

# 1. ГЕНЕТИКА КАК НАУКА. ПРЕДМЕТ, ПРОБЛЕМЫ, ЗАДАЧИ, МЕТОДЫ ГЕНЕТИКИ. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ГЕНЕТИКИ.

## Предмет.

Генетика изучает наследственность и изменчивость. Слово «генетика» придумал У. Бэтсон (1906), Он же определили науку как физиологию наследственности и изменчивости. Почему люди разнообразны, почему так похожи друг на друга как представители одного вида или как родственники? Ответ на эти вопросы дает генетика, и ответ – одинаков, потому, что каждый человек получил наследственные задатки – гены от своих родителей. Благодаря механизму наследования каждый индивидуум имеет черты сходства с предками.

## Этапы развития.

Первые представления о наследственности содержатся в трудах ученых античной эпохи. Уже к 5 в. до н. э. сформировались две основные теории: прямого и непрямого наследования признаков. Сторонниками прямого наследования был Гиппократ, который считал, что репродуктивный материал собирается из всех частей тела, и таким образом, все органы тела непосредственно влияют на признаки потомства. По мнению Гиппократа, здоровые части тела поставляют здоровый репродуктивный материал, а нездоровые – нездоровый, и в резу-те признаки, приобретаемые в течение жизни, должны наследоваться. Аристотель был сторонником непрямого наследования. Он считал, что репродуктивный материал вовсе не поступает из всех частей тела, а производится из питательных ве-в, по своей природе, предназначенных для построения разных частей тела.

В 1868 Ч. Дарвин высказал теорию, согласно которой, у растений или животных, все клетки отделяют от себя крошечные геммулы, рассеянные по всему организму, геммулы попадают в репродуктивные органы, таким образом признаки передаются потомкам. (Гипотеза Пангенезиса) Она была опровержена. Мендель еще в 1865 г. Выпустил в свет работу «Опыты над растительными гибридами» но ее никто не принял во внимание, его не поняли. Ни один из его предшественников не догадался проанализировать свои резу-ты количественно. Главная заслуга Менделя в том, что он сформулировал и применил принципы гибридологического анализа для проверки конкретной гипотезы – о наследственной передаче дискретных факторов. Только в 1900 году они были заново открыты Де Фризом в Голландии, Карлом Корренсом в Германии и Эрихом Чермаком в Австрии. Было доказано, что те же законы справедливы и для животных. За эти 35 лет после Менделевских открытий вошла в науку и клеточная теория, было выяснено поведение хромосом, установлено постоянство хромосомных наборов, ядерная гипотеза наследственности, хромосомная теория Томас Морган.

В 1919 первая кафедра генетике в Петроградском университете (основатель Филипченко) В 1930 кафедра генетики в Московском университете. На рубеже 40-х Дж. Бидл и Э. Тейтум заложили основы биохимической генетики. Они показали, что мутации у хлебной плесени блокируют различные этапы клеточного метаболизма и высказали предположение, что гены контролируют биосинтез ферментов. В 1944 г. американские ученые доказали генетическую роль нуклеиновых кислот. Они идентифицировали природу трансформирующего агента как молекулы ДНК. (Рождение молекулярной генетики) Расшифровка ДНК – американский вирусолог Дж. Уотсон и английский физик Ф. Крик. (1953)

## Методы.

-**Гибридологический** – заключается в гибридизации и последующем учете расщеплений, был предложен Менделем.

Правила:

- 1) скрещиваемые организмы должны принадлежать к одному виду.
- 2) Скр.орг. должны четко различаться по отдельным признакам.
- 3) изучаемые признаки должны быть константны, те воспроизводиться из поколения в поколение при скрещивании в пределах линии.
- 4) Необходимы характеристика и количественный учет всех классов расщепления, если оно наблюдается у гибридов первого и последующего поколений.

Позволяет выяснить степень родства между отдаленными родами и видами.

## -Математический

Мендель применил количественный подход к изучению резу-ов скрещиваний. Сравнение количественных данных эксперимента с теоретически ожидаемыми. Изучение изменчивости наследственной или модификационной.

## -Цитологический

Нужен для изучения клетки как основной единицы живой материи. Исследование строения хромосом.

## -Методы химии и биохимии

Применимы для более детального изучения характеристики наследуемых признаков обмена ве-в, изучения сво-в молекул белков и нуклеиновых кислот. + методы иммунологии и иммунохимии.

## -Методы физики

Оптические, седиментационные, методы меченых атомов,.

## Задачи:

Выявление наследственных заболеваний на ранних стадиях, изучение мутагенной активности и тд. и тп.

## 2 ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ. МИТОЗ И МЕЙОЗ: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ПОВЕДЕНИЯ ХРОМОСОМ.

Генетическая информация содержится в хромосомах. При делении клетки митозом в дочерние клетки попадает одинаковый набор хромосом, образуется клон.

При мейозе происходит кроссинговер (генетическая рекомбинация), в дочерние клетки попадают измененные хромосомы с гаплоидным набором хромосом. Независимое расхождение хромосом при мейозе и независимая встреча гамет – основа генетической изменчивости.

**Митоз:** Клеточный цикл – 4 периода: пресинтетический (G<sub>1</sub>), период синтеза (S), постсинтетический (G<sub>2</sub>), и митоз (M). Митоз составляет ок. 1/8 всего клеточного цикла.

**Профаза:** Спирализация хромосом, каждая сост. из 2 хроматид (результат S периода). Исчезают ядрышки и ядерная мембрана.

**Прометафаза:** Хромосомы достигают экватора клетки.

**Метафаза:** Хромосомы образуют метафазную пластинку, появляются нити ахроматинового веретена. Центриоли находятся на полюсах клетки. Число и форма хромосом, наблюдаемых в метафазе, характеризуют кариотип вида.

**Анафаза:** Деление центромер, удерживавших хроматиды в хромосоме. Дочерние хромосомы расходятся к противоположным полюсам.

**Телофаза:** Формируется ядерная мембрана и ядрышки, хромосомы деспирализуются, клетки животных разделяются перетяжкой, у растений образуется фрагмопласт.

**Схема:** 2n2c – 2n4c – 2n2c.

**Мейоз:** 2 деления

**Профаза 1:**

- Лептотена Появление тонких нитей хромосом (хромосомы удвоены)
- Зиготена Конъюгация хромосом
- Пахитена Видны конъюгированные хромосомы
- Диплотена Начало отталкивания гомологов – различима фигура, похожая на греческ. X

**Метафаза 1:** Разрушение ядерной мембраны. Хромосомы выстраиваются в метафазную пластинку.

**Анафаза 1:** К разным полюсам расходятся гомологичные хромосомы, состоящие из 2 хроматид.

**Телофаза 1** может отсутствовать, или ядро может восстанавливаться

**Профаза 2, Метафаза 2:** по митотическому типу.

**Анафаза 2:** Расхождение хроматид удвоенных хромосом.

**Телофаза 2:** 4 гаплоидных ядра.

**Схема:** 2n2c – 2n4c – 1n2c – 1n1c.

## 3. ГИБРИДОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД. ЗАКОНОМЕРНОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ, ОТКРЫТЫЕ ПРИ ЕГО ПРИМЕНЕНИИ.

[“Вопрос рассмотрим на примере работ Г. Менделя...”]. Метод применялся и до Менделя, но усовершенствован им (наиболее прогресс. методы – полукастрация цветков, реципрокн. и возвратн. скрещивания, отбор растений с альтерн. признаками), дополнен количеств. учетом получ. потомков и мат. анализом. Объект – *Pisum sativum* (7 пар контраст. признаков – формы семени и зрелых бобов; окраски семядолей, цветов и зрелых бобов; расположение цветков и высота растения). **Закон доминирования (единообразия F<sub>1</sub>), закон расщепления признаков => 1.** Признаки в потомстве гибридов не исчезают, а перекомб-ся и перед-ся след. поколениям; **2.** В основе такого наследования – сочетание двух факторов (равновероятн. обр-ие гамет А и а, равновероятн. их встреча). **3.** Гипотеза «чистоты гамет» (гамета каждого из родителей несет по одному наследств. факторов). **Закон независимого комбинирования признаков =>** «поведение каждой пары различающихся признаков в гибридном соединении независимо от др. различий» (Мендель). **Главная** выявленная закономерность – каждому признаку соотв-ет отд. наследств. признак.

Скрещиваемые организмы должны принадлежать к одному виду, резко отличаться по отдельным признакам, которые должны быть константны, то есть воспроизводиться из поколения в поколение при скрещивании в пределах линии родительской формы.

Гибридологический метод представляет собой специфический метод генетики. Он в значительной степени совпадает с методом генетического анализа, однако не исчерпывает его, поскольку в генетическом анализе гибридологический метод часто сочетается с методами получения мутаций. Метод гибридологического анализа, заключающийся в гибридизации и последующем учете расщеплений, в законченной форме был предложен Г. Менделем. Им были сформулированы непреложные правила, которым следуют все генетики:

1. Скрещиваемые организмы должны принадлежать к одному виду.
2. Скрещиваемые организмы должны четко различаться по отдельным признакам.
3. Изучаемые признаки должны быть константны, т. е. воспроизводиться из поколения в поколение при скрещивании в пределах линии (родительской формы).
4. Необходима характеристика и количественный учет всех классов расщепления, если оно наблюдается у гибридов первого и последующих поколений.

Со времен Менделя генетический анализ обогатился целым рядом методов. В частности, методы получения мутаций позволяют создавать исходную гетерогенность для последующего применения гибридологического анализа. Метод отдаленной гибридизации позволяет выяснять степень эволюционного родства между видами и родами. При этом большое значение имеет цитологический метод. Закономерности см. вопросы 3-5.

**4.ЗАКОН ЧИСТОТЫ ГАМЕТ. СУТЬ И ДОКАЗАТЕЛЬСТВА.** «Гаметы каждого из родителей» несут только по одному из наследуемых факторов». Мендель не связывал наследств.факторы с конкретн.матер.структурами, **цитологическое обоснование** появл-ся позже: Во время **мейоза** у гибрида  $F_1(Aa)$  разн.пары хромосом расх-ся в дочерн.клетки независимо =>при случ.оплодотворении – 3 типа зигот ( $AA, Aa$  и  $aa$ ). Др.док-во – **тетрадный анализ**: проводится на орг-х, у которых все 4 продукта мейоза остаются вместе и могут далее функц. как вегетет. клетки (мхи, грибы (аскомицеты), водоросли). Напр., у аскомицетов в рез-те мейоза дипл. вегет. кл. образ. аски(сумки), содерж. по 4 гапл. аскоспоры. Аскоспоры можно извлечь и получить вегет. клон- культуру каждой из них. Если исходный диплоид был гетерозиготен по к-л. гену, напр.  $ADE2/ade2$ , то в каждой тетраде две споры обычно образ. белые колонии( $ADE2$ ), а две другие - красные ( $ade2$ ). Это расщепление - общая закономерность, характерная для моногенного наследования. Т.о., тетрадный анализ доказывает, что в основе менделевских соотношений лежит строгий биол. закон гаметического расщепления  $2A:2a$  в каждом мейозе. (у мхов гетерозиг.  $Aa$  клетка дает тетраду гаплоидных спор. У половины развившихся из спор организмов генотип –  $A$ , у половины –  $a$ ).

**5.СУТЬ И ЗНАЧЕНИЕ РАБОТ Г.МЕНДЕЛЯ.** Открытие основных закономерностей наследования стало возможным потому, что Г. Мендель руководствовался рядом правил постановки эксперимента. Работая с самоопыляющимся растением — горохом, Г. Мендель исследовал семь признаков. Убедившись в течение ряда циклов самоопыления в константности выбранных признаков, Г. Мендель скрестил растения, различающиеся по отдельным признакам, получил от них семена и высеял их. Таким образом он вырастил гибриды первого поколения, обозначаемые  $F_1$ . Эти растения оказались единообразными по каждому из признаков. В  $F_1$  было зарегистрировано лишь одно из пары альтернативных проявлений каждого признака, названное доминантным.

Эти результаты иллюстрируют первый закон Менделя — *закон единообразия гибридов первого поколения, а также правило доминирования.*

Гибриды  $F_1$  подверглись самоопылению, и образовавшиеся семена вновь были высеяны. Так было получено второе поколение гибридов, или  $F_2$ . Среди гибридов  $F_2$  обнаружилось расщепление по каждому из признаков: появились как круглые, так и морщинистые семена; как с желтой, так и с зеленой окраской семядолей и т. д. по всем признакам. Таким образом, у части гибридов  $F_2$  вновь появились признаки, не обнаруженные у гибридов  $F_1$ . Эти признаки названы рецессивными. Соотношение потомков с доминантным проявлением признака и потомков с рецессивным проявлением признака оказалось очень близко к  $3/4:1/4$ . Это соотношение выражает второй закон Менделя, или закон расщепления.

Родительские формы, обозначаемые  $P$ , были константны; каждый из них содержал задатки только одного типа, т. е. родительские формы были гомозиготными по исследуемому признаку и соответственно образовывали гаметы либо  $A$ , либо  $a$ .

Вследствие доминирования в  $F_1$  проявляется признак только одного из родителей — округлость семян. Наконец, среди гибридов  $F_2$  обнаруживается расщепление в соответствии со случайной комбинаторикой двух типов гамет  $A$  и  $a$ .

Соотношение  $3:1$  — это расщепление по фенотипу. В случае полного доминирования расщепление по генотипу  $1AA:2Aa:1aa$  не совпадает с расщеплением по фенотипу:  $3A:1aa$ .

Расщепление по генотипу и фенотипу может совпадать в тех случаях, когда признак проявляет неполное доминирование, т. е. наблюдается его промежуточное выражение у гетерозигот при сравнении с обеими гомозиготными родительскими формами. Согласно гипотезе Г. Менделя расщепление, которое он наблюдал, реализуется вследствие равновероятного образования гамет  $A$  и  $a$  у гибридов  $F_1$ , а также вследствие равновероятной встречи гамет обоих типов при оплодотворении, т. е. при образовании гибридов  $F_2$ .

Мендель хорошо понимал, что результаты таких процессов можно наблюдать только при больших выборках растений.

Изучая расщепление по форме семян, он исследовал 7324 горошины и получил соотношение: 5474 круглых и 1850 морщи- нистых; по окраске семян исследовал 8023 горошины и получил соотношение: 6022 желтых и 2001 зеленых и т. д., что очень близко к соотношению  $3:1$ . Основа работ – гибрид.метод (скрещивание растений *pisum Sativum* с 7 парами альтерн.признаков).

**Закон доминирования (единообразия):** При скрещивании отлич-ся по паре альтерн.признаков растений в  $F_1$  проявился только один признак (доминантный). **Закон расщепления признаков:** В первом поколении

потомства от самоопыления растений из  $F_1$  – у  $1/4$  проявились рецесс.признаки. **Закон независимого комбинирования признаков:** наследств.факторы разл.пра признаков наслед-ся независимо. **Выводы, сделанные Менделем:** **1.**Признаки в потомстве гибридов не исчезают, а перекомб-ся и перед-ся след.поколениям; **2.**В основе такого наследования – сочетания двух факторов (равновероятн.обр-ие гамет  $A$  и  $a$ , равновероятн.их встреча). **3.**Гамета каждого из родителей несет по одному наследств.факторов.

**Главное:** установлена связь фенотип-наследств.фактор (не исчезающий, а перед-ся потомкам), предложен матем.подход к характеру наследования.

**6.МОНОГИБРИДНОЕ СКРЕЩИВАНИЕ. АНАЛИЗ ХАРАКТЕРА НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКА. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАКОНА РАСЩЕПЛЕНИЯ В МОНОГИБРИДНОМ СКРЕЩИВАНИИ** – скрещивание, в котором родительские формы отличаются по аллелям одного гена. При скрещивании гомозигот по 1 признаку в  $F_1$  – единообразии, в  $F_2$  – расщепление  $3:1$  по данному признаку. **Цитологические основы:** **1.**Независимое расхождение хромосом в гаметы у представителей  $F_1$  =>по одному типу аллелей в каждой гамете; **2.** Равновероятная встреча гамет, несущих доминантный или рецессивный аллель.

**7. МНОЖЕСТВЕННЫЙ АЛЛЕЛИЗМ: НАСЛЕДОВАНИЕ, ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЛЕЛЕЙ** – наличие у гена множественных аллелей (следствием нескольких мутаций одного и того же гена). *Пример:* у *Drosophila melanogaster* – множеств. мутации по гену цвета глаз (white).  $w^+$  (красн. глаза) доминирует над всеми другими,  $w$  – рецессивн. по отн. к остальным, другие аллели проявляют неполн. доминирование ( $\downarrow$  интенсивн-ти окраски глаз) – i.e., гетерозиготы  $w^o$  (абрикос. глаза)/ $w$  имеют светло-абрик. глаза.

**Множ. аллели** могут проявлять и неполное доминирование, и кодоминирование (проявл-ся оба аллеля в составе гена), и супердоминирование (гетерозиготы по аллелям в составе гена имеют более яркое проявление признака, чем гомозиготы).

## 8. ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЛЕЛЕЙ.

### Доминирование и другие взаимодействия аллелей

С точки зрения рассматриваемой генетически детерминированной активности фермента (или отсутствия активности), **явление доминирования** не представляет проблемы. Ферментативная активность должна доминировать над ее отсутствием.

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* есть формы, наследственно различающиеся по окраске колоний: красные и белые. Красная пигментация — рецессивный признак. Она возникает вследствие генетического блока в биосинтезе пуринов: отсутствует активность фермента фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазы и поэтому дрожжи для своего роста нуждаются в экзогенном аденине. Субстрат реакции (аминоимидазолриботид) накапливается в клетке и конденсируется в красный пигмент. У белых дрожжей упомянутый фермент работает нормально, пигмент не накапливается и дрожжи не нуждаются в аденине. Они синтезируют его сами. Подобные примеры можно найти в описании любого метаболического пути, генетический контроль которого хорошо изучен.

Кроме того, известны случаи отсутствия доминантно-рецессивных отношений или, точнее, случаи **кодоминирования**. Типичный пример такого взаимодействия аллелей наследование антигенных групп крови человека: А, В, АВ и О, детерминируемых геном *I*.

Известны три типа аллелей этого гена:  $I^A$ ,  $I^B$ ,  $i^o$ . При гомозиготности  $I^A I^A$  эритроциты имеют только поверхностный антиген А (группа крови А, или II). При гомозиготности  $I^B I^B$  эритроциты несут только поверхностный антиген В (группа В, или III). В случае гомозиготности  $i^o i^o$  эритроциты лишены А и В антигенов (группа О или I). В случае гетерозиготности  $I^A i^o$  или  $I^B i^o$  группа крови определяется, соответственно, А (II) или В (III). Эритроциты имеют, соответственно, антигены только А или только В. Это уже известный случай полного доминирования.

Если же человек гетерозиготен  $I^A I^B$ , его эритроциты несут оба антигена: А и В (группа крови АВ, или IV). Это и есть случаи **кодоминирования**. Аллели  $I^A$  и  $I^B$  работают в гетерозиготе как бы независимо друг от друга, что и определяют с помощью иммунологических методов.

У людей с группой О в плазме крови присутствуют гемагглютинины  $\alpha$  и  $\beta$ , с группой А — гемагглютинин  $\beta$ , с группой В —  $\alpha$ . У людей группы АВ в плазме нет ни  $\alpha$ - ни  $\beta$ -гемагглютининов. При этом агглютинин  $\alpha$  специфически связывает и осаждает эритроциты с антигеном А, агглютинин  $\beta$  — эритроциты с антигеном В.

Пример наследования групп крови иллюстрирует и проявление **множественного аллелизма**: ген *I* может быть представлен тремя разными аллелями, которые комбинируются в зиготах только попарно.

