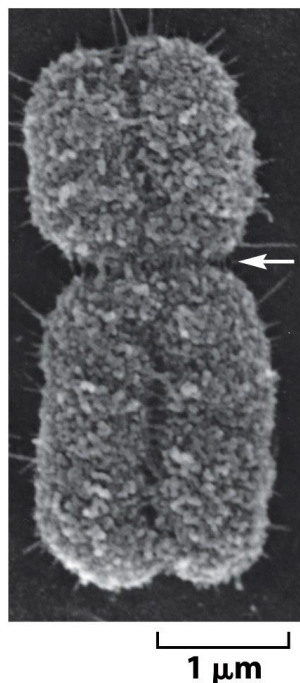


Рис. 8.3. Хромосомы в *S*-период клеточного цикла

G_1 -фаза – это период между окончанием М-фазы и началом S-фазы. В G_1 -фазе, продолжительность которой может сильно варьировать, происходит синтез мРНК, белков и других компонентов клетки. У некоторых клеток в жизненном цикле может отсутствовать G_1 -фаза. Клетки, которые прошли дифференцировку и больше не делятся, постоянно находятся в **фазе покоя G_0** . На протяжении G_1 -фазы существует критическая точка – точка рестрикции (***R***), когда решается войдёт ли клетка в следующий цикл деления или предпочтёт стадию покоя G_0 , в которой она может находиться неопределённо долго. При стимуляции митогенами (например, факторами роста, онкогенными вирусами) покоящиеся клетки могут вернуться в состояние, свойственное **G_1 -фазе**. Если такие клетки пройдут критическую точку, они вступают в ***S*-фазу**.

G₂-фаза – интервал между концом S-фазы и началом M-фазы. G₂-фаза является конечным этапом подготовки клетки к делению. В течение G₁- и G₂-периодов клетка следит за внутренней и внешней средой. В определённых точках G₁ и G₂ клетка решает, переходить к следующему этапу или сделать паузу, чтобы дать себе больше времени на подготовку.

Вхождение клетки в цикл деления определяется сочетанием ряда условий (внутренних и внешних). Нормальная клетка подчиняется исходящим из организма сигналам. Если в момент **R** у клетки имеются все необходимые условия (достаточные масса и содержание белков, концентрация кальция, обеспеченность питательными веществами) и, кроме того, если клетка получила митогенный стимул, то её реакция – вступление в очередной цикл деления. В отсутствие внешнего сигнала нормальная клетка выходит из цикла.

В эукариотических клетках есть сложная система взаимодействующих белков – **система контроля клеточного цикла** (рис. 8.4). Она позволяет клетке удостовериться, что в ней удвоена вся ДНК и все органеллы, и поделиться упорядоченным образом. Эта система гарантирует, что события клеточного цикла – удвоение ДНК, митоз т. д. – будут происходить в строго определённой последовательности, и каждый из процессов начнётся только после завершения предыдущего. Система контроля клеточного цикла выполняет эти задачи с помощью молекул, способных остановить клеточный цикл в определённых «контрольно-пропускных пунктах» – **чекпойнтах**.

Первый чекпойнт действует в фазе **G₁** и позволяет клетке убедиться, что условия среды благоприятны для пролиферации, до вступления в S-период. Для пролиферации клеток животных требуется достаточное количество питательных веществ и специфических сигнальных молекул во внеклеточной среде. Если условия среды неблагоприятны, клетка может отложить прохождение **G₁** и даже войти в состояние покоя **G₀**. Многие клетки, в том числе нейроны и клетки скелетных мышц, остаются в фазе **G₀** в течение всей жизни организма.

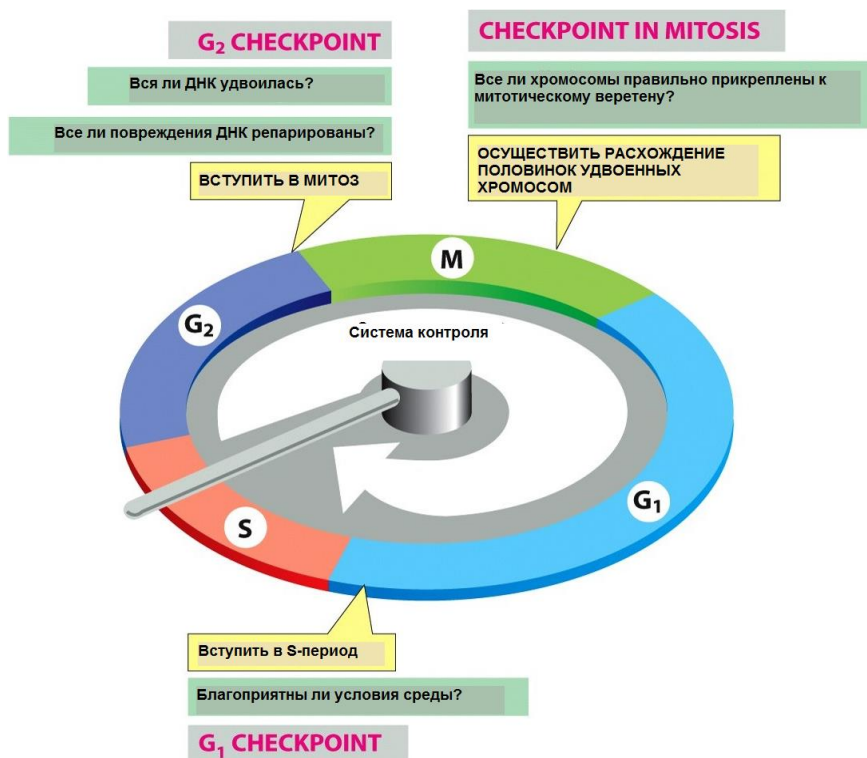


Рис. 8.4. Системы контроля клеточного цикла (по Альберту Б. и др., 2015)

Второй чекпойнт действует в **G₂** и обеспечивает вступление клетки в митоз только после того, как все повреждения ДНК исправлены и синтез ДНК полностью завершён.

Третий чекпойнт действует в период митоза и позволяет убедиться, что удвоенные хромосомы правильно прикреплены к **митотическому веретену**; лишь после этого веретено растаскивает половинки хромосом и распределяет их по двум дочерним клеткам.

Чекпойнт в **G₁** особенно важен — здесь клеточный цикл может регулироваться сигналами других клеток.

Все эукариоты используют сходные механизмы для прохождения клеточного цикла и сходные системы контроля для его регуляции. Белки системы контроля клеточного цикла возникли

более миллиарда лет назад и оказались столь консервативными, что многие из них нормально работают при переносе из человеческих клеток в дрожжевые.

В системе контроля клеточного цикла используются следующие механизмы:

- реакции фосфорилирования с помощью специфических протеинкиназ;
- реакции дефосфорилирования с помощью специфических протеинфосфатаз.

Активность каждой из протеинкиназ, регулирующих клеточный цикл, циклически возрастает и убывает. Например, некоторые из протеинкиназ становятся активными к концу G₁-периода и отвечают за вхождение клетки в S-период; другие протеинкиназы активируются прямо перед M-фазой и отвечают за вхождение клетки в митоз.

За включение и выключение протеинкиназ клеточного цикла в нужное время частично отвечают другие белки контрольной системы – циклины (cyclins) (Альбертс Б. с соавт., 2015). Сами циклины не обладают ферментативной активностью, но они должны связаться с протеинкиназами клеточного цикла, чтобы те приобрели ферментативную активность (рис. 8.5). Поэтому протеинкиназы клеточного цикла называются **циклин-зависимыми протеинкиназами**, или **Cdk**.

Концентрация циклинов, в отличие от концентрации Cdk, циклически меняется в течение клеточного цикла. Циклические изменения циклинов вызывают циклическую сборку и активацию комплексов циклинов – Cdk. Активация этих комплексов, в свою очередь, запускает различные события клеточного цикла – например, вхождение в S-период или M-фазу (рис. 8.6). Повышение и падение концентрации циклинов играют важную роль в регуляции активности Cdk. При этом концентрация циклинов повышается постепенно, а активность комплексов циклинов – Cdk обычно возрастает резко в определённые моменты клеточного цикла.