Явление множественного аллелизма широко распространено в природе. Известны обширные серии множественных аллелей, определяющих тип совместимости при опылении у высших растений, при оплодотворении у грибов, детерминирующих окраску шерсти животных, глаз у дрозофилы, рисунка на листьях белого клевера, наконец, у растений, животных и микроорганизмов известно много примеров так называемых **аллозимов** или аллельных изоэнзимов белковых молекул, различия между которыми определяются аллелями одного гена.

Во многих случаях попарные взаимодействия членов серии аллелей приводят к тому, что исследуемый признак проявляется иначе, чем у гомозиготных родительских форм.

В некоторых случаях механизм взаимодействия аллелей расшифрован. Вернемся к примеру с красными и белыми дрожжами. Существует большое число красных аденинзависимых мутантов дрожжей. Большинство из них несет изменения одного и того же гена. Во всех случаях потребность в аденине и красная окраска колоний рецессивны по отношению к белой окраске и, соответственно, к отсутствию потребности в аденине. Аллель, определяющая доминантный признак, обозначается, как это принято в генетике, прописными ++ доминирование нормальное и мутантное, кодоминирование, сверхдоминирование (более сильное проявление признака у гетерозигот) + неполное доминирование+неустойчивая и условная доминантность

## 9. АНАЛИЗ ДИГИБРИДНОГО СКРЕЩИВАНИЯ. ЗАКОН НЕЗАВИСИМОГО НАСЛЕДОВАНИЯ И ЕГО ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ.

Дигибриды – гибриды, полученные от скрещивания организмов, отличающихся одновременно двумя парами альтернативных признаков. Для дигибридного скрещивания Мендель взял гомозиготные растения гороха, различающиеся одновременно по 2-м парам признаков. Материнское растение имело гладкие семена (В) и желтую окраску семян (А); оба признака доминантные. Отцовское растение имело рецессивные признаки: морщинистые в и зеленые семена а. Родительские формы были гомозиготными по двум парам признаков или по двум определяющим их генам. Генотип материнской особи ААВВ, отцовской – ааbb. Гибрид окажется гетерозиготным по двум аллельным парам, т.е. дигетерозиготным – АаВb. И семена гороха при полном доминировании окажутся гладкими и желтыми. Чтобы убедиться, что гибрид дигетерозиготен, гибрид следует скрестить с особью, гомозиготной по обоим рецессивным

признакам – aabb. Образуется 4 типа зигот в равном соотношении: 1AaBb:1aaBb:1Aabb:1aabb. Расщепление по фенотипу будет 9:3:3:1 (можно определить по решетке Пеннета или математически, по закону независимых явлений: если 2 явления независимы, то вероятность того, что они произойдут одновременно, равна произведению вероятностей каждого из них; так, появление особей с доминантным признаком при моногибридном скрещивании происходит в  $\frac{3}{4}$  всех случаев, а с рецессивными –  $\frac{1}{4}$ . Произведение отдельных вероятностей дает отношение классов расщепления по фенотипу  $\frac{9}{16}:\frac{3}{16}:\frac{3}{16}:\frac{1}{16}$ . По генотипу будет 9 классов расщепления. Вероятность появления генотипа AA=  $\frac{1}{4}$ , Aa=  $\frac{1}{2}$ , для aa=  $\frac{1}{4}$ . Для гена В тоже самое. Т.о. в случае 2-х генов число классов соответствует по фенотипу  $2^2$ , по генотипу –  $3^2$ . Для статистической оценки отклонения применяют метод  $\chi^2$ .  $\chi^2 = \sum d^2/q$ , где d- отклонение данного класса от теоретически ожидаемого, q-теоретически ожидаемая величина для каждого класса соответственно предполагаемой формуле расщепления (1:1, 3:1, 9:3:3:1 и т.д.). В процессе мейоза у гибридных организмов при образовании как женских, так и мужских гамет возможны 4 сочетания материнских и отцовских хромосом с содержащимися в них генами АВ, аВ, Ab, ab. В анафазе осуществляется расхождение к полюсам гомологичных хромосом каждой пары, но сочетание негомологичных хромосом у каждого полюса является случайным. Хромосома с А с равной вероятностью может отойти к одному полюсу деления как вместе с хромосомой В, так и вместе с хромосомой b, и такая же вероятность имеется и для другой хромосомы с а. При оплодотворении соединение этих гамет должно происходить также по правилам случайных сочетаний, но с равной вероятностью для каждого. В F<sub>2</sub> возникают 16 типов зигот, сл-но, расщепление по каждому гену там у дигибрида обеспечивается процессом независимого расхождения хромосом разных пар в мейозе.

Дигибриды – гибриды, полученные от скрещивания организмов, отличающихся одновременно двумя парами альтернативных признаков. [“Вопрос рассмотрим на примере работ Г.Менделя...”. Для первого скрещивания исп-сь гомозиготы, отличающиеся по двум парам признаков (форма и окраска семян). В F<sub>1</sub> – единообразие фенотипов – все гетерозиготы (для проверки гетерозиготности этих растений примен-ся анализирующее скрещивание - с дигомозиготой). Растения в F<sub>1</sub> с равной вероятностью дают гаметы АВ, Ab, аВ и ab =>16 равновероятных генотипов =>расщепление 9:3:3:1 по фенотипу (имело место полное доминирование). **Вывод:** Признаки наследовались независимо. **Цитолог.основа** – случайность ориентации хромосом в метафазе II мейоза =>случайное сочетание негомологичных хромосом у полюсов клетки =>равная вероятность обр-ия АВ-, Ав-, аВ- и ав-гамет. *Пропорции, наблюдавшиеся Менделем соблюд-ся при условии:* гомозиготности исх.форм, альт.проявлениях признаков, одинаковой жизнеспособности гамет с разными генотипами, независимости проявления признака от внешн.условиях и генотип.окружения.

## 10-12.ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ: ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ.

**I.Взаимодействие аллельных генов:** **1.Доминирование** – признаки, контролируемые геном в аутосоме перед-ся по аутосомно-доминантн.типу (равновероятно передаются и ♀, и ♂ потомкам), признаки, контролируемые геном в пол.хромосоме – по сцепленному с полом доминант.типу (перед-ся от отца только дочерям). Некоторые дом.мутации в гомозиг.состоянии – летальные; **2.Неполн.доминирование** – как у кур андалузской породы (при скрещивании гомозигот с белым и черным оперением в F<sub>1</sub> получают серых кур); **3.Кодоминирование** – проявляются оба аллеля у гетерозигот (i.e., наследование групп крови у человека - три аллеля домин. I<sup>A</sup> и I<sup>B</sup>, рецесс. I<sup>O</sup>. I<sup>A</sup>A или I<sup>A</sup>I<sup>O</sup> – группа А, I<sup>O</sup>I<sup>O</sup> – группа О, I<sup>A</sup>I<sup>B</sup> – группа АВ, т.е.проявляются оба аллеля =>имеются оба типа поверх.антигенов); **4.Сверхдоминирование**, гетерозис – усиление признака у гетерозигот (i.e.большая плодовитость у гетерозиготных мух, чем у исх.форм); **5.Неустойчивая доминантность** – проявление признака у гетерозигот зависит от внешних условий и генотип.окружения (i.e., доминантная мутация Curly не проявляется в форме фенотипа с загнутыми вверх крыльями при 19°C; доминант.аллель w<sup>+</sup> в рез-те инверсии попадает в прицентромерн.хроматин =>у гетерозигот w<sup>+</sup>/w проявляется рецесс.аллель w – белые глаза). **6.Условная доминантность** – невозможность выявить гомозигот по домин.аллелю, т.к.такие особи нежизнеспособны (доминант.мутация действует летальна в гомозиготе).

**II.Взаимодействие аллельных генов:** **1.Комплементарность** – два гена «работают» вместе =>развитие отличного от родит.варианта признака. Три типа: дом.гены разл-ся по фенотип.проявлениям, дом.гены имеют сходное проявление, и дом. и рец. гены имеют самостоят.фенотип.проявление. Примеры: ¶ наследование формы гребня у кур – A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> имеют ореховид.форму, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> – розовидную, bbA<sub>1</sub> – гороховидную, aabb – обычную; ¶ наследование окраски кокона у тутового шелкопряда – желтые коконы только у A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, при наличии только одного дом.гена и двойных гомозигот по рецессиву – неокрашенные коконы. **2.Эпистаз.** а. **Доминантный эпистаз** – дом.ген подавляет проявление другого дом.гена (i.e., у тыквы желтую окраску плода опред-ет ген А, зеленую опред-ет а, в присутствии дом.ингибитора I – окраски нет, I<sub>1</sub>A<sub>1</sub> и I<sub>1</sub>aa имеют бесцветные плоды). б. **Рецессивный эпистаз** – рец.аллель одного гена подавляет, а между доминантными генами наблюда-ся комплементарность. При двойном эпистазе каждая гомозиг.рецесс.аллель подавляет домин.аллель другого гена. **3.Полимерия** – гены дублируют действие друг друга. Два типа: *некумулятивная* (i.e.образование овального стручка только у пастушей сумки с генотипом a<sup>1</sup>a<sup>1</sup>a<sup>2</sup>a<sup>2</sup>, и треугольного – у всех остальных) и *кумулятивная* (окраска зерен пшеницы пропорциональна числу доминантных генов, самая интенсивная – у A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>A<sup>2</sup>A<sup>2</sup>A<sup>3</sup>A<sup>3</sup>).

**Комплементарный тип** взаимодействия (взаимно дополнительный) осуществл., когда доминантные аллели обоих генов (в дигибридном скрещивании) обуславливают нормальный (или дикий) фенотип.

Пример: PP st st bw+ bw+ × st+ st+ bw bw (ярко-красные×коричневые глаза)

F<sub>1</sub> st+ \_ bw+ \_ (темно-красные глаза)

F<sub>2</sub> 9 st+ \_ bw+ \_ (темно-красные глаза): 3 st+ \_ bw bw (коричневые глаза): 3 st st bw+ \_ (ярко-красные глаза):1st st bw bw (белые глаза)

Темно-красные глаза- дикий тип; ярко-кр. и кор. глаза рецессивны по отнош. к дикому типу, бел.- двойной рецессив. Биохим. мех-м взаимод. аллелей st и bw исслед. подробно.У дрозофилы окраска глаз обусловлена синтезом 2-х пигментов - кр. и кор. Рецессив bw в гомозиготе прерывает синтез кр. пигмента; рецессив st - кор. Когда в дигетерозиготе

оказыв. норм. аллели, синтез. оба пигмента. Если в гомозиготе оказыв. и  $bw\ bw$ , и  $st\ st$ , то не синтез. ни кр., ни кор. пигменты, и глаза - белые.

По типу комплементарности взаимодей. гены, контрол. разные этапы одного и того же метабол. пути, однако для многих неизвестен биохим. мех-м их реализации. По типу комплементарности взаимодей. гены, определ. форму гребня кур, форму плода у тыквы.

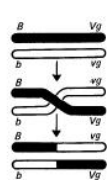
**Эпистаз**- рецессивная аллель в гомозиготе препятствует проявлению доминантной аллели или, наоборот, доминантная аллель препятствует проявлению рецессивной аллели. Пример: синтез кор. пигмента у мух, кроме  $st$ , блокируют также и рецессивные аллели гена  $purple(pr)$ . Выход в гомозиготу любой из 2 рецессивных аллелей блокирует синтез пигмента; появление и  $st$ , и  $pr$  не приводит к белым глазам (ярко-кр.). Это тоже пример комплементарного взаимодей., но без новообразования. В данном случае рецессивная аллель  $pr$  эпистатична по отношению к доминантной аллели  $st^+$ , а  $st$  эпистатична по отношению к  $pr^+$  (двойной рецессивный эпистаз). Сущест. также простой рецессивный эпистаз ( $a > B$ ;  $a > b$  или  $b > A$ ;  $b > a$ ), кот. выраж. в расщеплении 9:3:4; простой доминантный эпистаз ( $A > B$ ;  $A > b$  или  $B > A$ ;  $B > a$ ) с расщеплением 12:3:1. Ген, подавляющий действие другого, назыв. ингибитором или супрессором; подавляемый ген - гипостатический.

**Полимерия** - одной доминантной аллели любого из взаимодей. генов достаточно для проявления фенотипа. Пример: пастушья сумка  $PP$  треуг. стручкxвал. стручки =>  $F_1$ : все треуг. стручки =>  $F_2$ : **15** треуг. : **1** овал. ( $a_1a_1a_2a_2$ ) Гены в этом случае обознач. Одинаково ( $A_1$  и  $A_2$ ). Это некумулятивная полимерия.

Кумулятивная полимерия (Нильсон-Эле, 1908) - интенсивность проявления признака зависит от числа доминантных аллелей (при тригибридном скрещивании расщепление 1:6:15:20:15:6:1). Так наследуются окраска эндосперма зерен пшеницы, цвет кожи у человека, молочность, яйценоскость, длина колоса у злаков, содержание сахара в корнеплодах сахарной свеклы. Изучением наследования таких признаков занимается генетика количественных признаков.

### 13-14. СЦЕПЛЕННОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ И КРОССИНГОВЕР

[На примере наследования признака окраски тела ( $b$  - рец., черное тело/  $b^+$  - дом., серое тело) и типа крыльев ( $vg$  - рец., редуцир.клетки/  $vg^+$  - норм.крылья.). **1. Полное сцепление** (Дигетерозиготный самец и гомозиготная по рецессивам



самка):  $P \text{ ♂ } b\ vg^+/b^+\ vg \times \text{ ♀ } b\ vg/b\ vg \Rightarrow F_1\ 50\% b^+\ vg/b\ vg$  и  $50\% b\ vg^+/b\ vg \Rightarrow$  самцы образуют только два типа гамет ( $b\ vg^+$  и  $b^+\ vg$ ). **2. Неполное сцепление** (Дигетерозиготная самка и гомозиготный по рецессивам самец).  $P \text{ ♀ } b\ vg^+/b^+\ vg \times \text{ ♂ } b\ vg/b\ vg \Rightarrow 83\% - b\ vg^+/b\ vg$  и  $b^+\ vg$  (есть сцепление генов) и  $17\% b\ vg/b\ vg$  и  $b^+\ vg^+/b\ vg$  (рекомбинантные формы, сцепления нет) => полное сцепление имеется только у самцов. **3. Кроссинговер**. Морган объяснил неполное сцепление обменом участками между генами  $b$  и  $vg$ . (см. также вопрос 15).

Интерференция – подавление кроссинговера на участках, непосредственно прилегающих к точке произошедшего обмена. Коэффициент коинцидентности  $C = \frac{\text{наблюдаемая частота двойных кроссинговеров}}{\text{теоретическая}}$ .  $C < 1 \Rightarrow$  положительная интерференция,  $C > 1 \Rightarrow$  отрицательная.

В дальнейшем Т. Х. Морган и его сотрудники в экспериментах с *D. melanogaster* обнаружили большое число примеров сцепления генов и показали, что это сцепление, как правило, неполное. Рассмотрим один из первых экспериментов Т. Х. Моргана по изучению сцепленного наследования. У дрозофилы известны мутантные формы, отличающиеся от мух дикого типа черной окраской тела. Это признак рецессивный по отношению к признаку нормальной серой окраски. Ген, контролирующий черную окраску тела, называется  $black$  и обозначается  $b$ . Его доминантная аллель —  $b^+$ . Существует также рецессивный ген  $vestigial$  ( $vg$ ), который в гомозиготном состоянии приводит к недоразвитию крыльев (зачаточные крылья). Его доминантная аллель ( $vg^+$ ) контролирует нормальное развитие крыльев.

При скрещивании мух  $bb\ vg\ vg \times b^+\ b^+\ vg^+\ vg^+$  в  $F_1$  были получены особи, дигетерозиготные по этим генам. Все они были нормальными по обоим признакам в соответствии с правилом доминирования и законом единообразия  $F_1$ . Далее были проведены два типа анализирующих скрещиваний. В первом из них брали самцов  $F_1$  и скрещивали с гомозиготными самками  $bb\ vg\ vg$ , а во втором — девственных самок, отобранных в  $F_1$ , скрещивали с самцами  $bb\ vg\ vg$ . Результаты этих анализирующих скрещиваний оказались неодинаковыми (рис. 5.10, А). В  $F_2$  (потомство от анализирующего скрещивания) в первом случае были получены мухи только двух типов независимо от пола: 50% мух имели черное тело и зачаточные крылья и 50% были нормальными по обоим признакам. Учитывая, что расщепление в анализирующем скрещивании отражает соотношение типов гамет, продуцируемых особями  $F_1$ , следует заключить, что самцы  $F_1$ , использованные при первом скрещивании, формировали гаметы только двух типов — с родительскими сочетаниями аллелей  $b\ vg$  и  $b^+\ vg^+$ . Следовательно в 100% случаев были гаметы только с родительскими сочетаниями исследов. генов. При втором скрещивании в  $F_2$  появились все возможные четыре типа потомков, а следовательно, самки  $F_1$  давали четыре типа гамет:  $b\ vg$ ,  $b^+\ vg$ ,  $b\ vg^+$  и  $b^+\ vg^+$ . Однако, как явствовало из расщепления в  $F_2$  от этого скрещивания, четыре типа гамет образовались не равновероятно. Независимо от пола мухи распределились следующим образом: 41,5% черных с зачаточными крыльями; 41,5% нормальных по окраске и с нормальными крыльями; 8,5% черных с нормальными крыльями; 8,5% нормальных по окраске с зачаточными крыльями. Таким образом, родительские сочетания  $b\ vg$  и  $b^+\ vg^+$  образовались в 83% случаев, а новые комбинации — рекомбинантные сочетания  $b\ vg^+$  и  $b^+\ vg$  (рис. 5.10, А) — в 17% случаев.

В другом эксперименте в качестве родителей были использованы мухи, обладающие теми же признаками, но в другом сочетании: мух с черным телом и нормальными крыльями скрещивали с мухами с нормальной окраской тела и с зачаточными крыльями. Затем вновь провели два типа анализирующих скрещиваний. В первом использовали самцов  $F_1$ , во втором — самок  $F_1$ . В обоих случаях их скрещивали с двойным гомозиготным рецессивом  $bb\ vg\ vg$ . И вновь были получены такие же результаты в отношении родительских и рекомбинантных сочетаний признаков в  $F_2$ . Если из  $F_1$  брали самцов, то наблюдали только родительские комбинации признаков, а если из  $F_1$  брали самок, то появлялись родительские

(83%) и рекомбинантные (17%) сочетания признаков в тех же соотношениях, что и в первом эксперименте, результаты которого представлены на рис. 5.10, А.

В обоих экспериментах наблюдается полное сцепление генов *b* и *vg*, если для анализирующего скрещивания берутся самцы *F<sub>1</sub>*. Если же для анализирующего скрещивания использовали самок *F<sub>1</sub>*, то сцепление было частичным.

Т. Х. Морган дал следующее объяснение этим результатам. В первом эксперименте гены *b* и *vg* находятся в одной хромосоме, т. е. дигетерозиготные особи *F<sub>1</sub>* несут в одном гомологе аллели *b* и *vg*, а в другом гомологе — *b<sup>+</sup>* и *vg<sup>+</sup>*, во втором эксперименте *b* и *vg<sup>+</sup>* в одном, а *b<sup>+</sup>* и *vg*.

У самцов дрозофилы кроссинговер вообще не происходит, поэтому гены, локализованные в одной хромосоме (или, говоря более строго, в одной паре хромосом), обнаруживают абсолютное сцепление, если при скрещивании используют дигетерозиготных самцов. В мейозе у дигетерозиготных самок дрозофилы *F<sub>1</sub>* возможен обмен гомологичными участками гомологичных хромосом между локусами, в которых находятся гены *b* и *vg*. Такие обмены, или кроссинговер (от англ. *crossingover* — перекрест), приводят к новому рекомбинантному сочетанию аллелей генов *b* и *vg* в гомологичных хромосомах, которые затем расходятся к разным полюсам. Эти обмены происходят с вероятностью 17% и в итоге дают два класса реципрокных рекомбинантных сочетаний, или ре-комбинантов с равной вероятностью — по 8,5%.