Чтобы комплекс циклинов – Cdk приобрёл наибольшую активность, Cdk должна быть фосфорилирована по одному

из сайтов специфичной протеинкиназой и дефосфорилирована по другим сайтам специфичной протеинфосфатазой (рис. 8.7).

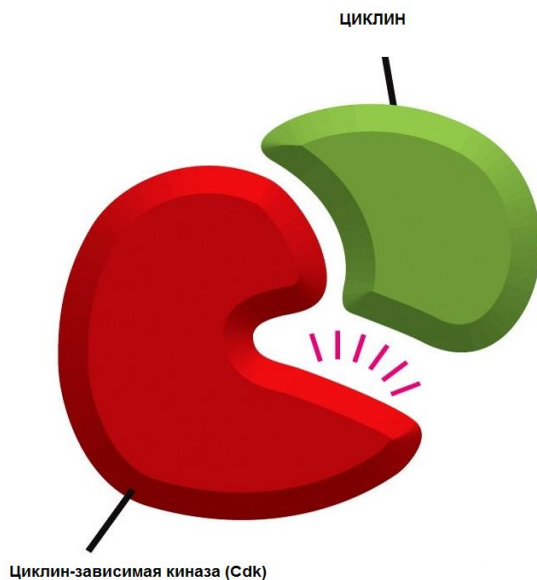


Рис. 8.5. Регуляция клеточного цикла циклин-зависимыми протеинкиназами



Рис. 8.6. Накопление циклинов регулирует активацию Cdk
(по Альбертсу Б. и др., 2015)

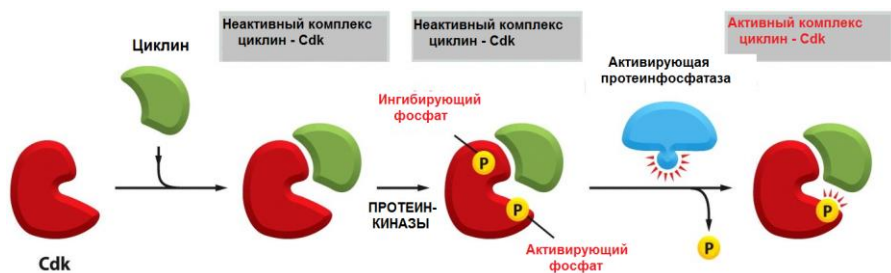


Рис. 8.7. Фосфорилирование и дефосфорилирование Cdk
(по Альберту Б. и др., 2015)

Существует несколько типов циклинов, а у большинства эукариот несколько типов Cdk, участвующих в контроле клеточного цикла. Циклин, который действует в G_2 и запускает вхождение в М-фазу – **М-циклин**, а активный комплекс, который он формирует с Cdk – **М-Cdk**. Другие циклины, **S** и **G_1/S** , связываются с определёнными Cdk в позднем G_1 , образуя, соответственно, **S-Cdk** и **G_1/S -Cdk**, запускающие S-период (рис. 8.8, табл. 8.2).

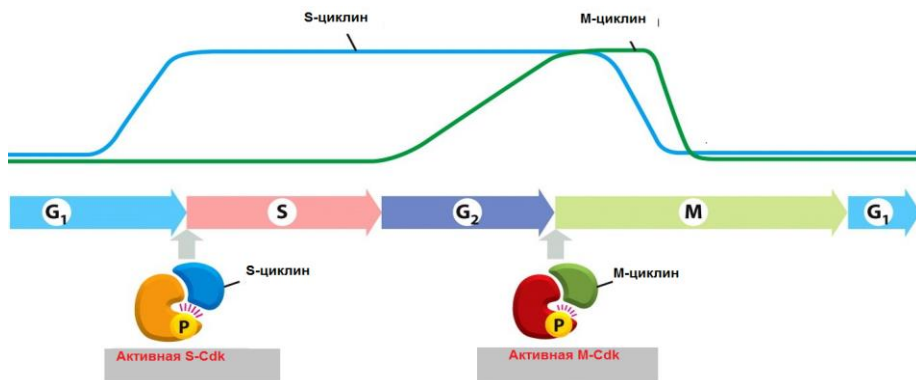


Рис. 8.8. Разные Cdk связываются с различными циклинами, запуская определённые события клеточного цикла (по Альберту Б. и др., 2015)

Таблица 8.2. Главные циклины и Cdk позвоночных

Комплекс циклин – Cdk	Циклин	Cdk
G1-Cdk	D (D1, D2, D3 у млекопитающих)	Cdk4, Cdk6
G1/S-Cdk	E	Cdk2
S-Cdk	A	Cdk2
M-Cdk	B	Cdk1

После фосфорилирования и дефосфорилирования начинают действовать разные Cdk. Каждый из активированных комплексов циклин – Cdk, в свою очередь, фосфорилирует в клетке разные наборы белков-мишеней. В результате каждый из комплексов запускает разные промежуточные этапы клеточного цикла (Альбертс Б. с соавт., 2015). Например, M-Cdk фосфорилирует ключевые белки, вызывающие конденсацию хромосом, распад ядерной оболочки и реорганизацию микротрубочек, приводящую к образованию веретена деления. Эти события знаменуют вступление в митоз.

Концентрация каждого типа циклинов медленно растёт, а затем быстро падает в специфичные моменты клеточного цикла. Это быстрое падение связано с направленной деградацией циклинов. Специфичные ферментные комплексы добавляют цепочки убиквитинов к определённому циклину, а затем он направляется в протеасомы для разрушения (рис. 8.9). В результате быстрое удаление циклина возвращает Cdk в неактивное состояние.

Существуют специфические **белки-ингибиторы Cdk**, которые блокируют сборку или активность одного, или нескольких комплексов циклин – Cdk. Например, определённые белки-ингибиторы Cdk помогают поддерживать эту протеинкиназу в неактивном состоянии во время G₁-периода, таким образом откладывая вхождение в S-фазу. Пауза в этом чекпойнте даёт клетке больше времени для роста или позволяет дождаться благоприятных для деления условий окружающей среды. Как правило, клетки млекопитающих размножаются только в том случае,

когда их деление стимулируют внеклеточные сигнальные вещества – **митогены**, продуцируемые другими клетками. В отсутствие сигналов клеточный цикл останавливается на стадии G_1 -чекпойнта. Если клетка не получает таких сигналов достаточно длительное время, она выходит из клеточного цикла и вступает в неделящееся, покоящееся состояние – G_0 ; в нём клетка может оставаться в течение дней, недель или даже всей жизни организма.

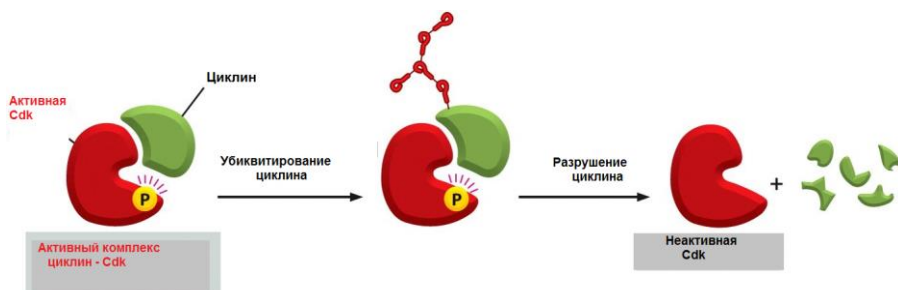


Рис. 8.9. Регуляция активности Cdk путём деградации циклинов
(по Альбертсу Б. и др., 2015)

Длительность клеточных циклов в теле взрослого организма варьирует в основном из-за различий в продолжительности G_0 или G_1 . Определённые типы клеток, такие как клетки печени, делятся в норме только раз в год или раз в два года, в то время как некоторые эпителиальные клетки кишечника делятся чаще, чем два раза в сутки, чтобы постоянно обновлять выстилку кишки. Многие другие клетки занимают промежуточное положение: они могут делиться по мере необходимости, но в норме делятся нечасто. Выход из чекпойнта G_0 или из G_1 требует накопления циклинов G_1 , которое стимулируют митогены (Альбертс Б. с соавт., 2015).

Наиболее радикальное решение, которое может принять система контроля клеточного цикла, – это навсегда вывести из него клетку. Такое решение отличается от временного прекращения делений в ожидании более благоприятных условий и играет особенно важную роль в многоклеточном организме. Например, в организме человека нервные клетки и клетки скелетных

мышц перестают делиться после дифференцировки. Они необратимо переходят в состояние G_0 , в котором система контроля цикла в основном разрушается: многие Cdk и циклины исчезают, а те комплексы циклин – Cdk, которые ещё присутствуют, ингибированы белками-ингибиторами Cdk.

8.2. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии

Количество клеток в ткани регулируется двумя процессами – пролиферацией клеток и «программированной, или физиологической, гибелью клеток» (**апоптозом**). Оба процесса в организме находятся под контролем стимулирующих или ингибирующих факторов, которые присутствуют в клетке в растворимой форме или экспрессируются на поверхности соседних клеток.

Термин «апоптоз» (*греч.* – опадание листьев) был предложен в 1972 г. Керром (J. Kerr). Существует два способа определения апоптоза.

– **Программированная гибель** – активная форма гибели клетки, являющаяся результатом реализации её генетической программы или ответом на внешние сигналы и требующая затрат энергии и синтеза макромолекул *de novo* (биохимический способ определения).

– **Апоптоз** – форма гибели клетки, проявляющаяся в уменьшении её размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого в окружающую среду (морфологический способ определения) (рис. 8.10).

В наиболее общей форме назначение апоптоза (в сочетании с его альтернативой – пролиферацией) состоит в **определении размеров и «архитектуры» организма**, что проявляется:

- 1) в поддержании постоянства численности клеток;
- 2) в определении формы организма и его частей (рис. 8.11, 8.12);
- 3) в обеспечении правильного соотношения численности клеток различных типов;
- 4) в удалении генетически дефектных клеток.

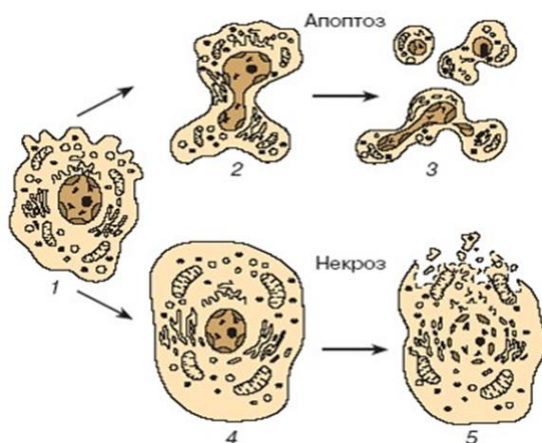


Рис. 8.10. Апоптоз и некроз клеток животных (по Male D., Cooke A., Owen M. et al. *Advanced Immunology*. Mosby, L., 1996)

Примечание: 1 – нормальная клетка; 2 – апоптотное сморщивание клетки с образованием пузырьчатых выростов; 3 – фрагментация клетки с образованием апоптотных везикул; 4 – набухание клетки при некрозе; 5 – некротическая дезинтеграция.

С участием апоптоза проходят морфообразовательные процессы в эмбриогенезе, позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов, индуцированная глюкокортикоидами гибель лимфоцитов, а также гибель клеток при их естественном старении. Усиленный апоптоз ведёт к инволюции органа, что встречается и в физиологических условиях (например, молочная железа в постлактационном периоде), и при патологии (например, при дегенеративных заболеваниях ЦНС). Ярким примером апоптоза является шелушение кожи при солнечном загаре, осенний листопад.

Механизмы развития апоптоза были изучены у нематоды, на определённой стадии, развития которой в строгой очередности погибает 131 соматическая клетка из 1090 имеющихся. Принципиальное значение имеет тот факт, что механизмы апоптоза чрезвычайно консервативны и сохраняют свои фундаментальные черты у весьма далеких в эволюционном отношении организмов.

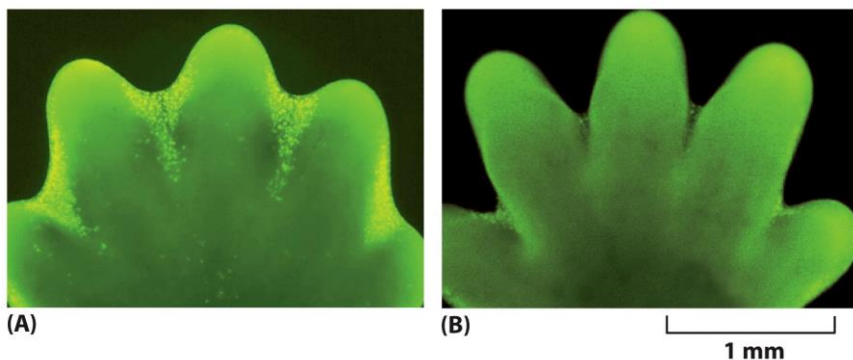


Рис. 8.11. Апоптоз клеток в период эмбрионального развития
(по W. Wood et al., *Development*, 127: 5245–5252, 2000)

Примечание: А – лапа мышиного эмбриона окрашена с помощью красителя, который специфически метит вступающие в апоптоз клетки (ярко-зелёные точки между развивающимися пальцами); В – эта фотография сделана днём позже. Видно, что за счёт клеточной смерти удаляются ткани, расположенные между развивающимися пальцами. Здесь апоптотических клеток уже почти не осталось.

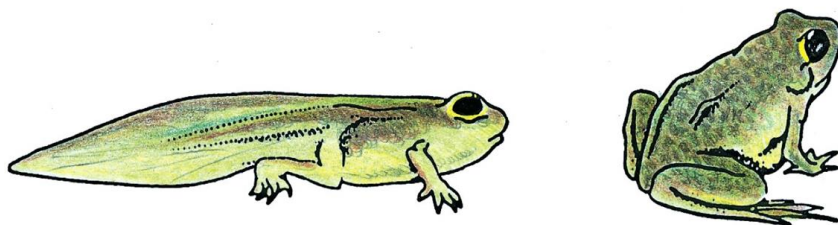


Рис. 8.12. Апоптоз клеток хвоста лягушки

Примечание: когда головастики превращаются в лягушку, индуцируется апоптоз клеток хвоста. Все изменения, происходящие при метаморфозе, в том числе апоптоз клеток хвоста головастика, индуцируются повышением уровня тиреоидного гормона крови.

Апоптоз запускается внешними сигналами, которые используют различные сигнальные пути.

Основные механизмы индукции апоптоза можно условно разделить на три группы в зависимости от «точки приложения»

фактора, инициирующего развитие апоптоза: **мембранные** (рецептор-опосредованные), **митохондриальные** и **ядерные**.

1) Мембранные или рецептор-опосредованные факторы включают реализацию апоптогенного сигнала через специальные рецепторы, С-концевой внутриклеточный домен которых (так называемый домен смерти) способен инициировать дальнейшие этапы развития апоптоза (существует 40 рецепторов для реализации сигнала к апоптозу) (рис. 8.13). Прежде всего, к ним относятся рецепторы семейства фактора некроза опухоли, например, рецептор TNF, цитоплазматические рецепторы глюкокортикоидов, эстрогенов и других гормонов. Связывание рецептора с соответствующими лигандами – TNF, гормонами – приводит к взаимодействию домена смерти (DD) с эффекторным доменом смерти (DED), способным активировать специфические ферменты цистеиновые протеиназы – **каспазы**. Мембранные механизмы апоптоза имеют наибольшее значение в устранении клеток в процессе иммунного ответа, элиминации самих иммуночитов, сыгравших свою роль, а также при уничтожении трансформированных клеток.