Сходным образом объясняется и результат, полученный ранее У. Бэтсоном и Р. Пеннетом: гены, контролирующие окраску цветков (*p*) и форму пыльцевого зерна (*l*) у душистого горошка, локализованы в одной паре гомологичных хромосом, и между ними возможен кроссинговер. Сотрудник Т. Х. Моргана А. Стертевант предположил, что частота кроссинговера на участке между генами, локализованными в одной хромосоме, может служить мерой расстояния, на котором они находятся друг от друга. Тогда можно использовать частоту кроссинговера для того, чтобы определять взаимное расположение генов и расстояние между ними.

В качестве подтверждения справедливости этого положения можно в общем виде рассмотреть результаты тригибридного скрещивания, в кот. Род. Формы дрозофилы различаются по генам *b* и *vg*, *pr* (сцеплен. с *b* и *vg*).

Рецессивная аллель *pr* (*purple* — пурпурный) в гомозиготном состоянии обуславливает ярко-красную окраску глаз, нормальная доминантная аллель *pr<sup>+</sup>* — темно-красный цвет глаз. При анализирующем скрещивании потомки расщепляются на 8 классов, 2 класса нереккомбинантных (*/* и *//*) и 6 классов потомков, рекомбинантных по всем генам (Ш — VIII).

Далее необходимо определить частоту кроссинговера между всеми тремя генами попарно. Для этого суммируют всех мук, рекомбинантных по генам *b* и *pr*. классы III, IV, VII, VIII). Полученное число делят на общее число исследованных потомков в *F<sub>2</sub>*. Аналогично определяют частоту рекомбинации (кроссинговера) между *pr* и *vg* (при этом суммируют классы V, VI, VII, VIII) и частоту рекомбинации между *b* и *vg* (суммируют классы III, IV, V, VI).

Экспериментально установленные частоты рекомбинации между тремя генами попарно можно представить следующим образом: *b* - *pr* — 6%; *pr* - *vg* - 12%; *b* - *vg* - 17%. На основе этих данных, пользуясь - правилом аддитивности, можно расположить три гена в линейной последовательности. Наиболее удалены друг от друга гены *b* и *vg*, а между ними локализован ген *pr*. Сумма частот его рекомбинации с генами *b* и *vg* приблизительно равна частоте рекомбинации между *b* и *vg*. Таким образом, строится простейшая карта группы сцепления. Под группой сцепления понимают группу генов, расположенных в одной хромосоме. Даже гены, расположенные в одной хромосоме, не всегда обнаруживают сцепление. Генетическое расстояние, на котором кроссинговер происходит с вероятностью 1%, представляет собой сантиморган (сМ) — единицу измерения, названную в честь Т. Х. Моргана

### Интерференция

Так же, как в рассмотренном случае, сумма меньших частот рекомбинации (генетических расстояний) чаще всего превышает частоту рекомбинации между наиболее удаленными друг от друга маркерами. Это объясняется тем, что между любыми двумя сцепленными генами возможен не только одиночный, но и двойной (а также множественный) кроссинговер, что приводит к сокращению регистрируемой частоты кроссинговера. Действительно, если бы в рассмотренном примере (рис. 5.12) между генами *b* и *vg* не было бы маркера *pr*, то *b* (*pr<sup>+</sup>*) *vg* и *b<sup>+</sup>* (*pr*) *vg<sup>+</sup>* воспринимались бы как некроссоверные состояния *b* *vg* и *b<sup>+</sup>* *vg<sup>+</sup>*. Таким образом, двойные обмены сокращают регистрируемое расстояние между генами. Вместе с тем между обменами на соседних участках хромосом существует взаимовлияние, названное интерференцией. Такое взаимовлияние можно выразить количественно. Для этого сопоставляют реально наблюдаемую частоту двойных обменов с частотой, теоретически ожидаемой на основе предположения о том, что обмены на соседних участках происходят независимо друг от друга. Степень и характер интерференции измеряется величиной коинциденции (*C*). Коинциденцию оценивают как частное от деления реально наблюдаемой частоты двойных кроссоверов на теоретически ожидаемую частоту двойных кроссоверов. Последнюю величину получают, перемножая частоты кроссинговера на соседних участках.

Вычислим коинциденцию на конкретном примере, пользуясь данными Т. Х. Моргана и А. Стертеванта, которые при тригибридном скрещивании изучали-рекомбинацию между генами *y*, *w* и *t*, локализованными в X-хромосоме *D. melanogaster*. Фенотипическое проявление генов *y* и *w* уже описывалось. Рецессивная аллель гена *t* приводит к уменьшению размера крыльев. Частота рекомбинации между *y* и *w* 1,3%, а между *w* и *t* 32,6%. Двойные рекомбинанты по *y* — *w* — *t* наблюдались с частотой 0,045%.  $C(\text{коинциденция}) = \frac{\text{двойные кроссоверы}}{\text{произведение недвойн. кроссоверов}}$  Величину интерференции (*I*) определяют по формуле  $I = 1 - C$ .

Если  $C < 1$ , то интерференция положительная, т. е. одиночный обмен препятствует обмену на соседнем участке хромосомы. Если  $C > 1$ , то интерференция отрицательная, т.е. один обмен как бы стимулирует дополнительные обмены на соседних участках. В действительности существует только положительная интерференция при реципрокной рекомбинации — кроссинговере, а кажущееся неслучайным совпадение двух и более обменов, характерное для очень коротких расстояний, — результат нереципрочных событий при рекомбинации

Таким образом, при картировании генов в группах сцепления на основе изучения частот рекомбинации необходимо учитывать две противоположные тенденции. Двойные обмены «сокращают» расстояния между генами, а интерференция препятствует множественным обменам, вероятность которых увеличивается с расстоянием. Как показал для дро-зофилы Г. Меллер, на больших расстояниях (около 35% рекомбинации) интерференция исчезает. Следовательно, наиболее точные данные о частоте кроссинговера можно получить только на достаточно коротких расстояниях — приблизительно до 10 сМ.

В обобщенном виде зависимость частоты рекомбинации от реального расстояния с учетом множественных обменов описывает функция Дж. Хол-дэйна:  $rf(d)=0.5(1-e^{-2d})$ , где  $rf$  — картирующая функция (в нашем случае — это частота учитываемых кроссинговеров),  $d$  — реальное расстояние, на котором происходят обмены,  $e$  — основание натурального логарифма. Функция Холдэйна показывает, что с увеличением расстояния  $rf$  приближается к 0,5. Реально это означает, что между генами, расположенными далеко друг от друга, выявляется около 50 единиц рекомбинации. Такую же частоту рекомбинации демонстрируют и гены, находящиеся в разных хромосомах. практически невозможно уловить сцепления между столь удаленными друг от друга генами. Эти гены, хотя и сцеплены физически, находясь в одной хромосоме, будут наследоваться независимо.

Как теперь хорошо известно, некоторые гены, контролирующие 7 признаков гороха, исследованные Г. Менделем, сцеплены, однако расположены на большом расстоянии друг от друга. В частности, гены  $a$  (окраска цветков и семенной кожуры) и  $i$  (окраска семян) принадлежат к одной и той же группе сцепления, но расстояние между ними около 200 сМ. В опытах Менделя эти гены наследовались независимо. При скрещивании:  $AaIi \times aaii$  в  $F_2$  было получено расщепление  $357 A — I — : 132 A — ii : 116 aal — : 34 aaii$ , которое хорошо соответствует теоретически ожидаемому при независимом наследовании ( $360:120:120:40$ ;  $\chi^2 = 2,258$ ;  $p > 0,05$ ) (см. гл. 2.2). стояния  $rf$  приближается к 0,5.

#### **14 (кратко) . ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ МНОЖЕСТВЕННЫХ КРОССИНГОВЕРОВ. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ПРИ КРОССИНГОВЕРЕ.**

Между любыми двумя сцепленными генами возможен не только одиночный, но и двойной (или множественный) кроссинговер, что приводит к сокращению регистрируемой частоты кроссинговера. Кроме того, между обменами на соседних участках хромосом существует взаимовлияние — интерференция (I), степень и характер которой измеряется величиной коинциденции (C). Коинциденция — частное от деления реально наблюдаемой частоты двойных кроссинговеров на теоретически ожидаемую частоту (если обмены на соседних участках происходят независимо друг от друга).  $I = 1 - C$ . Если  $C < 1$ , то интерференция положительная, то есть одиночный обмен препятствует обмену на соседнем участке хромосомы. Если  $C > 1$ , то интерференция отрицательная, то есть один обмен как бы стимулирует дополнительные обмены на соседних участках. В действительности при кроссинговере существует только положительная интерференция.

#### **15. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ (КРОССИНГОВЕРА). МОДЕЛЬ ХОЛЛИДЕЯ.**

В принципе для того, чтобы гомологичные молекулы ДНК поменялись своими частями, сначала должны произойти разрывы во всех цепях обоих дуплексов, а уже потом — обмен цепями и замыкание разрывов. У Холлидея разрывы происходят не одновременно, а в два этапа. Рекомбинация начинается с первичных одноцепочечных разрывов фосфодиэфирных связей ДНК (их вносит фермент эндонуклеаза). Разрывы происходят в двух цепях одинаковой полярности. Важно, что первичные разрывы возникают не в случайных, а в определенных сайтах ДНК.

Далее от точек первичных разрывов происходит обмен цепями между дуплексами, который приводит к образованию крестообразной структуры, получившей впоследствии название "полухиазма Холлидея". Такое название объясняется тем, что в полухиазме в обмен вовлечены только две цепи ДНК из четырех, что отличает ее от полной хиазмы — характерного продукта заверченного мейотического кроссинговера, давно известного биологам. Затем происходит очень важный процесс — перемещение точки перекреста цепей в полухиазме вдоль рекомбинирующих дуплексов. Такое явление описано под названием "миграция ветвления", т.е. от точки перекреста цепей происходит расплетание исходных дуплексов и высвобождающиеся цепи тут же ренатурируют с комплементарными цепями из гомологичных дуплексов, что приводит к образованию и последующему удлинению гетеродуплекса. Именно в удлинении гетеродуплекса и заключается биологический смысл миграции ветвления. Ее осуществляют специальные ферменты. Размеры гетеродуплекса при мейотическом кроссинговере колеблются от нескольких сот до одной тысячи п.н., при рекомбинации в соматических клетках и клетках прокариот он еще протяженнее.

Образовавшаяся сложная разветвленная структура должна разделиться на гомологи (разрешением полухиазмы). Для разрешения необходимы еще два разрыва цепей: вторичные разрывы завершат обмен цепями. Но прежде чем это случится, полухиазма должна претерпеть еще одно превращение — изомеризацию. Изомеризация заключается в изменении структуры полухиазмы, которое происходит за счет обычного теплового движения молекул. В структуре  $v'$  происходит один поворот на 180 любой пары дуплексных сегментов (плеч), на рисунке это нижняя пара. Образовавшаяся структура может разрешиться двумя парами вторичных разрывов. Парные разрывы цепей одинаковой полярности 1-1 или 2-2 приводят к двум типам рекомбинантных хроматид: хроматиды первого типа содержат внутренний гетеродуплекс  $B/b$ , а по конфигурации фланговых маркеров  $A$  и  $C$  не отличаются от исходных (некроссоверные хроматиды); рекомбинантные хроматиды второго типа кроссоверные, они также содержат гетеродуплекс, но обмениваются частями по обе стороны от него. Оба типа продуктов рекомбинации равновероятны, что соответствует генетическим данным, на которые опирался Холлидей при создании своей модели.

Как уже указывалось, от исходных молекул в рекомбинационный гетеродуплекс могут войти разные аллели, и тогда в нем возникнут неспаренные основания, которые локально нарушат структуру двойной спирали ДНК. Эти нарушения узнаны специальными ферментными системами, работающими по типу эксцизионной репарации. Они проводят



коррекцию неспаренных оснований в гетеродуплексе: удаляют неспаренное основание в одной цепи ДНК и застраивают образующуюся брешь по матрице другого аллеля в комплементарной цепи, тем самым превращая (конвертируя) один аллель в другой. Это явление было давно известно под названием "конверсия гена", но теперь мы знаем, что в ее основе лежит коррекция гетеродуплекса. *Схема конверсии гена*: что если гетерозиготная клетка  $A/a$  вступает в мейоз, то в норме среди продуктов мейоза оба аллеля гена  $A$  будут представлены в равном соотношении:  $2A : 2a$ . Однако если в районе хромосомы, где расположен ген  $A$ , произойдет кроссинговер, то сформируется гетеродуплекс  $A/a$  с локально неспаренными основаниями, что может привести к конверсии гена  $A$ : расщепление аллелей гена среди продуктов мейоза будет  $3A : 1a$  или  $1A : 3a$ . Расщепление по генам, расположенным вне участка кроссинговера, сохранит нормальное соотношение аллелей  $2 : 2$ . Мы видели при разборе модели Холлидея, что содержащие гетеродуплекс продукты рекомбинации с кроссинговером и без кроссинговера по внешним генам равновероятны, иными словами, конверсия гена в мейозе может одинаково часто сопровождаться и не сопровождаться обменом по внешним генам. Этот факт был основным среди упомянутых выше генетических данных, опираясь на которые Холлидей создавал свою модель.

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

## 16. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА

Принадлежность к определенному полу – важная особенность фенотипа особи. Самки и самцы обладают различной хромосомной конституцией.

У человека, так же как у дрозофилы, клетки женских особей содержат по две X-хромосомы, а мужских – одну X- и одну Y-хромосому. Такое же различие между полами характерно для большинства позвоночных, многих насекомых и других беспозвоночных, а также для многих двудомных растений. Однако генетические основы определения пола у всех этих организмов неодинаковы.

У *Drosophila melanogaster* носители единственной X-хромосомы, не имеющие Y-хромосомы, обладают нормальным мужским фенотипом (правда, при этом стерильны). Фенотип по полу *D.m.* определяется соотношением между числом X-хромосом и аутосом (A).

Число X-хр	Число наборов A	X/A	Фенотипич. пол
3	2	1	Метасамка
2	2	1	Норм. самка
2	3	0,67	Интерсекс
1	2	0,5	Норм. самец
1	3	0,33	Метасамец

\* - очень ослаблены и часто не доживают до стадии половозрелости (супер-)

Механизм, посредством которого отношение числа X-хромосом к числу наборов аутосом определяет развитие того или иного фенотипа, не вполне понятен. Кроме того у *D.m.* известны конкретные гены, влияющие на определение пола.

Мутантный ген *tra* (трансформатор) в гомозиготном состоянии придает особям с двумя X-хромосомами, т.е. «генетическими» самками, фенотипический облик самцов (которые стерильны).

Развитие пола у млекопитающих – процесс, состоящий из двух этапов. Прежде всего хромосомный состав ядра определяет половую дифференциацию гонад, которые развиваются либо в семенники (XY/2A), либо в яичники (2X/2A). Если образуются семенники, они выделяют гормоны тестостерон, циркулирующий по эмбриону и вызывающий развитие соматических клеток по мужскому типу. Напротив, если образуются яичники, отсутствие тестостерона приводит к тому, что клетки развиваются по женскому типу.

Целый ряд данных указывает на то, что образование семенников является прямым результатом действия генов, расположенных в Y-хромосоме. Прежде всего как и у мыши, так и у человека нерасхождение хромосом ведет к появлению зигот XO/2A, которые развиваются по женскому типу и образуют яичники (недоразвиты). С другой стороны, в результате нерасхождения образуются также зиготы XXU/2A, которые развиваются по мужскому типу и дают самцов, имеющих семенники (сперматогенез отсутствует). У человека описаны случаи появления кариотипа XXXXU, при этом развитие идет полностью по мужскому типу. Эти данные свидетельствуют о том, что у млекопитающих в отличие от дрозофилы пол не регулируется соотношением X/A; определяющую роль у них играет Y-хромосома.

У птиц и бабочек самцы являются гомогаметным полом, а самки – гетерогаметным (типа XY или XO). Половые хромосомы у этих видов иногда обозначают буквами Z и W, выделяя таким образом данный способ определения пола, при этом самцы обозначаются символом ZZ, а самки – ZW или ZO.

Совершенно другой механизм определения пола, называемый гаплоидиплоидией, широко распространен у пчел и муравьев. У этих организмов нет половых хромосом: самки – это диплоидные особи, а самцы (трутни) – гаплоидные. Самки развиваются из оплодотворенных яиц, а из неоплодотворенных развиваются трутни. У трутней, таким образом, нет отцов, хотя у них и есть деды по материнской линии. В процессе сперматогенеза у трутней не происходит редукции числа хромосом. Из оплодотворенной яйцеклетки может развиваться либо «матка» - крупная, способная к размножению самка, либо стерильная рабочая самка. Это зависит от условий выкармливания личинки рабочими особями.

Большинство растений и некоторые животные гермафродитны, т.е. в одной особи сочетаются свойства обоих полов. Большинство гермафродитов размножаются путем самооплодотворения (самоопыления), хотя у некоторых животных и отдельных видов растений строение половых органов допускает перекрестное оплодотворение.

### 17. ЗАКОНОМЕРНОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ, СЦЕПЛ С ПОЛОМ.

Два скрещивания, различающиеся по тому, кто из родителей (самец или самка) вносит в зиготу доминантную (или рецессивную) аллель, называются реципрокными.

При скрещивании красноглазой самки и белоглазого самца в  $F_1$  все мухи были красноглазыми, а в  $F_2$  происходило расщепление в соотношении 3/4 красноглазых: 1/4 белоглазых. Это показывает, что признак «белые глаза» — рецессивный, а «красные глаза» — доминантный. Необычным было то, что в  $F_2$  белоглазыми были только самцы, а среди красноглазых самки и самцы встречались в соотношении 2:1.

Несмотря на то что признак «белые глаза» рецессивный, в  $F_1$  реципрокного скрещивания наблюдалось расщепление 1:1. При этом все самки  $F_1$  были красноглазыми, а все самцы — белоглазыми.

Такое наследование получило название крисс-кросс (или крест-накрест) наследования: сыновья наследуют признак матери, а дочери — признак отца. При таком скрещивании в  $F_2$  появляются в равном соотношении как красноглазые самки и самцы, так и белоглазые самки и самцы.

Таким образом, закон единообразия гибридов  $F_1$  в одном из реципрокных скрещиваний не соблюдается. Реципрокные скрещивания дают разные результаты. При скрещивании белоглазых самок и красноглазых самцов в  $F_2$  наблюдается расщепление 1: 1 вместо 3:1, как ожидается по классической схеме моногибридного расщепления. Все это, казалось бы, не согласуется с правилами Г. Менделя. Объяснение. Самцы дрозофилы: пара различных половых хромосом (XY), самки: пара одинаковых пол хром (XX). => каждое скрещивание является как бы анализирующим по признаку пола: самки образуют только один тип гамет: с X-хромосомой. Это гомогаметный пол. Самцы образуют два типа гамет: с X- и с Y-хромосомой. Это гетерогаметный пол. Случайное сочетание этих гамет самца и самки и обеспечивает статистически равное число самцов и самок в каждом поколении. Результаты, полученные при скрещивании красноглазых и белоглазых мух, Морган объяснил, предположив, что ген  $w$  находится в X-хромосоме, а Y-хромосома генетически инертна или по крайней мере не содержит гена  $w^+$ . ( $w$ -бел гл.  $w^+$ -красн гл.). Этот тип наследования получил название наследования, сцепленного с полом. Т.о., ген  $w$  сцеплен с полом, т. е. находится в X-хромосоме. Гетерозиготные самки  $ww^+$ , имеющие две X-хромосомы, оказываются красноглазыми, => рецессивность аллели  $w$ , обуславливающей белоглазие. В то же время самцы, несущие аллель  $w$  в своей единственной X-хромосоме, всегда белоглазые, что согласуется с представлениями об инертности Y-хромосомы. Этим и объясняется наследование по схеме крисс-кросс в скрещивании ( $\text{♀ бел} * \text{♂ кр} = 1\text{♀ кр} : 1\text{♂ бел} = 1\text{♀ кр} : 1\text{♂ бел} : 1\text{♂ кр} : 1\text{♂ бел}$ ;  $\text{♀ кр} * \text{♂ бел} = \text{♀ кр} \text{♂ кр} = 2\text{♀ кр} : 1\text{♂ кр} : 1\text{♂ бел}$ ).

### 18. ХРОМОСОМНАЯ ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ (ХТН): ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ДОКАЗАТЕЛЬСТВА.

Гены расположены в хромосомах в линейной последовательности и, таким образом, именно хромосомы являются материальной основой наследственности, т.е. преемственности свойств организмов в ряду поколений.

Доказательства.

1. Обнаружение крисс-кросс наследования: сыновья наследуют признак матери, дочери — признак отца (по признаку окраски глаз у дрозофилы). При таком скрещивании в  $F_2$  появляются в равном соотношении красноглазые и белоглазые самки и самцы, что противоречит менделевскому соотношению 3:1 и объясняется при сопоставлении этих скрещиваний с данными кариотипа дрозофилы. Кариотип: 4 пары хромосом, 1 из которых — половые. Самцы — XY (гетерогаметный пол), самки — XX (гомогаметный пол). Y-хромосома отличается от X по форме и состоит в основном из гетерохроматина. Результаты эксперимента Морган объяснил, предположив, что ген  $w$  (*white*) ( $w$  — рецессивный признак, белоглазие,  $w^+$  — доминантный, красноглазие) находится в X-хромосоме, а Y-хромосома генетически инертна или, по крайней мере, не содержит гена  $w^+$ . Этот тип наследования называется сцеплением с полом. Присутствие только одной аллели и в единичном числе у диплоидного организма называется гемизиготным состоянием (признак, сцепленный с мужской X-хромосомой).

2. К. Бриджес обнаружил редкое нарушение схемы крисс-кросс наследования: в  $F_1$  появлялись исключительные белоглазые самки, имеющие вместе с двумя X-хромосомами одну Y-хромосому (XXY), и красноглазые самцы с одной X-хромосомой (XO) (исходные формы: самка  $X^{w+}X^w$ , самец  $X^{w+}Y$ ). Так было доказано, что определенный ген ( $w$ ) находится в конкретной хромосоме (X).

3. Хромосомный механизм определения пола — см. №16.

4. Кроссинговер. В мейозе у самок дрозофилы возможен обмен гомологичными участками гомологичных хромосом — кроссинговер, что приводит к новому рекомбинантному сочетанию аллелей генов в гомологичных хромосомах, которые затем расходятся к разным полюсам. У самцов же дрозофилы кроссинговер вообще не происходит, поэтому гены, локализованные в одной паре хромосом, обнаруживают абсолютное сцепление. В строгом смысле группа сцепления — группа генов, проявляющих сцепленное наследование. Но так как такое наследование отражает локализацию генов в одной хромосоме, обычно под группой сцепления понимают группу генов, расположенных в одной хромосоме. Линейное расположение генов в группах сцепления — еще одно доказательство ХТН. Хромосомы — линейные структуры.

5. У объектов, хорошо изученных в цитологическом и генетическом отношении (сопоставление цитологических и генетических карт, или карт групп сцепления), число групп сцепления и гаплоидное число хромосом совпадают. Цитологические и генетические карты коллинеарны, то есть их компоненты параллельно чередуются (определенные

диски гигантских хромосом и гены в группах сцепления). Большинство генов находится в участках эухроматина, У-хромосома почти целиком состоит из гетерохроматина.

Все развитие генетики опирается на хромосомную теорию, и все последующие достижения генетики развивают эту теорию.

## 19. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КАРТИРОВАНИЕ ХРОМОСОМ ЭУКАРИОТ. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ КАРТЫ.

1) Генетические карты – определение групп сцепления и положения картируемого гена относительно других генов данной хромосомы. *На первом этапе* определяют принадлежность гена к той или иной группе сцепления. Картирование мутации основывается на анализе её сцепления с маркером (необходимы маркерные гены для каждой хромосомы) Если интересующая нас мутация наследуется независимо от маркёров второй хромосомы, делается вывод о её принадлежности к другой группе сцепления. Скрещивания проводятся до тех пор, пока не удаётся выявить сцепленное наследование анализируемой мутации с маркерными мутациями какой-либо хромосомы. *Второй этап* – определение положения гена на хромосоме – подсчёт расстояния между искомым и известным маркером. Проводят специальное скрещивание, где четыре кроссоверных и некроссоверных особей. Расстояние между генами пропорционально частоте кроссинговера.

2) Цитологические карты – метод основан на использовании хромосомных перестроек. При действии метагенов наблюдаются делеции или дупликации небольших фрагментов, сравнимых по величине с одним или несколькими локусами. Метод перекрывающихся делеций (ABDE/abde), транслокаций и инверсий.

3) физическое картирование – расщепляют фрагменты на части (рекомбинационное). Фермент картирование п. Участков. Предел дробления – нуклеотидная последовательность.

4) Новые методы – гибридизация *in situ*. Получают иРНК, транскрибированную с этого гена, а затем с помощью обратной транскриптазы её ДНК-копию.

Затем проводят гибридизацию с денатурированной хромосомной ДНК и по месту гибридизации определяют, в каком участке хромосомы локализован данный ген.

Сотрудник Моргана А. Стертевант предположил, что частота кроссинговера на участке между генами, локализованными в одной хромосоме, может служить мерой расстояния, на котором они находятся друг от друга. Он провел анализирующее тригибридное скрещивание, в котором родительские формы различаются по генам *b* (*black* – окраска тела), *vg* (*vestigial* – форма крыльев) и *pr* (*purple* – окраска глаз), сцепленными друг с другом. Далее он определил частоту кроссинговера между всеми тремя генами попарно. И на основе этих данных, пользуясь правилом аддитивности, расположил три гена в линейной последовательности (сумма частот рекомбинации между *pr* и *b*, *pr* и *vg* приблизительно равна частоте рекомбинации между *b* и *vg*, *pr* находится между *b* и *vg*). Так строится простейшая **карта группы сцепления (генетическая карта)**. В строгом смысле группа сцепления – группа генов, проявляющих сцепленное наследование. Но так как такое наследование отражает локализацию генов в одной хромосоме, обычно под группой сцепления понимают группу генов, расположенных в одной хромосоме. Но иногда гены, расположенные в одной хромосоме, не обнаруживают сцепления. Генетическое расстояние, на котором кроссинговер происходит с вероятностью 1%, – **1 сантиморган (сМ)**.

Между любыми двумя сцепленными генами возможен не только одиночный, но и двойной (или множественный) кроссинговер, что приводит к сокращению регистрируемой частоты кроссинговера и, следовательно, расстояния между генами на карте. Кроме того, между обменами на соседних участках хромосом существует взаимовлияние – **интерференция (I)**, степень и характер которой измеряется величиной **коинциденции (C)**. Коинциденция – частное от деления реально наблюдаемой частоты двойных кроссинговеров на теоретически ожидаемую частоту (если обмены на соседних участках происходят независимо друг от друга).  $I = 1 - C$ . Если  $C < 1$ , то интерференция положительная, то есть одиночный обмен препятствует обмену на соседнем участке хромосомы. Если  $C > 1$ , то интерференция отрицательная, о есть один обмен как бы стимулирует дополнительные обмены на соседних участках. В действительности при кроссинговере существует только положительная интерференция.

Т. о., при картировании надо учитывать противоположные тенденции (двойные обмены («сокращение» расстояния между генами) и интерференцию (препятствие множественным обменам, вероятность которых увеличивается с расстоянием)). У дрозофилы на больших расстояниях (35% рекомбинации) интерференция исчезает (Меллер). Следовательно, наиболее точные данные о частоте кроссинговера можно получить только на коротких расстояниях – около 10сМ.

**Функция Дж. Холдэйна** описывает зависимость частоты рекомбинации от реального расстояния с учетом множественных обменов:  $rf(d) = (1 - e^{-2d})/2$ , где *rf* – картирующая функция (частота учитываемых кроссинговеров), *d* – реальное расстояние, на котором происходят обмены, *e* – основание натурального логарифма. Функция Холдэйна показывает, что с увеличением расстояния *rf* приближается к 0,5. То есть между генами, расположенными далеко друг от друга, выявляется около 50 единиц рекомбинации (такая же частота у генов, находящихся в разных хромосомах). Между такими генами нельзя уловить сцепления; несмотря на физическое сцепление, они будут наследоваться независимо.

Составление **цитологических карт** удобно для объектов, у которых наиболее четко различима продольная дифференцировка хромосом по хромомерному строению, как это видно в пахитене у кукурузы. Очень удобны гигантские хромосомы дрозофилы, где хорошо различимы диски гетерохроматина и междисковые участки эухроматина. Установление точек действия различных рестриктаз позволяет проводить **физическое (рестрикционное) картирование** участков молекулы ДНК и небольших геномов (плазмид вирусов). Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции) разрезают

ДНК вблизи или внутри определенных последовательностей нуклеотидов, которые одинаковы на обеих комплементарных цепях. Два разрыва в одинаковых позициях комплементарных цепей на концах фрагмента образуют «липкие концы», которые могут вновь замыкаться благодаря комплементарности оснований. Последовательности, узнаваемые рестриктазами, статистически разбросаны по геному. Чем короче последовательность, тем чаще она встречается и, соответственно, тем короче фрагменты ДНК, образующиеся при рестрикции. Фрагменты рестрикции (рестрикты) можно разделить по их молекулярной массе и заряду при помощи электрофореза в геле. Распределение сайтов рестрикции – своеобразный паспорт каждого фрагмента ДНК – может быть использовано для его идентификации. Принцип рестрикционного картирования сводится к получению перекрывающихся по размеру фрагментов, которые разделяют при помощи электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Молекулярную массу фрагментов определяют, используя в качестве «свидетеля» ДНК известного размера. На электрофореграмме рестрикты различают, окрашивая их бромистым этидием и просматривая гель в УФ свете. Применяют также радиоактивное мечение концов фрагментов с помощью полинуклеотидкиназы фага T4.

Непосредственно для картирования сайтов рестрикции используют метод неполного гидролиза одной рестриктазой или метод двух рестриктаз. В случае неполного гидролиза молекулы, имеющей два сайта рестрикции, будет получаться пять фрагментов – пять полос при электрофорезе плюс еще одна полоса интактных молекул. В простейшем случае по распределению молекулярных масс удастся определить взаимное расположение фрагментов. Можно также извлечь из геля продукты неполного гидролиза и еще раз подвергнуть их действию рестриктазы.

При использовании двух рестриктаз ДНК гидролизуют каждой рестриктазой по отдельности и обеими рестриктазами вместе. Предположим, что одну и ту же молекулу одна рестриктаза режет на два фрагмента (А и С), а другая – на три (А, В и С). При совместном их действии исчезает фрагмент В и появляются два новых, по молекулярной массе в сумме составляющих исчезнувший фрагмент. Таким образом, сопоставляя размеры фрагментов, выявляемых на электрофореграммах, определяют их взаимное расположение: ABC.

**20. ЗАКОН ХАРДИ—ВАЙНБЕРГА** свидетельствует о том, что наследование как таковое не меняет частоты аллелей в популяции.

Если обозначить частоту аллели А через  $p$ , а частоту аллели а через  $q$ , то при наличии по данному локусу только двух аллелей в популяции:  $p + q = 1$ . Соотношение генотипов в таком случае будет:  $(p + q)^2 = p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1$ , в чем легко убедиться, воспользовавшись решеткой Пеннета:

Если в популяции для данного гена присутствуют три аллели с частотами  $p$ ,  $q$  и  $r$ , то частоты генотипов также соответствуют формуле биномиального распределения:

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$$

и т. д. при большем числе аллелей.

Представим, что аллели А и а встречаются с частотами 0,5, тогда в  $F_1$  частоты генотипов будут:

Таким образом,  $0,25AA + 0,50Aa + 0,25aa = 1$ . Нетрудно видеть, что при этом сохраняется исходная частота аллелей: 0,5А и 0,5а. В следующем поколении получают то же соотношение генотипов, как и в последующих поколениях. Пользуясь этим приемом и принимая иные значения  $p$  и  $q$ , легко убедиться, что уже в первом поколении в популяции устанавливается равновесие, сохраняющееся и во всех последующих.

Эта закономерность была очевидна для математика Х. Харди, и он хотел, чтобы она стала известна биологам, считавшим, что частота доминантной аллели в смешанной популяции может автоматически возрастать.

В строгом смысле закон Харди — Вайнберга приложим к *бесконечно большим популяциям, в которых осуществляется панмиксия и на которые не действуют никакие внешние факторы*. Только при этих условиях популяция находится в равновесии, т. е. частоты аллелей и генотипов в ней постоянны. Очевидно, что это идеальное представление о популяции никогда не реализуется в природных условиях. На популяцию постоянно действуют многочисленные внешние и внутренние факторы, нарушающие генетическое равновесие, которые будут рассмотрены далее.

: как определить частоту аллелей в популяции при полном доминировании? Поскольку, согласно формуле Харди—Вайнберга,  $(p + q)^2 = p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1$  то, зная частоту рецессивных гомозигот, достаточно извлечь квадратный корень из полученной величины, и мы найдем частоту рецессивной аллели  $q$ . Частота доминантной аллели составит  $p = 1 - q$ . Определив таким образом частоты аллелей А и а, можно выяснить частоты всех генотипов в популяции.

Важным следствием закона Харди—Вайнберга является то, что редкие аллели в популяции присутствуют преимущественно в ге-терозиготе. Например, если аллель а встречается с частотой 0,01, а аллель А — соответственно с частотой 0,99, то частота гетеро-зигот составит 0,0198, т. е. около 0,02, а рецессивных гомозигот — 0,0001. Таким образом, в гетерозиготном состоянии рецессивная аллель встречается более чем в 100 раз чаще, нежели в гомозиготном.

**21. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ** - изменение частот аллелей и генотипов возможно не только вследствие отбора, но и в результате мутаций, миграций особей, случайного дрейфа генов, изоляции, избирательного (ассоциативного) скрещивания. Все эти факторы = факторы динамики популяций.

#### Отбор

1) осн. теорема естественного отбора (Фишер, 1930): скорость увеличения приспособленности к-л популяции в любой отрезок времени равна её генетической изменчивости по приспособленности в это же время (только для варьирования одного локуса при определенных условиях среды)

2) естественный отбор, действует в зависимости от приспособленности

отбор: стабилизирующий, отсекающий (дизруптивный), направленный (движущий), дестабилизирующий (при одомашнивании)

**Мутационный процесс** - Основа возникновения гетерогенности популяций, из-за него длительно не м. существовать чистые линии (гомозиготы). М. процесс сам по себе недостаточен для распространения рецессивной мутации.

**Поток генов** - Обмен генами между популяциями, миграция изменяет частоты аллелей быстрее, чем мутация. Похож на мутационный процесс.

**Дрейф генов** - Следующее поколение = ВЫБОРКА из предыдущего.

**Инбридинг** - скрещивание близкородственных форм в пределах одной популяции организмов (животных или растений).

**Следствия:** повышение гомозиготности, проявление рецессивных аллелей, инбридная репрессия (ослабление особей при отрицательном эффекте рецессивных аллелей), повышение фенотипической изменчивости вследствие выхода в гомозиготу многих аллелей

**Изоляция** - Генетические факторы изоляции: полиплоидия, хромосомные перестройки, ядерно-цитоплазматическая несовместимость, несовместимость экспрессии отдельных генов вследствие их мутационных изменений. => освоение новых экологических ниш, видообразование.

**Взаимодействие м/у этими факторами недостаточно изучено.**

**Генофонд** — понятие из популяционной генетики, описывающее совокупность всех вариаций (аллелей) определённой популяции. Популяция располагает всеми своими аллелями для оптимального приспособления к окружающей среде. Можно также говорить о едином генофонде вида, так как между разными популяциями вида происходит обмен генами.

## 22. МУТАЦИОННАЯ И МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ.

Мутационная изменчивость. Это часть наследственной изменчивости. Наследственная изм. — это способность к изменению самого генетического материала. М.и. Это возникновение новых вариантов дискретных единиц генетического материала. Прежде всего новых аллелей. **Мутация** - это явление скачкообразного, прерывистого изменения наследственного признака. **Мутации** — это наследуемые изменения генетического материала.

Положения мутационной теории:

- 1) мутации возникают внезапно как дискретные изменения признаков.
- 2) новые формы устойчивы
- 3) В отличие от ненаследственных изменений, мутации не образуют непрерывных рядов, не группируются вокруг какого-либо среднего типа. Они представляют собой качественные изменения.
- 4) мутации проявляются по-разному и могут быть как полезными так и вредными
- 5) вероятность обнаружения мутаций зависит от числа исследованных особей.
- 6) сходные мутации могут возникать неоднократно. (Г. Де Фриз.)
- 7) В классификации, основанной на размерах сегментов генома, подвергающихся преобразованиям, мутации разделяют на , и .

При **геномных мутациях** у организма-мутанта происходит внезапное изменение числа хромосом, кратное целому геному. Если через  $2n$  обозначить число хромосом в исходном диплоидном геноме, то в результате геномной мутации, называемой полиплоидизацией , происходит образование полиплоидных организмов, геном которых представлен  $4n$ ,  $6n$  и т.д. хромосомами. Различают аллополиплоидию , в результате которой происходит объединение при гибридизации целых неродственных геномов, и аутополиплоидию, для которой характерно адекватное увеличение числа хромосом.

При **хромосомных мутациях** происходят как изменение числа отдельных хромосом в геноме ( анеуплоидия ), так и крупные перестройки структуры отдельных хромосом. Последние, получили название хромосомных aberrаций. В этом случае наблюдаются потеря ( делеции ) или удвоение части ( дупликации ) генетического материала одной или нескольких хромосом, изменение ориентации сегментов хромосом в отдельных хромосомах ( инверсии), а также перенос части генетического материала с одной хромосомы на другую ( транслокации ) (крайний случай - объединение целых хромосом). **Генные мутации** встречаются наиболее часто. В результате генных мутаций происходят замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дупликации и инверсии различных частей гена. Если под действием мутации изменяется один нуклеотид, говорят о точковых мутациях . Точковые мутации с заменой оснований разделяют на два класса: (замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин) и (замена пурина на пиримидин или наоборот). По влиянию на экспрессию генов мутации разделяют на две категории: **мутации типа замен пар оснований и типа сдвига рамки считывания (frameshift)** . Последние представляют собой делеции или вставки нуклеотидов, число которых не кратно трем, что связано с триплетностью генетического кода. Первичную мутацию иногда называют **прямой мутацией** , а мутацию, восстанавливающую исходную структуру гена, - **обратной мутацией, или реверсией** . Возврат к исходному фенотипу у мутантного организма вследствие восстановления функции мутантного гена нередко происходит не за счет истинной реверсии, а вследствие мутации в другой части того же самого гена или даже другого неаллельного гена. В этом случае возвратную мутацию называют **супрессорной**. **Модификационная изменчивость** — ненаследственная изменчивость. Определенные типы модификаций возникают только у организмов определенного генотипа. Следовательно, способность к модификациям наследуется и характеризует генетически заданную норму реакции. Возможность модификации определяется генотипом и реализуется при соответствующих изменениях внешней среды. **1) адаптивные модификации** те не наследуемые изменения, полезные для организма и способствующие его выживанию при изменившихся условиях. (например загар на коже человека). А.м. это реакция клеток и организма на изменение условий среды, которые неоднократно действовали на организм в ходе эволюции. Все они — в пределах нормы реакции, заданной генотипом. Модификации прекращаются, как только прекращается действие агента, их вызвавшего. Также есть морфозы и фенкопии, к кот это не относится. **Морфоз** — случается при интенсивном действии многих агентов, ненаследуемое изменение, случайные по отношению к воздействию. Чаще всего это отклонения от стандартного фенотипа. **Фенотипическая супрессия**. Супрессия, проявляющаяся вне этапов считывания

генетической информации, например, на уровне трансляции; Модификации – результат изменения действия генов. Адаптивные модификации дают организму шанс выжить в изменчивой окружающей среде и оставить потомство.