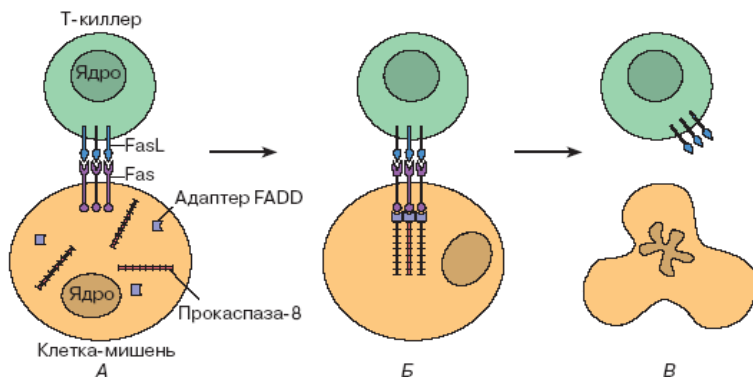


Рис. 8.13. Рецептор-опосредованный путь реализации апоптоза
(по Самуилову В. А., 2001)

Примечание: в плазматической мембране киллера молекулы FasL находятся в форме тримеров (**А**). Тримеры FasL связываются с молекулами Fas-рецептора клетки-мишени. Затем молекулы Fas связывают

цитоплазматический адаптерный белок FADD (Fas-associated death domain – связанный с Fas домен смерти) – (**Б**). Адаптер FADD содержит домен DED, который взаимодействует с DED-доменами продомена прокаспазы-8. Формируются агрегаты FasL-Fas-FADD-прокаспазы-8 – сигнальные комплексы, индуцирующие смерть (death-inducing signaling complex – DISC). Будучи в свободной, мономерной форме, прокаспазы, концентрация которых в клетке ничтожна, находясь в латентном состоянии, хотя и обладают незначительной протеолитической активностью, составляющей 1–2% активности зрелой каспазы. При концентрировании на сигнальных комплексах DISC прокаспазы активируются через механизм протеолитического само- и перекрестного расщепления (ауто- и транс-процессинга). Происходит самоактивация молекул каспазы, образуется каспаза-8. Каспаза-8 активирует каспазу второго эшелона (эффекторную каспазу): из прокаспазы-3 образуется каспаза-3, после чего процесс, запущенный программой смерти, становится необратимым. Каспаза-3 активирует другие протеазы семейства каспаз, инактивирует фактор фрагментации ДНК, ведет к необратимому распаду ДНК на нуклеосомальные фрагменты, к распаду ядра и образованию апоптотических везикул (**В**).

2) Митохондриальные механизмы апоптоза (рис. 8.14, 8.15). Внутри митохондрий содержится ряд белков (проапоптотические факторы), попадание которых в цитоплазму приводит к запуску апоптоза – например, цитохром **c**, эндонуклеаза **G**. Существует система белков, обеспечивающих контроль за выходом из митохондрий проапоптотических факторов. Эта система представлена белками семейства **Bcl-2**. Среди них выделяются белки с прямо противоположными функциями – антиапоптотические (bcl-2, bcl-XL и др.) и проапоптотические (bax, bak, bad, bid и др.). Именно равновесие между этими белками определяет «судьбу» клетки. Схематически работу этой системы можно представить следующим образом: bcl-2 предотвращает выход цитохрома **c** из митохондрий, а деградация bcl-2 приводит к попаданию в цитоплазму цитохрома **c** и к активации фактора Араф (апоптозоактивирующий фактор). Затем апоптотический сигнал передаётся на цистеиновые протеиназы.

Митохондрии являются своеобразными сенсорами кислородного обеспечения клеток, и описанные механизмы включаются при различных гипоксических состояниях, нарушении энергообеспечения клетки в целом.

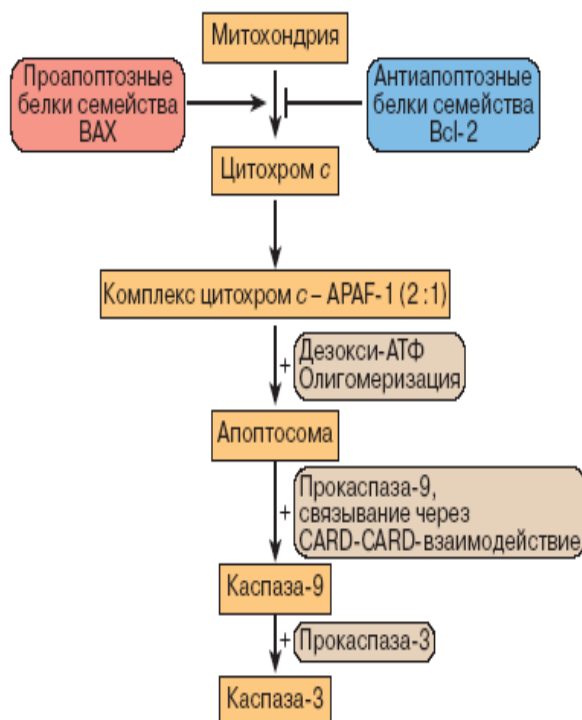


Рис. 8.14. Митохондриальный путь реализации апоптоза
(по Самуилову В. Д., 2001)

Примечание: АРАФ-1 играет роль арматуры, на которой происходит активация каспазы-9. Он электростатически связывает две молекулы цитохрома *c*. Затем комплексы АРАФ-1 и цитохрома *c* при помощи механизма, зависящего от гидролиза дезокси-АТФ, олигомеризуются. Так образуется конструкция, называемая апоптосомой, с молекулярной массой более 1300 кДа, в составе которой не менее 8 субъединиц АРАФ-1. Благодаря CARD-CARD-взаимодействию с АРАФ-1 в эквимолярном соотношении связывается прокаспаса-9. Пространственное

сближение молекул прокаспазы-9 на мультимерной арматуре из цитохром *c*-APAF-1-комплексов приводит к межмолекулярному протеолитическому процессингу прокаспазы-9 с образованием активной каспазы-9. Кроме того, прокаспаса-9, связавшись с апоптосомой, может принять конформацию, которая приводит к самоактивации в результате внутримолекулярного процессинга. Каспаза-9 затем расщепляет и активирует прокаспазу-3.

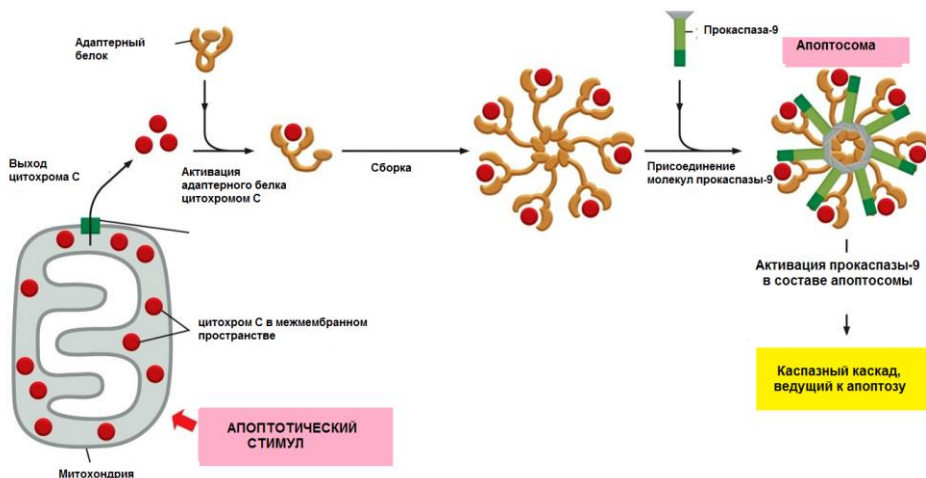


Рис. 8.15. Митохондриальный путь реализации апоптоза
(по Альберту Б. и др., 2015)

Примечание: когда апоптотический стимул активирует Вах или Вак, они встраиваются в наружную мембрану митохондрий. Это приводит к выходу цитохрома *c* в цитоплазму. Цитохром *c* выходит в цитозоль из межмембранного пространства митохондрий с другими белками. Затем цитохром *c* связывается с адаптерным белком, вызывая его сборку в семилучевой комплекс. Комплекс рекрутирует семь молекул прокаспазы-9, формируя структуру, называемую апоптосомой. В составе апоптосомы прокаспаса-9 активируется и активирует другие прокаспазы цитозоля; это ведёт к запуску каспазного каскада и апоптозу.