### 23. МУТАЦИИ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ.

Мутации – дискретные, стабильные изменения наследственного материала, приводящие к изменению фенотипа. Классификация: 1) по происхождению: спонтанные и индуцированные; 2) по проявлению в гетерозиготном состоянии: доминантные и рецессивные; 3) по направлению прямые (состояние дикого типа в качественно иное), обратные (реверсии, возвращают мутантное состояние к дикому типу); 4) по уровню организации изменяемого генетического материала: геномные, хромосомные, генные; 5) по силе проявления аллелей: гиперморфные (приводят к усилению действия гена за счёт увеличения количества синтезируемого продукта); гипоморфные (ослабляют действие гена за счёт уменьшения количества биохимического продукта, кодируемого аллелем дикого типа); неоморфные (кодируют синтез продукта, отличающегося от синтезируемого под контролем аллеля дикого типа, и не взаимодействуют с ним); аморфные (инактивируют действие гена); антиморфные (действуют противоположно аллелям дикого типа); 6) по влиянию на жизнеспособность или плодовитость особей: летальные, полuletальные, условно летальные, стерильные, нейтральные, повышающие жизнеспособность и плодовитость; 7) по характеру регистрируемого проявления: морфологические, физиологические, поведенческие, биохимические; 8) по локализации изменяемого генетического материала: цитоплазматические (мтх, пластиды), ядерные; 9) по месту возникновения и характеру наследования: генеративные, соматические.

### 24. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕННЫХ (ТОЧКОВЫХ) МУТАЦИЙ. ВИДЫ ГЕННЫХ МУТАЦИЙ. ТРАНЗИЦИЯ И ТРАНСВЕРСИЯ

**Генные мутации** – изменения числа и/или последовательности нуклеотидов в структуре ДНК в пределах отдельных генов.

1) Замена оснований: миссенс-мут (изм смысл – одна АМК замещ на другую, фенотипич проявл зависит от функц значимости домана), нейтр (неизм смысл), нонсенс-м (бессмысл, терминирующие – кодон, определяющий какую-либо АМК, превращается в стоп-кодон – преждевременная терминация трансляции и обрыв полипептидной цепи. Обладают наибольшим повреждающим действием).

2) Вставки, перемещения, выпадения отдельных оснований – сдвиг рамки считывания. Меняются все триплеты ниже сайта дубликации или делеции по ходу считывания, повышается вероятность образования стоп-кодонов и терминации трансляции.

Мутации: 1) в регуляторных областях генов: в промоторной части снижают уровень синтеза белкового продукта, в сайте полиаденилирования снижают уровень транскрипции; 2) в кодирующих областях генов – в экзонах могут привести к преждевременному окончанию белкового синтеза, в интронах – генерация новых сайтов сплайсинга, которые, конкурируя с нормальными, в итоге заменяют их, в сайтах сплайсинга нарушают синтез первичного РНК-транскрипта и приводят к трансляции бессмысленных белков.

Т(пи)А(пу)Ц(пи)Г(пу): Транзиция – замена пурина на пурин или пиримидина на другой пиримидин (происходят при репликации ДНК вследствие таутомеризации, трансверсия – замена пурина на пиримидин.

### 25. ЛЕТАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ (МЕТОД МЕЛЛЕР-5)

Учет летальных мутаций и мутаций с видимым фенотипическим проявлением легче удается для X-хромосом дрозофилы благодаря специфике ее наследования. Однако существуют методы учета летальных мутаций в аутосомах. Например, для учета рецессивных летальных мутаций в хромосоме 2 используют так называемый метод сбалансированных леталей. Для этого применяют линию, гетерозиготную по хромосоме 2. В одном гомологе находятся доминантные гены *Cyrl* (*Cy* – загнутые крылья) и *Lobe* (*L* – уменьшенные глаза лопастной формы), в другом гомологе – *Plum* (*Prg* – сливово-коричневый цвет глаз). Кроме того, хромосома *Cy L* содержит инверсии, препятствующие кроссинговеру. Все три доминантные мутации обладают рецессивным летальным действием. Благодаря этому при разведении такой линии выживают только гетерозиготы по указанным генам. Это и есть система сбалансированных леталей.

Для изучения рецессивных летальных мутаций, а также рецессивных мутаций с видимым проявлением исследуемых мух скрещивают с мухами *CyL/Pm*. В *F1* получают мух, гетерозиготных по той или другой хромосоме исследуемой линии, и индивидуально вновь скрещивают сегрегантов *CyL* с мухами *CyL/Pm*. В *F2* (в индивидуальных культурах) скрещивают между собой самцов и самок с признаками *CyL* и анализируют *F3*. В отсутствие рецессивной летальной мутации расщепление в *F3* будет 2*CyL*: 1 *Cy L*, а если в половых клетках мух исходной линии возникали летальные мутации, то в соответствующих индивидуальных культурах в *F3* не будет нормальных мух 2*CyL*:Q *Cy*+*L*+. Аналогично учитывают в *F3* и рецессивные мутации с видимым проявлением в хромосоме.

### 26. ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ (ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ), ИХ ЗНАЧЕНИЕ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ.

Хромосомные перестройки (абберации, мутации)-перемещения генетического материала, приводящие к изменению структуры хромосом в пределах кариотипа.

Внутрихромосомные - дефишенсы(концевые нехватки), делеции(выпадения частей хромосом), дубликации(умножения частей хром.), инверсии(изменения чередования генов вследствие поворота участка хромосомы на 180°).

Межхромосомные - транслока-ции(перемещение части хромосомы на другую негомологичную ей). Транспозиции и инсерции - изм локализ небольш участков генет материала, включ 1 или несколько генов. Транспозиции могут между негомологичными хромосомами или в 1хр.

**Делеции и дефишенсы** - вследствие нехватки хромосомы укорачиваются и отсутствие участка одного из гомологов приводит к гемизиготному состоянию генов, находящихся в нормальном гомологе. Если теряются доминантные аллели одного из гомологов гете-розиготы, то наблюдается фенотипическое проявление рецессивных аллелей хромосо-мы, незатронутой абберацией. Поскольку вследствие делеции теряются участки хромо-сом, у гетерозигот по этим перестройкам наблюдаются характерные нарушения конъю-гации гомологов. Более длинная нормальная хромосома образует петлю на участке, соотв делеции. Границы делеций уточняют по нарушению конъюгации и изменению рисунка хромосом. Делеции летальны в гомозиготе. Оч.короткие делеции могут не нарушать жизнеспособности в гомозиготе. Дефишенсы устанавливают по тем же критериям. При конъюгации не петля, а 1 короче другой. Присутствие дефишенсы у чел - синдром кошачьего крика, гетерозиготность по дефишенсы в 5-й хромосоме, умственная отсталость, рано умирают.

**Дупликации** - двукратное повторение одного и того же участка хромосомы. Мультипликации(амплификации) многократ повтор. Повторы могут происходить в пределах 1 хр. или переноситься на др. Повторы в 1хр. могут распол тандемно(ABCBCDE) или инвер-тировано(ABCCBDE). Причина - неравный кроссинговер. Гетерозиготы по дупликации выявляются - петля при конъюгации. дупликации и др. повторы не оказывают такого отрицательного воздействия на жизнеспособность, как делеции и дефишенсы. Роль в эволюции генома - доп участки генет материала, ф-ция кот м.б. изменена в результате мутаций и последующего естественного отбора.

Инверсии - изменение чередования генов,

- -центрические(захватыв центрoмеру и включающие ее в инвертированный участок)
- -парацентрические(не включ центрoмеру в инвертиров участок)

Летально если разрыв в жизненноважном генам. Подавляется кроссинговер если инверсия в гетерозиготе.

У гетерозигот по инверсиям - петли.Если в такой петле произойдет кроссинговер, то в случае парацентрической инверсии возникает 1хроматида с 2 центромерами, которые порвут ее при расхождение в анафазе, образующийся бесцентромерный фрагмент будет потерян. Из 4 гамет полноценными будут только 2. При перичентрической инверсии 2 хроматиды несут делеции по некоторым генам, нет препятствий нормальному расхождению. Могут способствовать эволюционной дивергенции новых форм, образующихся в преде-лах вида.

**Транслокации** - реципрокный обмен участками негомологичных хромосом. Изменяется характер сцепления генов. В гетерозиготе по транслокации гены принадлежащие к разным негомологичным хромосомам наследуются как принадлежащие к 1 группе сцепления. Это объясняется тем, что полностью функциональными оказываются только те споры и гаметы, которые несут родительское сочетание хромосом. Характер конъюгации транслоцированных хромосом меняется, образуется фигура креста. Плотная конъюгация оказывается затрудненной вблизи точек разрывов, что приводит к подавлению кроссинговера в этих участках. У гетерозиготы по транслокации в профазе мейоза образуются квадриваленты, а не биваленты, как обычно, поскольку гомологичные

## **27. ГЕНОМНЫЕ МУТАЦИИ. ПОЛИПЛОИДИЯ. ВИДЫ ПОЛИПЛОИДИИ.**

Геномные — полиплоидизация (образование организмов или клеток, геном которых представлен более чем двумя (3n, 4n, 6n и т. д.) наборами хромосом) и анеуплоидия (гетероплоидия) — изменение числа хромосом, не кратное гаплоидному набору (см. Инге-Вечтомов, 1989). В зависимости от происхождения хромосомных наборов среди полиплоидов различают аллополиплоидов, у которых имеются наборы хромосом, полученные при гибридизации от разных видов, и аутополиплоидов, у которых происходит увеличение числа наборов хромосом собственного генома, кратное n.

Полиплоидией (др.-греч. πολύς — многочисленный, πλοῦς — зд. попытка и εἶδος — вид) называют кратное увеличение количества хромосом в клетке эукариот. Полиплоидия гораздо чаще встречается среди растений, нежели среди животных. Среди раздельнополых животных описана у нематод, в частности аскарид, а также у ряда представителей земноводных. Искусственно полиплоидия вызывается ядами, разрушающими веретено деления, такими как колхицин. Различают аутополиплоидию и аллополиплоидию. Аутополиплоидия — наследственное изменение, кратное увеличение числа наборов хромосом в клетках организма одного и того же биологического вида. На основе искусственной аутополиплоидии синтезированы новые формы и сорта ржи, гречихи, сахарной свёклы и других растений.

Для полиплоидов растений ди-, три-, тетраплоиды и т. д., имеющие соответственно два, три, четыре и т. д. повторений одного и того же генома. Такие полиплоиды могут возникать спонтанно в результате полиплоидизации соматических клеток растений, в результате чего получают мозаики — особи, содержащие как диплоидные, так и полиплоидные ткани. Часто полиплоидные формы получают из них путем вегетативного размножения различных частей растения.

Для искусственного получения полиплоидов применяют аген-ты, блокирующие расхождение удвоившихся хромосом; напри-мер, алкалоид колхицин, другие митозные яды, например винбластин, препятствуют полимеризации тубулина и тем самым блокируют расхождение хромосом. Камфора вызывает эндомитотическую полиплоидизацию у дрожжей, при действии на которые колхицин, в частности, не эффективен.

Другой путь возникновения аутополиплоидов у растений — образование нередуцированных микро- и макроспор, которое может происходить под влиянием повышения или понижения температуры, действия наркотических веществ и др. В этих слу-чаях хромосомы не конъюгируют в профазе I и могут быть включены в одно ядро в телофазе I. Далее это ядро проходит II деление и образует не четыре, а две клетки — диады. Воз-можно также нарушение II деления мейоза. В обоих случаях в итоге образуются нередуцированные — диплоидные пыльце-вые зерна или яйцеклетки.

Принято различать сбалансированные полиплоиды с четным числом наборов хромосом: 4n, 6n, 8n и т. д. — и несбалансиро-ванные полиплоиды с нечетной плоидностью: 3n, 5n, 1n и т. д. Последние обычно имеют пониженную

фертильность, поскольку нечетное повторение каждой из хромосом создает препятствие для их регулярной конъюгации и последующего распределения в мейозе. Такой проблемы не возникает у сбалансированных полиплоидов.

Чаще всего оптимальна четная пloidность; например, опыление тетраплоидного сорта ржи пыльцой диплоидного сорта приводит к образованию триплоидных зародышей, которые погибают на ранних стадиях развития.

Тем не менее у многих растений именно триплоиды проявляют признаки большей мощности и более высокой продуктивности, чем диплоиды или тетраплоиды.

В любом случае получение первичной полиплоидной формы всегда означает только начало селекционного процесса, в ходе которого путем скрещивания полиплоидов и последующей рекомбинации удастся оптимизировать выражение признаков и получить гармонично развитые растения.

Аллополиплоидия — кратное увеличение количества хромосом у гибридных организмов. Возникает при межвидовой и межродовой гибридизации. Многие растения являются природными полиплоидами. Однако чаще всего их полиплоидные ряды не результат автополиплоидизации, а следствие объединения различных геномов посредством гибридизации. Очевидно, при гибридизации двух разных видов даже с одинаковым числом хромосом у полученного амфигаплоида трудно ожидать нормального течения мейоза. Конъюгация хромосом в профазе I мейоза будет нарушена из-за отсутствия гомологов. Если же геномы А и В, объединившиеся в амфигаплоиде, удвоятся (AABB), т. е. произойдет полиплоидизация, то фертильность такого амфидиплоида, или аллотетраплоида, будет восстановлена, поскольку теперь хромосомы могут образовывать нормальные пары при конъюгации. Собственно именно так и поступают при синтезе новых форм путем отдаленной гибридизации.

Эксперименты прекрасно подтверждают теорию О. Винге (1917), согласно которой полиплоидные ряды в природе возникают путем гибридизации видов и последующего удвоения обоих родительских хромосомных наборов. Многие растения действительно представляют собой аллополиплоиды. Например, пшеница *Triticum aestivum* ( $2n=42$ ) имеет геномную формулу: AABBDD, т. е. является гексаплоидом с тремя разными геномами. Ее геномы АВ соответствуют другому виду пшеницы — аллотетраплоиду *T. dicoccum*. Третий геном D, скорее всего, происходит от злака другого рода — *Aegilops squarrosa*, имеющего 14 хромосом.

Часто геномы, входящие в состав аллополиплоидов, содержат гомологичные гены и целые участки хромосом, которые называют гомеологичными. Гомеология хромосом выявляется по их способности к гомеологичной конъюгации отдельными участками, содержащими гомологичные гены, что лучше всего показано при изучении aberrантных мейозов у амфигаплоидов. Расщепление по гомологичным генам у аллополиплоидов часто носит характер некумулятивной или кумулятивной полимерии.

Нарушения пloidности у человека:

У человека, как и у подавляющего большинства многоклеточных животных, большая часть клеток диплоидна. Гаплоидны только зрелые половые клетки, или гаметы. Нарушения пloidности (как анеуплоидия, так и более редкая полиплоидия) приводят к серьезным болезненным изменениям. Примеры анеуплоидии у человека: синдром Дауна — трисомия по 21-й хромосоме (21-я хромосома представлена тремя копиями), синдром Кляйнфельтера — избыточная X хромосома (XXY), синдром Тернера — нулисомия по одной из половых хромосом (XO). Описаны также трисомия по X хромосоме и случаи трисомии по некоторым другим аутосомам (помимо 21-й). Примеры полиплоидии редки, однако известны как abortивные триплоидные зародыши, так и триплоидные новорожденные (срок их жизни при этом не превышает нескольких дней) и диплоидно-триплоидные мозаики.

## **28. НЕРАСХОЖДЕНИЕ ХРОМОСОМ И ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ (НА ПРИМЕРЕ ДРОЗОФИЛЫ И ЧЕЛОВЕКА).**

Как показал Морган, при скрещивании белоглазых самок дрозофилы с красноглазыми самцами дочери оказываются красноглазыми, а сыновья белоглазыми. Однако и из этого правила бывают, оказывается, редкие исключения. Примерно у одной из 2 тыс. мух в  $F_1$  от такого скрещивания цвет глаз оказывается противоположным: белым у самок и красным у самцов. Бриджес предположил, что появление редких мух возможно при нерасхождении X-хромосом; другими словами, в тех случаях, когда X-хромосомы не расходятся в мейозе к разным полюсам, а направляются вместе к одному из полюсов, в результате чего образуются яйцеклетки с двумя X-хромосомами и яйцеклетки без X-хромосом.

Если у белоглазой мухи образуется яйцеклетка с двумя X-хромосомами и эта яйцеклетка оплодотворяется спермием, содержащим Y-хромосому, причем обе X-хромосомы содержат ген белых глаз. Бриджес предположил, что белоглазые самки в потомстве от скрещивания между красноглазыми самцами и белоглазыми самками развиваются именно из таких зигот. Когда же яйцеклетка, не содержащая ни одной X-хромосомы, оплодотворяется спермием красноглазого самца, несущим X-хромосому, то в зиготе оказывается одна X-хромосома, несущая ген красных глаз, а Y-хромосомы нет вовсе. Бриджес предположил, что из таких зигот развиваются красноглазые самцы. Другими словами, гипотеза Бриджеса состояла в том, что появляющиеся с частотой 1:2000 белоглазые самки получают по две X-хромосомы от матери (и Y-хромосому от отца), а такие же редкие красноглазые самцы получают лишь одну отцовскую X-хромосому (и, следовательно, вовсе лишены Y-хромосомы).

Гипотеза Бриджеса была умоуозрительной, но допускала экспериментальную проверку путем изучения хромосомных наборов мух, представляющих собой исключение из общего правила. Прямые наблюдения показали, что в клетках «исключительных» белоглазых самок действительно содержится по две X-хромосомы и по одной Y-хромосоме, а клетки «исключительных» красноглазых самцов имеют по одной X-хромосоме, тогда как Y-хромосома у них отсутствует вовсе. Таким образом, было показано, что конкретный ген вне всяких разумных сомнений локализован в конкретной хромосоме.

Самцы дрозофилы, лишённые Y-хромосомы, внешне нормальны, но стерильны. Самки с двумя X-хромосомами и одной Y-хромосомой нормальны и плодовиты. Бриджес скрещивал таких самок (XXY) с нормальными красноглазыми самцами



(ХУ). Он обнаружил, что около 4% самок в потомстве от таких скрещиваний имеют белые глаза, а около 4% самцов – красные глаза; остальные 96% потомства составляли красноглазые самки и самцы возникающие снова в результате нерасхождения X-хромосом в мейозе у самок. Он назвал такое нерасхождение вторичным, поскольку оно происходит в потомстве самок, появившихся в результате первичного нерасхождения X-хромосом (и потому обладающих двумя X-хромосомами и одной Y-хромосомой). Вторичное нерасхождение происходит с частотой около 1:25, а первичное нерасхождение – 1:2000.

Нерасхождение может быть следствием физического сцепления X-хромосом, в таком случае нерасхождение имеет место в 100% случаев.