3) Ядерные механизмы апоптоза включаются в результате повреждения генетического материала. Огромное значение в реализации апоптотического сигнала в данном случае играет белок *p53* (протеин с молекулярной 53 kDa), который способен

активироваться в ответ на повреждение ДНК. Являясь фактором транскрипции, этот протеин индуцирует экспрессию генов проапоптотических факторов (bax), рецепторов семейства TNF и ингибиторов циклинзависимых протеинкиназ (p21, p27), что одновременно активирует апоптоз и блокирует вхождение клетки в следующую фазу клеточного цикла. Белок p53 также активирует цистеиновые протеиназы.

Таким образом, ранние этапы передачи внутриклеточного сигнала, приводящего к развитию апоптоза, различны. Эти различные пути приводят к одинаковым результатам, обязательными компонентами которых являются активация каспаз и развитие апоптоза.

Каспазы представляют собой ферменты цистеиновые протеиназы, которые специфичны по отношению к участкам полипептидных молекул, содержащих остатки аспарагиновой кислоты. В покоящейся клетке присутствуют неактивные молекулы – предшественники каспаз – прокаспазы, содержащие ингибиторный домен. При активации этот домен отщепляется и образуется активный фермент каспаза (рис. 8.16). Каспазы разделяют на две группы – **инициаторные каспазы** (каспазы 8, 9) и **эффекторные каспазы** (каспазы 3, 6, 7). Разделение каспаз на указанные группы отражает каскадный характер их функционирования (рис. 8.17).

Индукторы апоптоза приводят к активации инициаторных каспаз 8 и 9, функция которых состоит в активации эффекторных каспаз, имеющих около 40 различных молекул-мишеней в ядре, митохондриях и цитоплазме. К числу ядерных мишеней каспаз относятся: ферменты связанные с репарацией ДНК, белок Rb, принимающий участие в контроле клеточного цикла, топоизомераза I и другие белки. Действуя на ядерные молекулы, каспазы подавляют процессы репарации, репликации ДНК. Кроме того, каспазы разрушают клеточные структуры (например, ядерную пластину, образованную белками ламинами, структуры цитоскелета). Это приводит к характерным изменениям формы клеток, нарушению их подвижности, ослаблению адгезии и взаимосвязей с другими клетками.

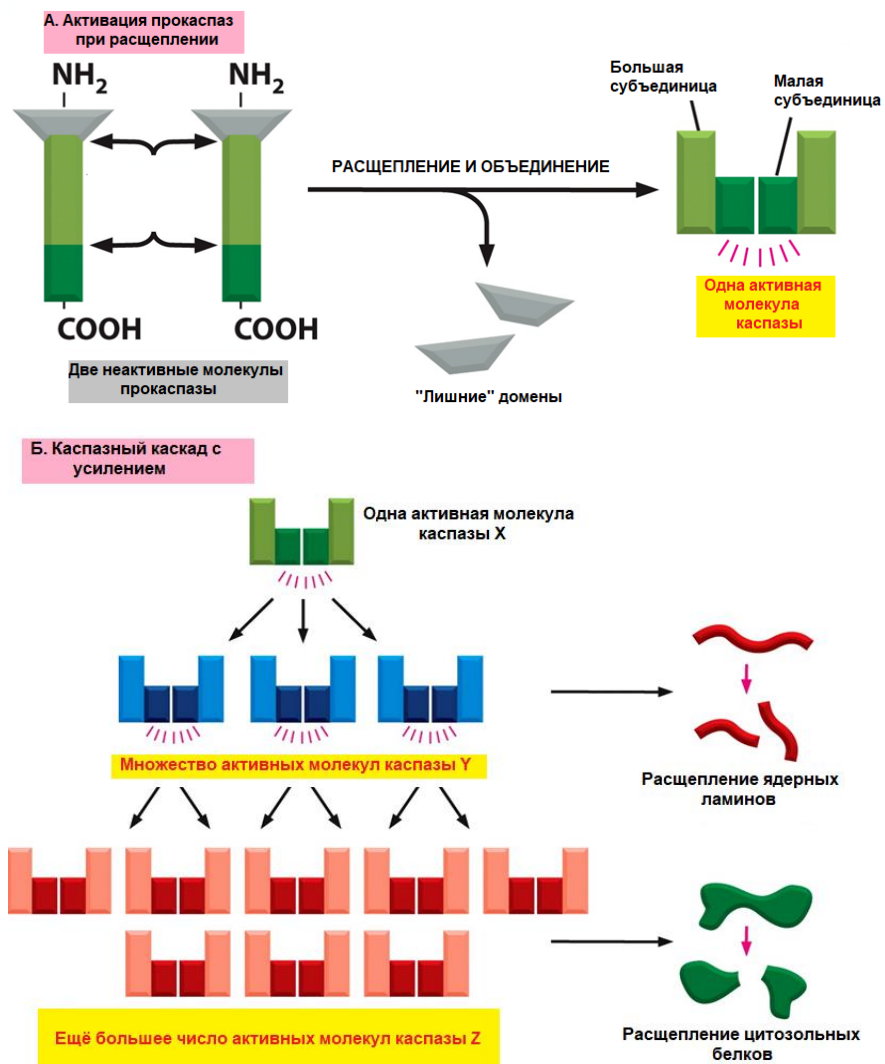


Рис. 8.16. Протеолитический каскад активации каспаз
(по Альбертсу Б. и др., 2015)

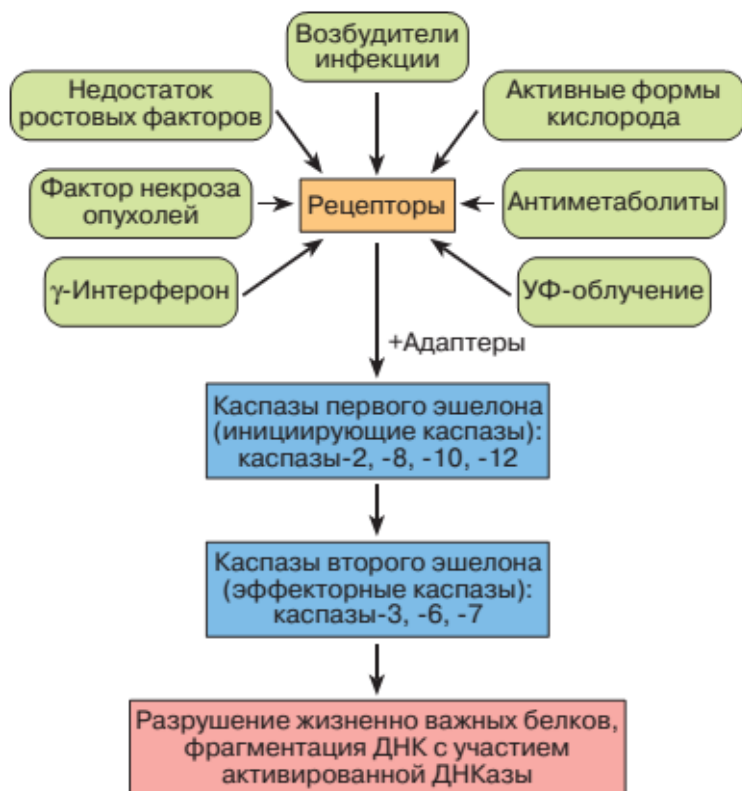


Рис. 8.17. Схематическая модель программируемой клеточной смерти у животных и человека (по Самуилову В. Д., 2001)

Таким образом, к гибели клетки приводят различные нарушения, проявляющиеся при развитии апоптоза. Среди них основными являются процессы, приводящие к деградации жизненно важных молекул и структур клетки, а также исчерпание её энергетических ресурсов. Важно, что какой бы фактор ни индуцировал развитие апоптоза, в любом случае это заканчивается деградацией генетического материала, что предотвращает возможность передачи изменений генетического информации.

8.3. Аутофагия. Некроз

Процесс **аутофагии** (Schweichel, Merker, 1973) имеет более сложный биологический смысл. Механизм, который вовлекается в процессы аутофагии, функционирует в нормальной клетке как способ обновления органелл. Основу этого процесса составляют события, аналогичные таковым при фагоцитозе: мечение подлежащей удалению части клетки, обёртывание мембраной с образованием аутофагосомы и последующее слияние с лизосомой с формированием аутофаголизосомы (рис. 8.18). Под влиянием стрессорных факторов указанные явления могут значительно активизироваться.

Аутофагия может быть индуцирована активными формами кислорода, ионизирующей радиацией, некоторыми противоопухолевыми препаратами, прекращением действия факторов роста и особенно снижением содержания аминокислот и АТФ в цитозоле клетки. В трёх последних случаях аутофагия служит компенсаторным механизмом, поставляющим питание клетке из эндогенных источников, тогда как в других ситуациях её биологическая роль связана с удалением повреждённых структур клетки.

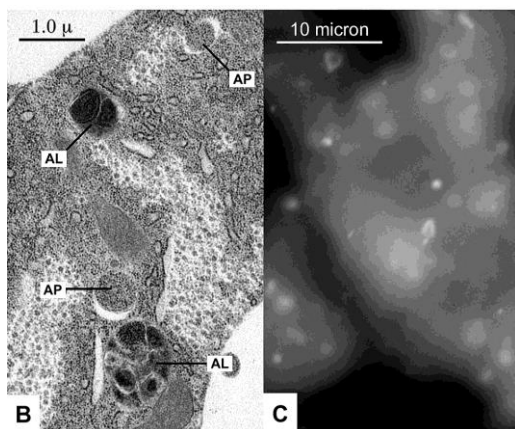


Рис. 8.18. Схема образования аутофагосомы

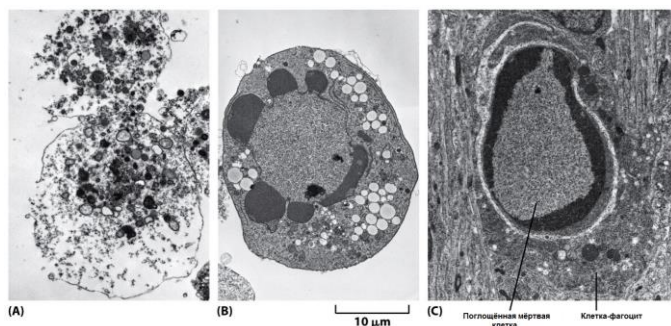
Примечание: изолирующая мембрана окружает клеточные структуры и создаёт аутофагосому (AP), которая сливается с лизосомой

и создаёт аутолизосому (AL). **В.** Электронная микрофотография аутофагосомных структур в жировом теле личинки дрозофилы. **С.** Помеченные флуоресцентной меткой аутофагосомы в клетках печени голодающей мыши.

Таблица 8.3. Аналогии аутофагии на различных уровнях организации живого

Биосистема	Процесс	Примеры
Клетка	Аутофагия	Митофагия (утилизация митохондрий) Пексофагия (утилизация пероксисом) Рибофагия (утилизация рибосом) Ретикулофагия (утилизация эндоплазматического ретикулума)
Организм	Спячка, голодание	Апоптоз (утилизация клеток) Потребление собственных тканей (жировая ткань) Оофагия (эмбрионы акулы поедают менее развитых собратьев)
Экосистемы и популяции	Трофические цепи	Хищник – жертва Травоядные животные – растения

Некроз, отличается от апоптоза тем, что он развивается в результате повреждения клеточной мембраны химическими агентами или физическими факторами. При некрозе повреждённые клетки набухают, а затем лизируются, при этом часто развивается воспалительный процесс (рис. 8.19).



*Рис. 8.19. Гибель клеток при некрозе (А) и гибели клеток при апоптозе (В и С)
(по Альбертсу Б. и др., 2015)*

Примечание: клетки на фото **А** и **В** погибли в культуральной чашке, а клетка на фото **С** погибла внутри ткани развивающегося организма и была проглочена фагоцитом.

В последнее время стали накапливаться данные, свидетельствующие о близости, а не о противоположности некротической и апоптотической форм гибели «нежелательных» клеток (Проскурjakов С. Я. с соавт., 2002):

1) самые различные воздействия – тепло, ионизирующая радиация, патогены, цитокины вызывают в одной и той же клеточной популяции обе формы гибели;

2) антиапоптотические механизмы, например, Bcl-2 способны защищать клетки и от некротической, и от апоптотической деструкции;

3) биохимическое вмешательство в сигнальный и реализующий аппарат программируемой гибели клетки может изменять выбор формы клеточной гибели;

4) при некрозе, так же, как и при апоптозе, ядро может играть пассивную роль.

С развитием цитологических методов стало ясно, что некротическая гибель является нормальным элементом жизнедеятельности организма (табл. 8.4) – эмбриогенеза, оогенеза и клеточного обновления (Проскурjakов С. Я. с соавт., 2002).

Эти данные показывают, что некроз, как и апоптоз, является одной из форм программируемой клеточной гибели. Однако для целостного организма физиологические последствия апоптоза и некроза весьма различны (рис. 8.19). В первом случае, все компоненты цитоплазмы и ядро изолируются неповреждённой мембраной, а затем фагоцитами вместе с мембранно-связанными маркерами типа «съешь меня» (фосфатидилсерин и другие). Иными словами, элиминация клетки, реализовавшей апоптотическую программу, остаётся практически «незамеченной» организмом. Во втором случае, изливающееся в межклеточное пространство цитоплазматическое содержимое провоцирует воспалительную реакцию, то есть активацию резидентных фагоцитов и привлечение в зону некроза лейкоцитов. Нарушение в организме оптимального баланса между апоптотической и некротической формой программируемой гибели клеток является существенным фактором в развитии многих патофизиологических процессов, связанных с воспалением (диабет, артрозы) или старением (атеросклероз, нейродегенеративные заболевания).

*Таблица 8.4. Некротическая гибель в физиологических
и патофизиологических процессах (по Проскурякову С. Я. и др., 2002)*

Процессы	Объекты/стимулы
Эмбриогенез	Нейроны
Оогенез	Фолликулы
Клеточное обновление	Эпителий толстого кишечника Эпителий тонкого кишечника
Инфицирование	Лимфоциты (HIV-1) Печень мышей (<i>Micobacterium avium</i>) Нейтрофилы (<i>Shigella flexneri</i>) Фибробласты (<i>Trypanosoma cruzi</i>)
Болезни ЦНС	Болезнь Альцгеймера Болезнь Крейцфельда – Жакоба Эпилепсия
Воспалительные заболевания	Диабет Синдром системного воспаления Цирроз печени
Ишемия	Мозг Сердце Почки

Задания для внеаудиторной работы

- 1.** Клеточный цикл и способы деления клетки.
- 2.** Основные законы и регуляция клеточного цикла.
- 3.** Апоптоз – программируемая гибель клеток. Биологическая роль апоптоза.
- 4.** Аутофагия. Пусковые факторы, механизмы и биологическая роль.
- 5.** Некроз – активная форма программируемой клеточной гибели.

Основные термины и понятия

Составьте словарь в тетради для практических работ.

Апоптоз

Апоптозные тельца

Аутофагия

Каспаза

Киназы

Клеточный цикл
Некроз
Некроз
Циклин-зависимые киназы
Циклины
Чекпойнт

Задания для аудиторной работы

Тема. Молекулярные механизмы регуляция клеточного цикла. Программируемая клеточная гибель.