У человека явление нерасхождения хромосом обуславливает возникновение различных форм анеуплоидии. Анеуплоидия (греч. an + eu + ploos + eidos — отрицательная приставка + вполне + кратный + вид) — наследственное изменение, при котором число хромосом в клетках не кратно основному набору. Может выражаться, например, в наличии добавочной хромосомы ( $n + 1$ ,  $2n + 1$  и т. п.) или в нехватке какой-либо хромосомы ( $n - 1$ ,  $2n - 1$  и т. п.). Анеуплоидия может возникнуть, если в анафазе I мейоза гомологичные хромосомы одной или нескольких пар не разойдутся. В этом случае оба члена пары направляются к одному и тому же полюсу клетки, и тогда мейоз приводит к образованию гамет, содержащих на одну или несколько хромосом больше или меньше, чем в норме. Это явление известно под названием нерасхождение. Когда гамета с недостающей или лишней хромосомой сливается с нормальной гаплоидной гаметой, образуется зигота с нечетным числом хромосом: вместо каких-либо двух гомологов в такой зиготе их может быть три или только один. Зигота, в которой количество аутосом меньше нормального диплоидного, обычно не развивается, но зиготы с лишними хромосомами иногда способны к развитию. Однако из таких зигот в большинстве случаев развиваются особи с резко выраженными аномалиями.

Формы: моносомия - это наличие всего одной из пары гомологичных хромосом. Примером моносомии у человека является синдром Тернера, выражающийся в наличии всего одной половой (X) хромосомы. Генотип такого человека XO, пол — женский. У таких женщин отсутствуют обычные вторичные половые признаки, характерен низкий рост и сближенные соски. Встречаемость среди населения Западной Европы составляет 0,03 %.

Трисомия — это наличие трёх гомологичных хромосом вместо пары в норме.

Наиболее часто встречающейся у человека является трисомия по 16-й хромосоме (более одного процента случаев беременности). Однако следствием этой трисомии является спонтанный выкидыш в первом триместре.

Среди новорождённых наиболее распространена трисомия по 21-й хромосоме, или синдром Дауна ( $2n + 1 = 47$ ). Эта аномалия, названная так по имени врача, впервые описавшего её в 1866 г., вызывается нерасхождением хромосом 21. К числу её симптомов относятся задержка умственного развития, пониженная сопротивляемость болезням, врождённые сердечные аномалии, короткое коренастое туловище и толстая шея, а также характерные складки кожи над внутренними углами глаз, что создаёт сходство с представителями монголоидной расы.

Другие случаи нерасхождения аутосом:

- Трисомия 18 (синдром Эдвардса)
- Трисомия 13 (синдром Патау)
- Трисомия 16 выкидыш
- Трисомия 9
- Трисомия 8 (синдром Варкани)

Синдром Дауна и сходные хромосомальные аномалии чаще встречаются у детей, рождённых немолодыми женщинами. Точная причина этого неизвестна, но, по-видимому, она как-то связана с возрастом яйцеклеток матери.

Случаи нерасхождения половых хромосом:

XXX (женщины внешне нормальны, плодовиты, иногда отмечается умственная отсталость, пониженная обучаемость, алалия; частота проявления 0,1 %)

XXY, Синдром Клайнфельтера (мужчины, обладающие некоторыми вторичными женскими половыми признаками; бесплодны; яички развиты слабо, волос на лице мало, иногда развиваются молочные железы; обычно низкий уровень умственного развития)

XYY (мужчины высокого роста с различным уровнем умственного развития;)

Тетрасомия (4 гомологичные хромосомы вместо пары в диплоидном наборе) и пентасомия (5 вместо 2-х) встречаются чрезвычайно редко. Примерами тетрасомии и пентасомии у человека могут служить кариотипы XXXX, XXYY, XXXY, XYYY, XXXXX, XXXXY, XXXYY, XYYYY и XXYYY.

## 29. МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ. НОРМА РЕАКЦИИ. ПЕНЕТРАНТНОСТЬ И ЭКСПРЕССИВНОСТЬ

Пенетрантность – доля особей (в %), у которых рассматриваемый признак проявился среди всех особей данного генотипа.

Экспрессивность – степень выраженности рассматриваемого признака по отношению к его максимальной выраженности среди всех особей данного генотипа.

Рассматривая действие гена, его аллелей, необходимо учитывать не только генные взаимодействия и действие генов-модификаторов, но и модифицирующее действие среды, в которой развивается организм. Известно, что у примулы окраска цветка розовая ( $P-$ ) — белая ( $pp$ ) наследуется по моногибридной схеме, если растения развиваются в интервале температур 15—25°C. Если же растения  $F_2$  вырастить при температуре 30—35°C, то все цветки у них оказываются белыми. Наконец, при выращивании растений  $F_2$  в условиях температуры, колеблющейся около 30 °C, можно получить разнообразные соотношения от  $3P-:1pp$  до 100% растений с белыми цветками. Такое варьирующее соотношение классов при расщеплении в зависимости от условий внешней среды или от условий генотипической среды (так назвал С. С. Четвериков варьирование

генотипа по генам-модификаторам) носит название варьирующей *пенетрантности*. Это понятие подразумевает возможность проявления или не проявления признака у организмов, одинаковых по исследуемым генотипическим факторам.

*Пенетрантность выражается долей особей, проявляющих исследуемый признак среди всех особей одинакового генотипа по контролируемому (изучаемому) гену.*

От внешней среды и генов-модификаторов может зависеть и степень выраженности признака. Например, дрозофила, гомози-готная по аллели *vgvg* (зачаточные крылья), более контрастно проявляет этот признак при понижении температуры. Другой признак дрозофилы — отсутствие глаз (*eyeu*) варьирует от 0 до 50% от числа фасеток, характерного для мух дикого типа.

*Степень проявления варьирующего признака называется экспрессивностью.* Экспрессивность обычно выражают количественно в зависимости от отклонения признака от дикого типа.

Оба понятия — пенетрантность и экспрессивность — были введены в 1925 г. Н. В. Тимофеевым-Ресовским для описания варьирующего проявления генов.

Тот факт, что признак может проявиться или не проявиться у особей данного генотипа в зависимости от условий или варьировать в различных условиях среды, убеждает в том, что фенотип — это результат действия (и взаимодействия) генов в конкретных условиях существования организма.

Норма реакции — способность реагировать на варьирующие условия развития. Норму реакции генотипа необходимо учитывать как при экспериментах, так и при выведении новых форм хозяйственно ценных организмов. Отсутствие изменений в проявлении признака указывает на то, что используемое воздействие не влияет на данную норму реакции, а гибель организма — на то, что оно уже за пределами нормы реакции. Селекция высокопродуктивных форм растений, животных и микроорганизмов в значительной степени представляет собой отбор организмов с узкой и специализированной нормой реакции на такие внешние воздействия, как удобрения, обильное кормление, характер выращивания и др.

Таким образом, генотип представляет собой систему взаимодействующих генов, которые проявляются фенотипически в зависимости от условий генотипической среды и условий существования. Только благодаря использованию принципов менделевского анализа можно условно разложить эту сложную систему на элементарные признаки — фены и тем самым идентифицировать отдельные, дискретные единицы генотипа — гены.

#### **Модификации — изменения организма в пределах нормы реакции**

Существует множество примеров модификаций, вызываемых различными факторами внешней среды. Один из наиболее впечатляющих примеров — *определение пола после оплодотворения* у некоторых низших животных. У морского червя *ВолеШа* самцы и самки имеют одинаковый генотип. Если только что вылупившихся из яиц молодых червей изолировать и выращивать отдельно, то все они развиваются в самок. Если же вылупившихся животных выпустить вблизи взрослой самки, то некоторые из них проникают в хоботок взрослой особи и развиваются в микроскопических самцов, которые в конце концов мигрируют в половые пути самки. Здесь они живут в качестве паразитов, выполняя свою единственную функцию — оплодотворение яйцеклеток.

У некоторых позвоночных животных возможно фенотипическое (гормональное) переопределение пола, которое, как, например, у некоторых рыб, оказывается полным. Тем не менее в этих случаях дальнейшее расщепление по полу соответствует хромосомному механизму его определения.

Яркий пример модификационного изменения у животных — окраска шерсти *гималайского кролика*. Обычно при 20°C у этой породы шерсть белая, за исключением черных ушей, лап и пятна вокруг носа. При 30° С такие кролики чистых линий. В этих случаях для количественных признаков, доля изменчивости за счет взаимодействия генотип—среда может составлять более 50% от всей наблюдаемой изменчивости. Во-вторых, одни и те же факторы внешней среды могут быть причиной как модификационных, так и наследственных изменений, возникающих за счет мутаций и повышения частоты рекомбинации. При этом влияние среды на мутационный процесс и рекомбинацию опосредуется модификациями — онтогенетическими адаптациями развивающегося организма.

Различные стрессовые воздействия на организм не только индуцируют системы адаптации, повышающие устойчивость организма, но и активно влияют на наследственную изменчивость.

В связи с модификациями и генотипической изменчивостью представляют интерес полученные в последние годы данные о том, что одни и те же воздействия, вызывающие стрессовую адаптивную реакцию организма, могут активировать мигрирующие элементы генома.

влияние внешних воздействий на модификационную и наследственную изменчивость зависит от предшествующей онтогенетической адаптации к ним.

#### *Значение модификаций*

Адаптивная модификация является первой пробой реакции, при помощи которой организм как бы проверяет возможность замены и более успешного использования окружающей среды.

Роли модификаций в эволюционном процессе. Обусловленные нормой реакции адаптивные модификации дают возможность организму выжить и оставить потомство. При наличии такой возможности последующие *генокопии модификаций, т. е. мутации, фенотипическое проявление которых копирует модификация*, подхватываются естественным отбором и тем самым возрастает приспособленность организма к новым изменившимся условиям. Согласно закону Гаузе (1934) два вида не могут сосуществовать в одной и той же экологической нише, т. е. с равным успехом использовать одни и те же условия окружающей среды. Поэтому освоение новых условий представляет собой составную часть эволюционной дивергенции биологических форм.

В заключение следует еще раз обратиться к связи между модификационной и онтогенетической изменчивостью. Во многих случаях модификации (фенокопии, морфозы) возникают в результате влияния внешних факторов на процесс

реализации генетической информации на разных ее стадиях, в частности во время прохождения организмом критических стадий онтогенеза — детерминации клеток, закладки и дифференцировки органов. В некоторых случаях прослеживается общность механизмов, обеспечивающих адаптивные модификации и нормальное развитие организмов. Так, некоторые белки теплового шока дрозофилы закономерно появляются без каких бы то ни было резких внешних воздействий на определенных стадиях развития насекомого.

Знание нормы реакции организма, знание пределов его модификационной изменчивости имеет большое значение при конструировании новых форм растений, животных и микроорганизмов, полезных человеку. Особенно важно это для практики сельского хозяйства, цель которой — повышение продуктивности растений и животных не только путем внедрения новых селекционных форм — пород и сортов, но и максимальное использование возможностей каждой породы или сорта. Знание закономерностей модификационной изменчивости необходимо и для медицины, усилия которой направлены в настоящее время не на изменение генетических потенций человека, а на поддержание и развитие человеческого организма в пределах нормы реакции.

Все это определяет значение исследований модификационной изменчивости как одного из проявлений действия генов во взаимосвязи с факторами окружающей среды.

Рассматривая действие гена, его аллелей, необходимо учитывать не только генные взаимодействия и действие генов-модификаторов, но и модифицирующее действие среды, в которой развивается организм. Известно, что у примулы окраска цветка розовая ( $P$ ) — белая ( $pp$ ) наследуется по моногибридной схеме, если растения развиваются в интервале температур 15—25°C. Если же растения  $F_2$  вырастить при температуре 30—35°C, то все цветки у них оказываются белыми. Наконец, при выращивании растений  $F_2$  в условиях температуры, колеблющейся около 30 °C, можно получить разнообразные соотношения от 3P—:1pp до 100% растений с белыми цветками. Такое варьирующее соотношение классов при расщеплении в зависимости от условий внешней среды или от условий генотипической среды (так назвал С. С. Четвериков варьирование генотипа по генам-модификаторам) носит название варьирующей *пенетрантности*. Это понятие подразумевает возможность проявления или не проявления признака у организмов, одинаковых по исследуемому генотипическому фактору.

*Пенетрантность выражается долей особей, проявляющих исследуемый признак среди всех особей одинакового генотипа по контролируемому (изучаемому) гену.*

От внешней среды и генов-модификаторов может зависеть и степень выраженности признака. Например, дрозофила, гомози-готная по аллели  $vgvg$  (зачаточные крылья), более контрастно проявляет этот признак при понижении температуры. Другой признак дрозофилы — отсутствие глаз ( $eueu$ ) варьирует от 0 до 50% от числа фасеток, характерного для мух дикого типа.

*Степень проявления варьирующего признака называется экспрессивностью.* Экспрессивность обычно выражают количественно в зависимости от отклонения признака от дикого типа.

Оба понятия — пенетрантность и экспрессивность — были введены в 1925 г. Н. В. Тимофеевым-Ресовским для описания варьирующего проявления генов.

Норма реакции — способность реагировать на варьирующие условия развития. Норму реакции генотипа необходимо учитывать как при экспериментах, так и при выведении новых форм хозяйственно ценных организмов. Отсутствие изменений в проявлении признака указывает на то, что используемое воздействие не влияет на данную норму реакции, а гибель организма — на то, что оно уже за пределами нормы реакции.

Таким образом, генотип представляет собой систему взаимодействующих генов, которые проявляются фенотипически в зависимости от условий генотипической среды и условий существования. Только благодаря использованию принципов менделевского анализа можно условно разложить эту сложную систему на элементарные признаки — фен-ы и тем самым идентифицировать отдельные, дискретные единицы генотипа — гены.

Яркий пример модификационного изменения у животных — окраска шерсти *гималайского кролика*. Обычно при 20°C у этой породы шерсть белая, за исключением черных ушей, лап и пятна вокруг носа. При 30° C такие кролики вырастают сплошь белыми. Если же гималайскому кролику выбривают участок спины и охлаждают его, например привязывая пузырь со льдом, то в этой области вырастает черная шерсть.

Для каждой области тела есть свой порог температуры, выше которого вырастает *белая* шерсть, а ниже — черная. Следовательно, проявление аллели,  $c^h$  по которой гомозиготен гималайский кролик, зависит от температуры. Подобный опыт не может дать положительного результата с белым кроликом альбиносом ( $c^a c^a$ ).

Несколько приведенных примеров показывают, что определенные типы модификации возникают только у организмов определенного генотипа. Следовательно, способность к модификациям наследуется и характеризует генетически заданную норму реакции. Таким образом, было бы неверно рассматривать ненаследственную изменчивость — модификации — в отрыве от наследственной изменчивости. Возможность модификации определяется генотипом и реализуется при соответствующих изменениях внешней среды.

#### *Типы модификационных изменений*

Адаптивные модификации — это реакция клеток и организма на изменения условий среды, которые неоднократно действовали на организм в ходе эволюции. Все они — в пределах нормы реакции, заданной генотипом.

В большинстве случаев модификации не стойки и исчезают, как только прекращается действие вызвавшего их агента. Это не относится к морфозам и фенкопиям, отражающим вмешательство внешних факторов в процессы реализации признака на критической стадии онтогенеза — в момент закладки или дифференцировки исследуемого органа. Такие модификации сохраняются в течение всей жизни особи. Необратимость подобных изменений в онтогенезе объясняется необратимостью индивидуального развития.

Сложнее обстоит дело с некоторыми модификациями на клеточном уровне. Известно несколько примеров так называемых *длительных модификаций*. У пресноводного рачка гиалодафии в зависимости от питания изменяется

высота головы. При обильном питании и повышенной температуре высота головного шлема увеличивается, а при скудном питании и пониженной температуре — уменьшается. Эти морфологические особенности сохраняются при получении партеногенетического потомства и содержании различающихся вариантов в одинаковых условиях, однако различия постепенно сглаживаются и полностью исчезают к третьему партеногенетическому поколению.

#### *Механизмы модификаций*

Причины модификационных изменений, особенно адаптивных модификаций, следует искать в механизмах регуляции действия генов. Механизмы регуляции лучше исследованы у прокариот и значительно хуже у эукариот. Очевидно, индукция адаптивных ферментов, регулируемых по оперонной схеме у бактерий, представляет пример *адаптивной модификации*. Действительно, адаптация клеток *E. coli* к лактозе как к новому субстрату представляет модификационное изменение в пределах нормы реакции клетки.

Знание нормы реакции организма, знание пределов его модификационной изменчивости имеет большое значение при конструировании новых форм растений, животных и микроорганизмов, полезных человеку. Особенно важно это для практики сельского хозяйства, цель которой — повышение продуктивности растений и животных не только путем внедрения новых селекционных форм — пород и сортов, но и максимальное использование возможностей каждой породы или сорта. Знание закономерностей модификационной изменчивости необходимо и для медицины, усилия которой направлены в настоящее время не на изменение генетических потенций человека, а на поддержание и развитие человеческого организма в пределах нормы реакции.

Все это определяет значение исследований модификационной изменчивости как одного из проявлений действия генов во взаимосвязи с факторами окружающей среды.

### **?? ЗАКОН ГОМОЛОГИЧНЫХ РЯДОВ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ Н.И. ВАВИЛОВА.**

Крупнейшим обобщением работ по изучению изменчивости в начале XX в. стал закон гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова (1920г, III Всерос. селекц. съезд, Саратов). Согласно этому закону близким видам и родам организмов свойственны сходные ряды наследственной изменчивости. Чем ближе таксономически рассматриваемые организмы, тем большее сходство наблюдается в ряду (спектре) их изменчивости. З-н Вавилова имеет большое значение для селекционной практики, поскольку прогнозирует поиск определенных форм культурных растений и животных. Зная характер изменчивости одного или нескольких близких видов, можно целенаправленно искать формы, еще не известные у данного организма, но уже открытые для его таксономических родственников. З-н гомолог. рядов заложил основы сравнительной генетики.

### **30. ТЕСТЫ НА АЛЛЕЛИЗМ. (Т. МОРГАН, ДЛЯ АНАЛИЗА РЕЦЕССИВНЫХ МУТАЦИЙ):**

1) Функциональный тест - функциональное сходство рецессивных аллелей определялось по проявлению мутантного фенотипа у гетерозигот. Нормальное – неаллельность рецессивных мутаций.

2) Рекомбинационный тест – мутации признавались неаллельными, если между ними происходил кроссинговер.

3) Цис-транс-тест – сравнение фенотипов гетерозигот с цис- и транс- положениями аллелей. Цис- (аллели локализованы одной из гомологичных хромосом) как по аллельным, так и неаллельным мутациям имеют нормальный фенотип. Транс- (аллели расположены в разных гомологах) по аллельным мутациям фенотип мутантный, по неаллельным – мутантный. Существуют два осн. критерия аллелизма при помощи которых мутационные изменения относят к одному и тому же или к разным генам. Длительное время сопоставление этих критериев аллелизма и противоречия, возникающие между ними, были основными движущими силами в развитии теории гена.

Рекомбинантный критерий – если мутации не рекомбинируют, то они аллельны, т.е. затрагивают один и тот же ген.

Функциональный критерий – основан на скрещивании мутантов и выяснении, нарушают ли мутации одну и ту же функцию, или разные функции. Этот критерий применим только к рецессивным мутациям. Согласно этому критерию, если 2 мутации объединяются путем скрещивания в F1 и не поврежденные мутациями участки генетического материала взаимодействуют комплементарно, т.е. образуется гибрид дикого типа, то мутации относят к разным генам. (образуется дигетерозигота.). Если при объединении в F1 двух мутаций возникает гибрид мутантного фенотипа, след. обе мутации повреждают один и тот же ген (образуется аллельная комбинация или компаунд)

#### Противоречия критериев аллелизма:

В 20-30-е годы А. С. Серебровский открыл явление ступенчатого аллеломорфизма, при изучении локуса sc-ac, кот. контролирует развитие щетинок у *D. Melanogaster*. Оказалось, что независимо возникающие мутации в локусе sc-ac (при воздействии X-лучей) вступают в сложные отношения аллелизма. При объединении независимо возникающий мутантных аллелей в компаунде обычно редуцировались лишь те щетинки, которые были утрачены у обоих родителей. “Псевдоаллелизм” – рекомбинация между мутациями, аллельными на основании функционального теста.

### **31. НЕХРОМОСОМНАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ.**

Прокариоты: плазмиды+ инсерции, транспозоны, бактериофаги. Эукариоты – МТХ или хлоропласты \_ мобильные диспергированные гены, транспозоны, вирусы.

Митохондриальный геном человека – кольцевая двуцепочечная ДНК их 16559 п.н. 5% от общего кол-ва ДНК. мтДНК состоит из Н-(больше пурина) и Л-цепей (больше пиримидина). В составе генома: гены рибосомных 16S-12S- рРНК, 22 гена тРНК, гены трёх субъединиц цитохром-с-оксидазы, шестой и восьмой субъединиц АТФазы, ген цитохрома и, гены семи субъединиц NADH- дегидрогеназы. В Н-цепи есть некодирующий район – D-петля, содержащий участки инициации репликации и транскрипции: точку инициации репликации, сайты связывания транскрипционного фактора mtTF, промотор лёгкой цепи, два промотора тяжёлой цепи.

Репликация *vnLYR* происходит с образованием D- петли на тя жёлой цепи.

Мех-мы насл-я убеждают в том, что кл. может содержать сложную сист. полуавтономных взаимодействующих генетических единиц, находящихся не только в хромосомах ядра, но и в нуклеоплазме, в клет. органеллах (пластидах, митох. и др.), а также в цитоплазме. Насл-е этих генет. детерминант порой трудно отличить от насл-я эндосимбионтов и вирусов. Особенно это касается вирусов, поскольку провирусы могут объединяться с геномом клетки в ее ядре и приобр. свойства, характерные для эписом в интегрированном состоянии, т.е. наследоваться как часть генет. материала ядра.

**Критерии.** Прежде всего, нехромосомное наследование выражается в различии результатов реципрокных скрещиваний там, где их можно провести, используя явление гетерогамии. Однако различный результат реципр. скрещ-й м.б. получен и при сцеплении с полом. Поэтому дополн. критер. могут служить насыщающие скрещивания с заменой всех хром-м жен. орг-ма на хром-мы муж. орг-ма (наследование ЦМС у кукурузы).

В случае изогамии о нехромос. насл-ии может свидетельствовать отсутствие расщепления в скрещивании при гаметическом анализе, напр. в тетрадах, но наличие постзиготических расщеплений в митозах, как это бывает при наследовании признаков митохондрий у дрожжей, или расщепление в митозах у гаплоидных сегрегантов, как это показано для признаков хлоропласта у хламидомонады. При этом правда трудно различить насл-е через органеллы цитоплазмы и ядерное плазмидное наследование. Нек-рые спец. приемы позвол. разграничить и эти случаи, напр. исп-е цитодукции у дрожжей, вегет. расщеп-е гетерокарионов у мицелиальных грибов.

Дополн. крит-ем может служить повышенная чувств-ть ДНК клет. органелл или плазмид к нек-рым агентам. Так, при обработке бромистым этидием у дрожжей теряется мтДНК. Гуанидингидрохлорид и фторурацил изгоняют из дрожжей двунитевую РНК штаммов-убийц и нек-рые другие нехромос. детерминанты.

Трудно разделить насл-е через органеллы и плазмиды, с одной ст., и через эндосимбионтов и вирусы, с др. Наряду с генет. критериями, здесь необх. комплекс биохим. и цитолог. подходов..

**ЦМС** (цитоплазм. муж. стерильность) – форма муж. стер. наслед. по материнск. типу.

**Митох.** – самовоиспр. автономные органеллы клетки сод. кольц. ДНК, отл. от ДНК ядра и апп. белк. синтеза.

В кл. могут присутств. нек-рые необязат. для нее эл-ты: вирусоподобные частицы, плазмиды. Присутствие **эндосимбионтов** м.б. причиной появления признаков, придающих их носителям известное селективное преимущество, напр. каппа-частицы (*Caudobacter taeniospiralis*) – эндосимбионты тубельки; линии без самцов у дрозофилы – спирохеты в яйцах, убивают только мужские эмбрионы.

У дрозофилы – «прыгающие» гены (напоминают ретровирусы) – мигрирующие эл-ты, меняющие локализацию в геноме; несколько тип в экстрахромосомных эл-тов, напр. эл-т  $\delta$  (похож по поведению на ретровирус) - насл. через цитоплазму по материнскому типу, убивает эмбрионы со 2-й хромосомой, чувствительной к нему.

Симбиогенетическое происхождение эукариотической клетки – бактериальное происх-е хлоропластов, митох. и др. орг. сод. ДНК( кинетосом у простейш.)

Митохондриальная ДНК (мтДНК) — ДНК, локализованная (в отличие от ядерной ДНК) в митохондриях, органоидах эукариотических клеток. Митохондриальная ДНК была открыта Маргит Насс и Сильвен Насс в 1963 году в Стокгольмском университете при помощи электронной микроскопии и, независимо, учеными Эллен Харлсбруннер, Хансом Туппи и Готтфридом Шацем при биохимическом анализе фракций митохондрий дрожжей в Венском университете в 1964 году. Согласно эндосимбиотической теории, митохондриальная ДНК произошла от кольцевых молекул ДНК бактерий и поэтому имеет иное происхождение, чем ядерный геном. Сейчас преобладает точка зрения, согласно которой митохондрии имеют монофилетическое происхождение, то есть были приобретены предками эукариот лишь однажды.

На основании сходства в последовательностях нуклеотидов ДНК ближайшими родственниками митохондрий среди ныне живущих прокариот считают альфа-протеобактерий (выдвигалась также гипотеза, что к митохондриям близки риккетсии). Сравнительный анализ геномов митохондрий показывает, что в ходе эволюции происходило постепенное перемещение генов предков современных митохондрий в ядро клетки. Необъяснимыми с эволюционной точки зрения остаются некоторые особенности митохондриальной ДНК (например, довольно большое число интронов, нетрадиционное использование триплетов и др.). Ввиду ограниченного размера митохондриального генома бóльшая часть митохондриальных белков кодируется в ядре. При этом бóльшая часть митохондриальных тРНК кодируются митохондриальным геномом.

У большинства изученных организмов митохондрии содержат только кольцевые молекулы ДНК, у некоторых растений одновременно присутствуют и кольцевые, и линейные молекулы, а у ряда протистов (например, инфузорий) имеются только линейные молекулы.

Митохондрии млекопитающих обычно содержат от двух до десяти идентичных копий кольцевых молекул ДНК. У растений каждая митохондрия содержит несколько молекул ДНК разного размера, которые способны к рекомбинации. У протистов из отряда кинетопластид (например, у трипаносом) в особом участке митохондрии (кинетопласте) содержится два типа молекул ДНК — идентичные макси-кольца (20-50 штук) длиной около 21 т.п.о. и мини-кольца (20 000 — 55 000 штук, около 300 разновидностей, средняя длина около 1000 п.о.). Все кольца соединены в единую сеть (катенаны), которая разрушается и восстанавливается при каждом цикле репликации. Макси-кольца гомологичны митохондриальной ДНК других организмов. Каждое мини-кольцо содержит четыре сходных консервативных участка и четыре уникальных гипервариабельных участка.[6] В мини-кольцах закодированы короткие молекулы направляющих РНК (guideRNA), которые осуществляют редактирование РНК, транскрибируемых с генов макси-колец.

Устойчивость митохондриальной ДНК: Митохондриальная ДНК особенно чувствительна к активным формам кислорода, генерируемым дыхательной цепью, в связи с непосредственной их близостью. Хотя митохондриальная ДНК связана с белками, их защитная роль менее выражена, чем в случае ядерной ДНК. Мутации в ДНК митохондрий могут вызывать наследственные заболевания, а также являются одной из основных причин старения и болезней, связанных со

старостью. У человека митохондриальная ДНК обычно присутствует в количестве 100-10000 копий на клетку (сперматозоиды и яйцеклетки являются исключением). С множественностью митохондриальных геномов связаны особенности проявления митохондриальных болезней — обычно позднее их начало и очень изменчивые симптомы.

### **Митохондриальная наследственность:**

#### **1. Наследование по материнской линии**

У большинства многоклеточных организмов митохондриальная ДНК наследуется по материнской линии. Яйцеклетка содержит на несколько порядков больше копий митохондриальной ДНК, чем сперматозоид. В сперматозоиде обычно не больше десятка митохондрий (у человека — одна спирально закрученная митохондрия), в небольших яйцеклетках морского ежа — несколько сотен тысяч, а в крупных ооцитах лягушки — десятки миллионов. Кроме того, обычно происходит деградация митохондрий сперматозоида после оплодотворения. При половом размножении митохондрии, как правило, наследуются исключительно по материнской линии, митохондрии сперматозоида обычно разрушаются после оплодотворения. Кроме того, большая часть митохондрий сперматозоида находится в основании жгутика, которое при оплодотворении иногда теряется. В 1999 году было обнаружено, что митохондрии сперматозоидов помечены убиквитином (белком-меткой, которая приводит к разрушению отцовских митохондрий в зиготе).

Так как митохондриальная ДНК не является высококонсервативной и имеет высокую скорость мутирования, она является хорошим объектом для изучения филогении (эволюционного родства) живых организмов. Для этого определяют последовательности митохондриальной ДНК у разных видов и сравнивают их при помощи специальных компьютерных программ и получают эволюционное древо для изученных видов. Исследование митохондриальной ДНК собак позволило проследить происхождение собак от диких волков.[9] Исследование митохондриальной ДНК в популяциях человека позволило вычислить «митохондриальную Евю», гипотетическую прародительницу всех живущих в настоящее время людей.

#### **2. Наследование по отцовской линии**

Для некоторых видов показана передача митохондриальной ДНК по мужской линии, например, у мидий. Наследование митохондрий по отцовской линии также описано для некоторых насекомых, например, для дрозофилы, медоносных пчел и цикад.

Существуют также данные о митохондриальной наследственности по мужской линии у млекопитающих. Описаны случаи такого наследования для мышей, при этом митохондрии, полученные от самца, впоследствии отторгаются. Такое явление показано для овец и клонированного крупного рогатого скота. Также описан единственный случай связанный с бесплодием у мужчины.

### **Геном митохондрий**

У млекопитающих каждая молекула мтДНК содержит 15000-17000 пар оснований (у человека 16565 пар нуклеотидов — исследование закончено в 1981 году, по другому источнику 16569 пар) и кодирует 37 генов — 13 кодируют белки, 22 — гены тРНК, 2 — рРНК (по одному гену для 12S и 16S рРНК). Другие многоклеточные несут схожий набор митохондриальных генов, хотя некоторые гены могут иногда отсутствовать. Разнообразие генового состава мтДНК растений, грибов и особенно протистов различается более значительно. Так, у жгутиконосца-якобиды *Reclinomonas americana* найден наиболее полный из известных митохондриальных геномов: он содержит 97 генов, в том числе 62 гена, кодирующих белки (27 рибосомальных белков, 23 белка, участвующих в работе электрон-транспортной цепи и в окислительном фосфорилировании, а также субъединицы РНК-полимеразы).

Один из наиболее маленьких митохондриальных геномов имеет малярийный плазмодий (около 6.000 п.о., содержит два гена рРНК и три гена, кодирующих белки). Недавно открытые рудиментарные митохондрии (митосомы) некоторых протистов (дизентерийной амёбы, микроспоридий и лямблий) не содержат ДНК. Митохондрии дрожжей содержат 78000 пар нуклеотидов.

Некоторые растения имеют огромные молекулы митохондриальной ДНК (до 25 миллионов пар оснований), при этом содержащие примерно те же гены и в том же количестве, что и меньшие мтДНК. Длина митохондриальной ДНК может широко варьировать даже у растений одного семейства. В митохондриальной ДНК растений имеются некодирующие повторяющиеся последовательности.

Геном человека содержит только по одному промотору на каждую комплементарную цепь ДНК.

Кодирующие последовательности (кодоны) митохондриального генома имеют некоторые отличия от кодирующих последовательностей универсальной ядерной ДНК.

Так, кодон AUA кодирует в митохондриальном геноме метионин (вместо изолейцина в ядерной ДНК), кодоны AGA и AGG — терминаторные кодоны (в ядерной ДНК кодируют аргинин), кодон UGA в митохондриальном геноме кодирует триптофан.

Если говорить точнее, то речь идёт не о митохондриальной ДНК, а о мРНК, которая списывается (транскрибируется) с этой ДНК перед началом синтеза белка. Буква U в обозначении кодона обозначает уридин, который при транскрипции гена в РНК заменяет тимин.

Количество генов тРНК (22 гена) меньше, чем в ядерном геноме с его 32 генами тРНК.

В человеческом митохондриальном геноме информация настолько сконцентрирована, что в последовательностях кодирующих мРНК, как правило, частично удалены нуклеотиды, соответствующие 3'-концевым терминаторным кодонам.

Применение: Кроме изучения для построения различных филогенетических теорий, изучение митохондриального генома — основной инструмент при проведении идентификации. Возможность идентификации связана с существующими в митохондриальном геноме человека групповыми и даже индивидуальными различиями.

## **32. МЕТОДЫ ГЕНЕТИКИ ЧЕЛОВЕКА. КЛАССИФИКАЦИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ.**

Моногенные менделирующие, хромосомные синдромы, мультифакторные аболевания, моногенные с нетрадиционным типом наследования.

Методы: 1) Клинико-генеалогический: клиническое обследование, составление родословной, генеалогический анализ. Пробанд – лицо, первое попавшее в поле зрения исследователя. Сибс – дети одной супружеской пары. Полусибсы.

2) Близнецовый метод – сравнение моно- и дизиготных близнецов. В результате получают расчёт показателей соответствия (конкордантности – показатель идентичности пары по определённому признаку; соответствует доле сходных по изучаемому признаку пар среди обследованных пар близнецов по данному признаку для каждой шруппы) и несоответствия (дисконкордантности – как правило, для дизиготных – признак выявлен только у одного из жвух), а так же вычисление частоты возникновения заболевания/признака в каждой группе близнецов. Принципы (по Сименсу): составление выборки, определение типа зиготности, собственно оценка результатов сопоставленных пар. 3) Популяционно-статистические

## **33. МОНОГЕННЫЕ НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ. ДИАГНОСТИКА И ВОЗМОЖНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.**

Моногенные болезни наследуются в соответствии с законами классической генетики Менделя. Соответственно этому, для них генеалогическое исследование позволяет выявить один из трёх типов наследования: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и сцепленное с полом наследование.

Это наиболее широкая группа наследственных заболеваний. В настоящее время описано более 4000 вариантов моногенных наследственных болезней, подавляющее большинство которых встречается довольно редко (например, частота серповидноклеточной анемии — 1/6000).

Широкий круг моногенных болезней образуют наследственные нарушения обмена веществ, возникновение которых связано с мутацией генов, контролирующей синтез ферментов и обуславливающих их дефицит или дефект строения — ферментопатии.

Митохондриальные заболевания — группа наследственных заболеваний, связанных с дефектами в функционировании митохондрий, приводящими к нарушениям энергетических функций в клетках эукариотов, в частности — человека.

Митохондриальные заболевания обусловлены генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий, приводящими к нарушениям тканевого дыхания. Они передаются только по женской линии, к детям обоих полов, так как сперматозоиды переносят половину геномной информации, а яйцеклетка — поставляет и вторую половину генома, и митохондрии. Патологические нарушения клеточного энергетического обмена могут проявляться в виде дефектов различных звеньев в цикле Кребса, в дыхательной цепи, процессах бета-окисления и т. д.

Не все ферменты и другие регуляторы, необходимые для эффективного функционирования митохондрий кодируются митохондриальной ДНК. Большая часть митохондриальных функций контролируется ядерной ДНК.

Можно выделить 2 группы митохондриальных заболеваний:

Ярко выраженные наследственные синдромы, обусловленные мутациями генов, ответственных за митохондриальные белки (синдром Барта, синдром Кернса-Сейра, синдром Пирсона, синдром MELAS, синдром MERRF и другие).

«Вторичные митохондриальные заболевания», включающие нарушение клеточного энергообмена как важное звено формирования патогенеза (болезни соединительной ткани, синдром хронической усталости, гликогеноз, кардиомиопатия, мигрень, печеночная недостаточность, панцитопения, а также гипопаратиреоз, диабет, рахит и другие).

Дефекты и симптомы: Эффекты митохондриальных заболеваний очень разнообразны. Из-за различного распределения дефектных митохондрий в разных органах, мутация у одного человека может привести к заболеванию печени, а у другого — к заболеванию мозга. Величина проявления дефекта может быть большой или малой, и она может существенно изменяться, медленно нарастая во времени. Некоторые небольшие дефекты приводят лишь к неспособности пациента выдерживать физическую нагрузку, соответствующую его возрасту и не сопровождаются серьёзными болезненными проявлениями. Другие дефекты могут быть более опасны, приводя к серьёзной патологии.

В общем случае митохондриальные заболевания проявляются сильнее при локализации дефектных митохондрий в мышцах, мозге, нервной ткани,[2] поскольку эти органы требуют больше всего энергии для выполнения соответствующих функций.

Несмотря на то, что протекание митохондриальных заболеваний сильно отличаются у разных пациентов, на основании общих симптомов и конкретных мутаций, вызывающих болезнь, выделено несколько основных классов этих заболеваний.

### Типы заболеваний

Помимо относительно распространённой митохондриальной миопатии, встречаются:

Сахарный диабет, сопровождающийся глухотой (DAD, MIDD): Это сочетание в раннем возрасте может быть вызвано мутацией митохондриального гена MT-TL1, но сахарный диабет и глухота могут быть вызваны как митохондриальными заболеваниями, так и иными причинами

наследственная оптическая нейропатия Лебера (en:Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)), характеризующийся потерей зрения в раннем пубертатном периоде;

синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта (en:Wolff-Parkinson-White syndrome)

рассеянный склероз и подобные ему заболевания;

синдром Лея (Leigh) или подострая некротизирующая энцефаломиопатия : После начала нормального постнатального развития организма болезнь обычно развивается в конце первого года жизни, но иногда проявляется у взрослых.

Болезнь сопровождается быстрой потерей функций организма и характеризуется судорогами, нарушенным состоянием сознания, деменцией, остановкой дыхания

«Нейропатия, атаксия, retinitis pigmentos и птоз» en:Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa, and ptosis (NARP):

прогрессирующие симптомы нейропатии, атаксии, тунельное зрение и потеря зрения, птоз, деменция;

Митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефалопатия en:Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): гастроинтестинальная псевдообструкция и кахексией, нейропатия, энцефалопатия с изменениями белого вещества головного мозга

Диагностика: Для постановки диагноза митохондриального заболевания важен комплексный генеалогический, клинический, биохимический, морфологический и генетический анализ.

Эпидемиология: Изначально мутации мтДНК считались крайне редкими, однако исследование 3000 здоровых новорожденных на 10 наиболее известных патогенных мутаций, проведенное в 2008 году, выявило таковые у одного человека из 200. "Горячей точкой" в мтДНК оказалась позиция 3243, здесь часто происходит замена А-Г, изменяющая функционирование гена МТ-TL1.

Лечение: В настоящее время лечение митохондриальных заболеваний находится в стадии разработки, но распространённым терапевтическим методом служит симптоматическая профилактика с помощью витаминов. Также в качестве одного из методов применяются пируваты .