Решите задачи.

Задача 1. Заполните пропуски в следующих утверждениях.

А. Во время _____ содержимое ядра конденсируется с образованием видимых в микроскоп хромосом.

Б. В процессе _____ клетка разделяется на две дочерние клетки.

В. Легкодоступные для наблюдения события митоза и цитокинеза вместе занимают лишь короткий период клеточного цикла, называемый _____.

Г. Интервал между последовательными митозами называется _____.

Д. Период клеточного цикла, предназначенный для синтеза ДНК, называется _____.

Е. Цитоплазма клеток в фазе М содержит фактор, называемый _____; он может ввести ядро в состояние митоза на любой фазе клеточного цикла.

Ж. Дробящиеся яйца моллюсков, лягушек и морских ежей содержат белок _____, концентрация которого сначала равномерно повышается от нуля до некой величины, а с середины фазы **М** внезапно падает опять до нуля.

Задача 2. Какова последовательность следующих событий при делении клетки:

А. Анафаза

Б. Метафаза

В. Прометафаза

Г. Телофаза

Д. Лунная фаза

Е. Митоз

Ж. Профаза

Где в этой последовательности располагается цитокинез?

Задача 3. При злокачественных опухолях желудка и кишечника обнаружена мутация в гене, кодирующем белок **Bax**. Какова последовательность событий, приводящих к нарушению регуляции апоптоза в этих клетках?

Задача 4. Какова роль вирусов в развитии заболеваний с точки зрения регуляции апоптоза клеток?

Задача 5. Клеточный цикл зависит от взаимодействия двух типов регуляторных белков – киназ и циклинов. Перечислите функции каждого из этих типов, каковы механизмы их взаимодействия при делении клеток?

Задача 6. В таблице сравните особенности апоптоза в зависимости от различных путей его реализации: сигналы, последовательность реакций и процессов, ключевые белки.

Задача 7. Составьте таблицу «Каспазы», в которой укажите: особенности структуры, функции, субстраты, на которые они действуют.

Задача 8. Решите тест.

А. Программируемая гибель клетки называется термином _____.

Б. Цитоплазматические протеазы десяти разных видов, способные активировать друг друга, а также активироваться под воздействием протеазы митохондрий, выходящей в цитоплазму в начале апоптоза, называют общим термином _____.

В. Неконтролируемый процесс гибели клетки называют _____.

Г. В ходе контролируемого самоуничтожения клетки образуются _____ тельца.

Вопросы для экзамена

1. Важнейшие достижения молекулярной биологии. Доказательство генетической роли нуклеиновых кислот. Современные теоретические и практические задачи молекулярной биологии.
2. Метилирование цитозина в ДНК эукариот. Возможные функции метилирования ДНК. Метилирование ДНК, связанное с репарацией ошибок репликации.
3. Геном. Классификация генов в геноме.
4. Строение и функции ДНК.
5. Сравнительная характеристика ДНК и РНК.
6. Основные реparable повреждения в ДНК – апуринизация, дезаминирование, тимино-ва димеры.
7. Структура геномов про- и эукариот. «Избыточность» эукариотического генома. Компактность генома эукариот.
8. Принципы устранения повреждений. Удаление тимино-ва димеров. Удаление остатков урацила.
9. Структура хроматина. Полиморфизм ДНК.
10. Транскрипция и структура оперона.
11. Методы молекулярной биологии. Основы генетической инженерии: рестрикционный анализ, определение нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК.
12. Регуляция транскрипции у прокариот.
13. Особенности генома митохондрий, механизм наследования генов органелл.
14. Транскрипция и структура транскрипта.
15. Процессинг РНК – кеппирование, полиаденилирование. Сплайсинг и его виды. Автосплайсинг. Редактирование.
16. Регуляция транскрипции у эукариот.
17. Клеточный цикл и деление клетки. Молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла.
18. Структура рибосом.
19. Теломеры. Механизм действия теломеразы. Теломераза и старение.
20. Эволюция геномов.
21. Репликация различных ДНК и её регуляция.
22. Рибозимы. Обратная транскрипция.

- 23. Трансляция – синтез полипептидов на рибосоме.
- 25. Апоптоз: пусковые факторы и биологическая роль.
- 26. Межклеточные сигнальные вещества. Пути передачи сигнала в клетку.
- 27. Подвижные генетические элементы. IS-элементы, транспозоны, ретротранспозоны.
- 28. Особенности структуры и функции мРНК, тРНК и рРНК.
- 29. Фолдинг белка.
- 30. Неядерные геномы. ДНК митохондрий и хлоропластов.

Список цитируемой литературы

1. Альбертс Б., Брей Д., Хопкин К. и др. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, К. Хопкин и др.; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 768 С.
2. Багоцкий С. В. Физик, перевернувший биологию / С. В. Багоцкий // Химия и жизнь. – 2016. – № 6. – С. 50–53.
3. Бурмистрова О. А., Гольцов А. Ю., Абрамова Л. И., Каледа В. Г., Орлова В. А., Рогаев Е. И. МикроРНК при пизофрении: генетический анализ и экспрессия гена *miR-130b* (22q11) / О. А. Бурмистрова, А. Ю. Гольцов, Л. И. Абрамова, В. Г. Каледа, В. А. Орлова, Е. И. Рогаев // Биохимия. – 2007. – Том 72. – С. 860–866.
4. Гоглева А. А., Артамонова И. И. CRISPR-системы: механизм действия и применения / А. А. Гоглева, И. И. Артамонова // Природа. – 2014. – № 7. – С. 3–9.
5. Гоглева А. А., Артамонова И. И. CRISPR-системы: структура и гипотетические функции / А. А. Гоглева, И. И. Артамонова // Природа. – 2014. – № 6. – С. 16–21.
6. Дерябин Д. Г. Функциональная морфология клетки: Учебное пособие / Д. Г. Дерябин. – М.: КДУ, 2005. – 320 С.
7. Джагаров Д. Э. Умные ножницы для ДНК / Д. Э. Джагаров // Химия и жизнь. – 2014. – № 7. – С. 6–9.
8. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции: учебник для студентов высших учебных заведений / С. Г. Инге-Вечтомов. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2015. – 720 С.
9. Котельников Р. Н., Шпиз С. Г., Калмыкова А. И., Гвоздев В. А. Белки, связывающие РНК, в процессах РНК-интерференции / Р. Н. Котельников, С. Г. Шпиз, А. И. Калмыкова, В. А. Гвоздев // Молекулярная биология. – 2006. – Том 40. – С. 595–608.
10. Кребс Дж., Голдштейн Э., Килпатрик С. Гены по Льюису / Дж. Кребс, Э. Голдштейн, С. Килпатрик: пер. 10-го англ. изд. – М.: Лаборатория знаний, 2017. – 919 С.
11. Лейн Н. Лестница жизни: десять величайших изобретений эволюции / Н. Лейн: пер. с англ. П. Петрова. – Москва: АСТ: CORPUS, 2013. – 528 С.

12. Марков А. Рождение сложности. Эволюционная биология сегодня: неожиданные открытия и новые вопросы / А. Марков. – Москва: Из-во АСТ: CORPUS, 2015. – 527 С.

13. Марков А., Наймарк Е. Эволюция. Классические идеи в свете новых открытий / А. Марков, Е. Наймарк. – Москва: АСТ: CORPUS, 2017. – 656 С.

14. Овчинников Л. П. Что и как закодировано в мРНК / Л. П. Овчинников // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4. – С. 10–18.

15. Проскуряков С. Я., Габай В. Л., Коноплинников А. Г. Некроз – активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели / С. Я. Проскуряков, В. Л. Габай, А. Г. Коноплинников // Биохимия. – 2002. – Т. 67, Вып. 4. – С. 467–491.

16. Рогаев Е. И., Боринская С. А., Исламгулов Д. В., Григоренко А. П. МикроРНК человека в норме и патологии / Е. И. Рогаев, С. А. Боринская, Д. В. Исламгулов, А. П. Григоренко // Молекулярная биология. – 2008. – Том 42, № 5. – С. 751–764.

17. Савицкая Е. Е., Мушарова О. С., Северинов К. В. Разнообразие механизмов CRISPR-Cas-систем адаптивного иммунитета прокариот и возможности их применения в биотехнологии / Е. Е. Савицкая, О. С. Мушарова, К. В. Северинов // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 7. – С. 870–880.

18. Самуилов В. Д. Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных / В. Д. Самуилов // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Том 7, № 10. – С. 18–25.

19. Спирин А. С. Молекулярная биология: рибосомы и биосинтез белка / А. С. Спирин. – М.: Издательский центр «Академия», 2011. – 496 С.

20. Фаворова О. О. Строение транспортных РНК и их функция на первом (предрибосомном) этапе биосинтеза белка / О. О. Фаворова // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 11. – С. 71–77.

21. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию / Ю. С. Ченцов. – М.: ИКЦ «Академия», 2004. – 320 С.

22. Шноль С. Э. «Самое важное на свете – сомнение»: лекция Симона Шноля об истории науки / С. Э. Шноль // Индикатор. Интернет-издание, 2016.

23. Шноль С. Э. Герои, злодеи, конформисты отечественной науки / С. Э. Шноль. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2012. – 720 С.
24. Baltimore D., Girard M., Darnell J. E. Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles // *Virology*. – 1966. – Vol. 29. – P. 179–189.
25. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. 2007. – V. 315, № 5819. – P. 1709–1712.
26. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // *Microbiology*. – 2005. – № 151. – P. 2551–2561.
27. Cech T. R., Golden B. L. Building a catalytic active site using only RNA // In: *The RNA World*, Second Edition (eds. Gesteland R. F., Cech T. R., Atkins J. F.). – Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. – 1999. – P. 321–347.
28. Charpentier E., Doudna J. A. Biotechnology: Rewriting a genome // *Nature*. – 2013. – V. 495. – P. 50–51.
29. Datsenko K., Pougach K., Tikhonov A. et al. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR / Cas adaptive bacterial immunity system // *Nat. Commun.* – 2012. – V. 3. doi:10.1038/ncomms1937.
30. Doyle S., Genest O., Wickner S. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines // *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2013. – № 14. – P. 617–629.
31. Gill S. R. et al. Metagenomic analysis of the Human distal gut microbiome // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 1355–1359.
32. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // *BMC Bioinformatics*. – 2007. – № 8. – P. 172.
33. Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNA // *Science*. – 2008. – V. 319. – P. 1785–1786.
34. Jansen R., Embden J. D., Gaastra W., Schouls L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // *Mol. Microbiol.* – 2002. – № 43. – P. 1565–1575.

35. Jore M. M., Lundgren M., van Duijn E. et al. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2011. – V. 18, № 5. – P. 529–536.
36. Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., et al. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing // *Cell.* – 2007. – V. 129. – P. 1401–1414.
37. Lillestøl R. K., Shah S., Brügger K. et al. CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V. 72, № 1. – P. 259–272.
38. Lim L. P., Lau N. C., Garrett-Engele P. Grimson A., Schelter J. M., Castle J., Bartel D. P., Linsley P. S., Johnson J. M. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs // *Nature.* – 2005. – V. 433. – P. 769–773.
39. Martin K. C., Barad M., Kandel E. R. Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2000. – V. 10. – P. 587–592.
40. Mojica F. J. M., Diez-Villasecor C., Garcia-Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *J. Mol. Evol.* – 2005. – V. 60, № 2. – P. 174–182.
41. Nakabachi A., Yamashita A., Toh H. et al. The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella* // *Science.* – 2006. – Vol. 314. – P. 267.
42. Nakata A. et al., 1989 / A. Nakata // *Journal of Bacteriology.* – 1989. – Vol. 171. – P. 3553–3556.
43. Newton I. L. G., Woyke T., Auchtung T. A. et al. The *Calypotoga magnifica* chemoautotrophic symbiont genome // *Science.* – 2007. – Vol. 315. – P. 998–1000.
44. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA and provide additional tools for evolutionary studies // *Microbiology.* – 2005. – № 151. – P. 653–663.

45. Schratt G. M., Tuebing F., Nigh E. A. Kane C. G., Sabatini M. E., Kiebler M., Greenberg M. E. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development // *Nature*. – 2006. – V. 439. – P. 283–289.

46. Sempere L. F., Freemantle S., Pitha-Rowe I., Moss E., Dmitrovsky E., Ambros V. 2004 Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation // *Genome Biol.* – 2004. – V. 5. – P. R13.

47. Sorek R., Kunin V., Huguenbultz P. CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance phages in bacteria and archaea // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – № 6. – P. 181–186.

48. Spiegelman S., Haruna I. A rational for an analysis of RNA replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1966. – Vol. 55. – P. 1539–1554.

49. Tang T-H., Polacek N., Zywicki M. et al. Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* // *Mol. Microbiol.* – 2005. – № 55. – P. 469–481.

Оглавление

Предисловие.....	3
Глава 1. Структура и функции нуклеиновых кислот.....	4
1.1. Основные достижения молекулярной биологии. Доказательства генетической роли нуклеиновых кислот.....	4
1.2. Структура и функции нуклеиновых кислот.....	11
Глава 2. Методы молекулярной биологии и генной инженерии.....	34
2.1. Рестрикционный анализ.....	35
2.2. Клонирование.....	40
2.3. Определение последовательности нуклеотидов ДНК (секвенирование).....	53
2.4. Технологии CRISPR-Cas9.....	56
Глава 3. Структура геномов прокариот и эукариот.....	69
3.1. Функциональные отделы и свойства генома.....	70
3.2. «Избыточность» генома эукариот.....	72
3.3. Компактность генома эукариот.....	74
3.4. Классификация генов в геноме.....	82
3.5. Геном прокариот.....	84
3.6. Геном митохондрий.....	85
3.7. Симбиотическая теория происхождения митохондрий.....	87
Глава 4. Репликация различных ДНК и её регуляция.....	95
4.1. Принципы репликации ДНК.....	95
4.2. Репликация различных ДНК и её регуляция.....	101
4.3. Теломерные последовательности ДНК.....	109
4.4. Репарация повреждений ДНК.....	114

Глава 5. Транскрипция. Регуляция транскрипции у прокариот и эукариот. Процессинг	132
5.1. Общая характеристика транскрипции	132
5.2. Этапы транскрипции	137
5.3. Регуляция транскрипции у прокариот	140
5.4. Регуляция транскрипции у эукариот.....	145
5.5. Процессинг РНК.....	150
Глава 6. Трансляция. Фолдинг белков	173
6.1. Генетический код.....	173
6.2. Строение рибосом.....	178
6.3. Трансляция	180
6.4. Фолдинг белков	185
Глава 7. Межмолекулярные взаимодействия и их роль в функционировании живых систем	197
7.1. Сигнальные молекулы.....	197
7.2. Механизмы внутриклеточной сигнализации.....	221
Глава 8. Молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла. Программируемая клеточная гибель	232
8.1. Молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла	232
8.2. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии	243
8.3. Аутофагия. Некроз	253
Вопросы для экзамена.....	259
Список цитируемой литературы.....	261

Анна Геннадьевна Жукова
Наталья Викторовна Кизиченко
Лариса Геннадьевна Горохова

Молекулярная биология

Учебник с упражнениями и задачами

Ответственный редактор *А. Иванова*
Верстальщик *А. Сычева*

Издательство «Директ-Медиа»
117342, Москва, ул. Обручева, 34/63, стр. 1
Тел/факс + 7 (495) 334–72–11
E-mail: manager@directmedia.ru
www.biblioclub.ru
www.directmedia.ru

Отпечатано в ООО «ПАК ХАУС»
142172, г. Москва, г. Щербинка,
ул. Космонавтов, д.16