Поскольку в сперматозоиде, который вносит половину хромосом будущего организма, содержится мало митохондрий, митохондриальная наследственность определяется, в основном, митохондриями яйцеклетки. Сейчас проводятся экспериментальные работы по экстракорпоральному (in vitro) оплодотворению с использованием переноса ядра оплодотворённой яйцеклетки в безъядерную цитоплазму другой яйцеклетки с нормально функционирующими митохондриями (замена ядра).

#### **34. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫЕ НАРУШЕНИЯМИ ЧИСЛА И СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМ.**

Болезни, обусловленные нарушением числа аутосом (неполовых) хромосом

синдром Дауна — трисомия по 21 хромосоме, к признакам относятся: слабоумие, задержка роста, характерная внешность, изменения дерматоглифики;

синдром Патау — трисомия по 13 хромосоме, характеризуется множественными пороками развития, идиотией, часто — полидактилия, нарушения строения половых органов, глухота; практически все больные не доживают до одного года; синдром Эдвардса — трисомия по 18 хромосоме.

Болезни, связанные с нарушением числа половых хромосом: синдром Шерешевского-Тернера — отсутствие одной X-хромосомы у женщин (45 XO) вследствие нарушения расхождения половых хромосом; к признакам относится низкорослость, половой инфантилизм и бесплодие, различные соматические нарушения (микрогнатия, короткая шея и др.);

полисомия по X-хромосоме — включает трисомию (кариотип 47, XXX), тетрасомию (48, XXXX), пентасомию (49, XXXXX), отмечается незначительное снижение интеллекта, повышенная вероятность развития психозов и шизофрении с неблагоприятным типом течения;

синдром Кляйнфельтера — полисомия по X- и Y-хромосомам у мальчиков (47, XXY; 47, XYY, 48, XXYY и др.), признаки: евнухоидный тип сложения, гинекомастия, слабый рост волос на лице, в подмышечных впадинах и на лобке, половой инфантилизм, бесплодие; умственное развитие отстает, однако иногда интеллект нормальный.

Болезни, причиной которых является полиплоидия: триплоидии, тетраплоидии и т. д.; причина — нарушение процесса мейоза вследствие мутации, в результате чего дочерняя половая клетка получает вместо гаплоидного (23) диплоидный (46) набор хромосом, то есть 69 хромосом (у мужчин кариотип 69, XYY, у женщин — 69, XXX); почти всегда летальны до рождения.

Нарушения структуры хромосом: Транслокации — обменные перестройки между негомологичными хромосомами.

Делеции — потери участка хромосомы. Например, синдром «кошачьего крика» связан с делецией короткого плеча 5-ой хромосомы. Признаком его служит необычный плач детей, напоминающий мяуканье или крик кошки. Это связано с патологией гортани или голосовых связок. Наиболее типичным, помимо «кошачьего крика», является умственное и физическое недоразвитие, микроцефалия (аномально уменьшенная голова). Инверсии — повороты участка хромосомы на 180 градусов. Дупликации — удвоения участка хромосомы. Изохромосомия — хромосомы с повторяющимся генетическим материалом в обоих плечах. Возникновение кольцевых хромосом — соединение двух концевых делеций в обоих плечах хромосомы.

В настоящее время у человека известно более 700 заболеваний, вызванных изменением числа или структуры хромосом. Около 25 % приходится на аутосомные трисомии, 46 % — на патологию половых хромосом. Структурные перестройки составляют 10,4 %. Среди хромосомных перестроек наиболее часто встречаются транслокации и делеции.

#### **35. ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ГЕНОТЕРАПИЯ. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ**

Генная терапия — совокупность генно-инженерных и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека путем введения в организм рекомбинантных генетических конструкций с лечебной целью. А. Вирусная —

1. Рнк-содержащие вирусы- ретровирусы (онковирусы, лентивирусы); 2. ДНК-содержащие вирусы: аденовирусы, вирус герпеса, аденоассоциированные вирусы. Б. Невирусная — Прямая инъекция ДНК в клетку, ткань, орган; Липофекция; Электрокорпорация; "Генное ружьё", рецептор-опосредованный эндоцитоз.



### Перспективы лечения наследственных болезней. Генотерапия. Медико-генетическое консультирование.

известно около 2000 ген. Изучение и возможное предотвращение последствий ген-дефектов — предмет мед. Г. Наследственные болезни можно подразделить на 3 гр: болезни обмена веществ (*альбинизм, алкаптонурия, тирозиноз, фенилкетонурия*), молекулярные болезни, которые вызваны генными мутациями (*гемоглобинопатия*), и хромосомные болезни (тип нас. заб. связан с изменениями числа или структуры хромосом).

Моносомия всего организма для X-хромосомы (*синдром Шерешевского*). Женщины-трисомии с кариотипом 47, XXX нормальны в умственном и физическом отношении, плодовиты и не обнаруживают отклонений в половом развитии. С увеличением числа X увеличивается частота отклонения от нормы: умственная неполноценность, аномалии зубов, нарушения формы черепа, изменения других частей скелета, нарушение системы половых органов. Различные комбинации X- и Y-хромосом при полисомии по половым хромосомам, кроме XYY, объединяют под общим названием *синдрома Клайнфельтера*. Из числа аутосомных болезней наиболее подробно изучена трисомия по 21-й хромосоме, или *синдром Дауна*.

Меры, принятые при раннем выявлении наследственных болезней, могут предотвратить их развитие. Диетологические меры позволяют избежать патологических последствий, например при *галактоземии, фенилкетонурии* и других наследственных болезнях обмена.

Плейотропия, специфические проявления мутантных признаков характерны для наследственной изменчивости, говорить об излечении нельзя, поскольку причина болезни — изменение генетического материала.

*пренатальная диагностика, метод амниоцентеза* (можно опер. более 100 хромосомных и генных аномалий в первые недели беременности, возможно прерывание беременности.) Выяснение метаболических и молекулярных причин наследственного заболевания дает возможность компенсировать дефект в порядке модификационных изменений — *фенотипировать норму*. (при *гемофилии А* синтетич. фактор свёрт. кр. VIII, ген его рекордно большой, след. ввели выделенный по частям и сшитый из кусочков в кл. китайского хомьяка.)

Выделение и клонирование нормальных генов человека все больше позволяет надеяться на то, что возникнет новая отрасль медицины — *генотерапия*. Генотерапия позволит заменять дефектные гены нормальными и тем самым устранять причину болезни, а не ее симптомы.

Медико-генетическое консультирование определение *гетерозиготного носительства*, т. е. выявление в популяции индивидуумов, которые сами не страдают от наследственного заболевания, но гетерозиготны по рецессивной мутации, которая способна его вызвать. вычислить вероятность появления у них потомка — гомозиготного по рецессивной аллели.

### **36. БЛИЗНЕЦОВЫЙ МЕТОД В ГЕНЕТИКЕ ЧЕЛОВЕКА. МОНО- И ДИЗИГОТНЫЕ БЛИЗНЕЦЫ. КОНКОРДАНТНОСТЬ И ДИСКОРДАНТНОСТЬ.**

Близнецовый метод — изучение генотипических и фенотипических особенностей однояйцевых и разнояйцевых близнецов. Результат изучения — определение относительного значения наследственности и окружающей среды в формировании и развитии человеческого организма.

Монозиготные близнецы образуются из одной зиготы, разделившейся на стадии дробления на две (или более) части. Они обладают одинаковыми генотипами. Монозиготные близнецы всегда одного пола. Дизиготные близнецы развиваются в том случае, если одновременно две яйцеклетки оплодотворены двумя сперматозоидами. Естественно, дизиготные близнецы имеют различные генотипы. Они сходны между собой не более, чем братья и сестры, т. к. имеют около 50 % идентичных генов. Общая частота рождения близнецов составляет примерно 1 %, из них около 1/3 приходится на монозиготных близнецов. Известно, что число рождений монозиготных близнецов сходно в разных популяциях, в то время как для дизиготных это число существенно различается. Например, в США дизиготные близнецы рождаются чаще среди представителей негроидной расы, чем среди представителей европеоидной расы. В Европе частота появления дизиготных близнецов составляет 8 на 1000 рождений. Однако в отдельных популяциях их бывает больше. Самая низкая частота рождения близнецов присуща монголоидным популяциям, особенно в Японии. Полагают, что многоплодие генетически обусловлено. Однако это справедливо лишь для дизиготных близнецов. Факторы, влияющие на частоту рождения близнецов, в настоящее время мало изучены. Есть данные, показывающие, что вероятность рождения дизиготных близнецов повышается с увеличением возраста матери, а так же порядкового номера рождения. Влияние возраста матери объясняется, вероятно, повышением уровня гонадотропина, что приводит к учащению полиовуляции. Имеются также данные о снижении частоты рождения близнецов почти во всех индустриальных странах. Отмечается, что частота врожденных уродств у близнецов, как правило, выше, чем у одиночно рожденных.

Основоположник близнецового метода — Ф. Гальтон, который предложил сравнивать близнецов для выяснения влияния наследственности на проявление признаков. Близнецовый метод основан на 3 положениях:

1. ОБ имеют идентичные генотипы, а РБ — различные генотипы.
2. Среда, в которой развиваются близнецы и под действием которой появляются различия признаков ОБ, может быть одинаковой и неодинаковой для одной и той же пары ОБ.
3. Все свойства организма определяются взаимодействием генотипа и среды.

ОБ и РБ обычно сравнивают по ряду показателей на большом материале. На основе полученных данных вычисляют показатели конкордантности (частоты сходства) и дискордантности (частоты различий). Данные показывают, что у ОБ конкордантность значительно выше, чем у РБ, однако степень сходства различных признаков варьирует.

$H = (M\% - D\%) / (100 - D\%)$ , где H — доля наследственности, M — конкордантность у ОБ, D — конкордантность у РБ.

	ОБ	РБ
Группы крови	100	64
Форма бровей	100	51
Цвет глаз	99,5	28
Цвет волос	97	23
Косолапость	23	2
Даун	89	7
Рак	16	14
Эпилепсия	67	3
шизофрения	80	13

### 37. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ГЕНЕ.

В настоящее время ген определяют как структурную единицу генетической информации, далее неделимую в функциональном отношении. Ген представлен участком молекулы ДНК (реже РНК). Понятие гена как дискретной единицы, выявляемой менделевским гибридологическим анализом, ввел В. Л. Иогансен в 1909 году.

Т. Х. Морган 1926 "Теория гена": ген это –

1. единица мутации, т. е. Ген изменяется как целое
2. ед. рекомбинации, т.е. кроссинговер никогда не наблюдается в пределах гена
3. ед. функции, т.е. все мутации гена нарушают одну и ту же генетическую ф-ю, что выражается в их

некомплементарности у особей F1 при попарном скрещивании мутантов.

Геномика – наука о геноме. Геном – вся совокупность генов (бывает ядерный, пластидный, митохондриальный геном).

Геномика бывает:

1. Структурная – структурная организация генома в целом
2. Функциональная
3. Эволюционная

Геном состоит из:

- Гены 3-5%
- Подвижные элементы 20-45%
- Сателлитные ДНК, микросателлитные ДНК

Метод Microarray – изучает экспрессию всех генов.

### 38. ТРАНСФОРМАЦИЯ (ТФ) КАК ПРОЦЕСС ПЕРЕДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ. СТАДИИ ТФ. РЕКОМБИНАЦИИ ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ. РОЛЬ ТФ В ГОРИЗОНТАЛЬНОМ ПЕРЕНОСЕ ГЕНОВ

Трансформация бактерий - перенос ДНЛ, изолированной из одних клеток в другие. При ТФ ДНК, выдел. из кл. одного штамма, поглощают кл. др. штамма - реципиента. С пом. генет. маркеров об этом м. судить по измен. фенот. реципиента.

ТФ не возможна у некот. бактерий: *Diplococcus*, *Neomophilus*, *Neisseria*, *Bacillus*, актиномицетов, циано-бакт. Лучше всего изуч. у *D/ pneumonia*, *B. subtilis*, *H. influenzae*.

Для того чтобы ДНК проник. в бак. кл, кл. долж. наход. в сост. компетентности. Компет-сть приобрет. лишь частью кл. обыч. в серед. логарифмической стад. роста (способ. особ. белок) (если есть хлорамфеникол – ингибитор. белк. синтеза комп. не разв; добавл. антибиотик к компетентн.- не подавл.). => белок, стим. комп-сть, вырабат. в ходе роста.

ДНК связ. с -тью компет. кл, эта ДНК имеет  $Mr = 1 \cdot 10^7$  Д, 0,5 % бак. хромос.-> связан. ДНК расщепл. спец. нуклеазами до фрагмент. с  $Mr = 4-5 \cdot 10^5$  Д. -> Фрагменты ДНК проник. в кл. Некот. (пневмококки) могут неспец. поглощать ДНК из разл. источн. Некот. (*Neomophilus*) поглощ. лишь свою(гомологическую ДНК). Фрагменты менее  $5 \cdot 10^5$  Д в клетку не проникают.

В бак. 2цепоч. ДНК превращ. в 1цепоч.: 1 нить деградирует. На заключительной стадии происх. интеграция 1цепоч. трансформирующего фрагмента с ДНК клетки-реципиента. Репликация не треб., включаемый фрагм. физич. объед. с ДНК реципиента. Весь процесс 10—30 мин. Частота 1 %.

Для некот. бак. показ. ТФ в естеств. усл. (в инфицир. жив. *Diplococcus*, в культуре – для *Bacillus subtilis*.) =>ТФ естеств. биологический процесс.

В то же время в последние годы в связи с развитием генной инженерии широко применяется плазмидная, или векторная, трансформация, которая заключается во введении в кл. бакт., а также эукариот генов, интегрирован. в естеств. или искусств. плазмиды.

### 39-41. ТРАНСДУКЦИЯ(ТД) КАК ПРОЦЕСС ПЕРЕДАЧИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ. ВИРУЛЕНТНЫЕ И УМЕРЕННЫЕ БАКТЕРИОФАГИ. РОЛЬ ТД В ГОРИЗОНТАЛЬНОМ ПЕРЕНОСЕ ГЕНОВ. ЛИЗОГЕННАЯ КОНВЕРСИЯ.

ТД - перенос генов из одних бакт. кл. в др. при помощи бактериофага(БФ). В 1951 г. откр. Зиндер.

БФ(вирусы бакт.), делят на 2 категор.: вирулентные и умеренные. Вирулен. БФ (фаг), проник. в кл., вызыв. лизис.

Умеренные БФ м. вызыв. как литич., так и лизоген. ре-цию. Лизогенн. р-ция: инфицирующ. фаг переход. в сост. профага, кот. воспроизв. синхронно с хромос. бакт. (баки с профагом –лизогенными). Лизоген. баки приобрет. устойчивость к доп. заражению тем же бактериофагом..

Лизогенное сост.устойчиво воспроизв. Профаг теряется с частотой 1 на 105—106 кл. делений. В культурах может происходить индукция бактериофага=> массовый лизис бакт-ий. Такое явление стимулируется: ультрафиол и рентг.

лучами, алкилирующими соединенными. Умерен. фаг м. вызвать и лизогенную реакцию. Зависит от физиологического состава культуры. Умеренные БФ м. мутационным путем превращаться в вирулентные.

Общая, или неспецифическая ТД. ТД осущ. умер. БФ. (P22 -Зиндер впервые обнаружил трансдукцию у *Salmonella typhimurium*). Два штамма это бакт., нуждавш. в ам.к-тах (phe trp tyr + + и - + + met his) в смешанной культуре на мин среде => прототрофные колонии с частотой около  $1 \times 10^{-4}$ . Для их образования не нужен контакт между клетками, как при конъюгации.

Фильтрующийся агент, переносящий гены – умерен. БФ P22, по кот. был лизогенным один из штаммов. Фаг P22 мог трансдуцировать любые гены сальмонеллы => общая или неспецифич. ТД. (так же способн. у P1 *E. coli* - переносит небол. фрагм. хромосомы *E. coli*. Напр. совмест. ТД генов thr и leu 1 % случаев, хотя на ген. карте *E. coli*, построенной при конъюгации, эти локусы тесно сцеплены и находятся на расст. 2 % общей длины генома.

Общая ТД -следствием включения фрагментов ДНК *E. coli*, зараженной фагом P1, в инфекц. частицы БФ. Такие частицы не сод. или мало фаговой ДНК. => трансдуктанты не обладают иммунитетом к фагу P1. ТД могут осущ. даже вирулентные мутанты P1. => что ТДющие частицы не способны инициировать норм. цикл развития фага. Иначе кл. д.б. погибнуть.

Перенос генов при Общ.ТД привод.: принесенный ген наследуется стабильно, т.к интегрирует с хромосомой реципиента -полная ТД. При абортивной ТД внесенный фагом фрагмент генома не реплицируется и передается по одной линии при размножении. Т.е одна кл. при делении получает трансдуцированный ген. Так можно трансдуцировать ген, опред. наличие жгутика у *S. typhimurium*.-подвижность сохраняет только одна клетка. Абортивная чаще, чем полная, иногда в 10 раз.

Спец ТД отличается от неспец. тем, что БФ может переносить лишь опред. гены (хар-но для фага  $\lambda$  *E. coli* - только гены локуса gal, ответств. за усвоен. галактозы, и bio -синтез биотина).

Умерен. БФ  $\lambda$  при лизогенизации *E. coli* интегрирует в ее хромосому на участке между локусами gal и bio(конъюгацион/скрещив/ лизогенных Hfr и нелизогенных F-бакт.. Gal+-трансдукт. возник.  $1 \times 10^{-5}$  —  $10^{-6}$  (генет. нестабильны, выщепляют клетки Gal-1 с частотой около  $2 \times 10^{-3}$  на кл. деление, т.к. трансдуктанты Gal+ частично гетерозиготны gal/gal+, т. е. несут дополнительный фрагмент gat+ вместе с участком gal реципиента( гетерогенота).

При облуч. гетерогенот ультрафиол.-> фаголизаты (частота ТД очень выс.)  $\frac{1}{2}$  частиц  $\lambda$  могла передав. признак Gal+при ТД. Фаги из этих лизатов HFT(high frequently ТД). Гены переносят дефектные фаги  $\lambda$  (кот. лизогенизируя бактерии, сообщ. им устойчивость к суперинфекции  $\lambda$ , но баки не продуц. инфекц. частицы БФ. дефек. трансдуц. част.  $\lambda$  не образуют стерильных пятен на газоне *E. coli*. Самостоятельно не размнож. Требуется фаг-помощник(не спос. к ТД)

У дефект. фагов  $\lambda$  gal от 1/4 до 1/3 собств. генома замещ. на gal — участок бактериальной хромосомы.

Сайт-специфическая рекомбинация(ССР). Геном фага  $\lambda$  проник. в бак. в линейной форме, на концах ДНК есть липкие концы — однонитевые участки по 12 нуклеотидов, комплементарные друг другу. В клетке ДНК замык. в кольцо-> интегрирует в геном бактерии. Принцип интеграции: кольцо генома  $\lambda$  реципрокно рекомбинирует с кольц. бакт. хром.. Один обмен-> интеграции ДНК фага  $\lambda$  с ДНК бакт.. Интеграция профага может происх. только в одном месте на хромосоме *E. coli*, названном att A. (attachment site A.). Аналогичный уч. есть в геноме БФ. Рекомбинация происх. в отсут. протяженной гомологии. Общим у фага и бактерии оказался участок в 15 ам.ост. Вырезание (эксцизия) профага из хромосомы-по тому же мех-му реципрокной, сайт-специфической рекомбинации. Как интеграцию и эксцизию профага А, контролируют два фаговых гена: int и xis. ССР- точно, но не безошибочно. 1на 1 млн. при эксцизии профага рекомбинация осуществляется не в att, а захватывает участки gal или bio. Так возникают трансдуцирующие частицы, у кот. часть генетического материала профага замещена генами бактерии. В рекомбинацию вовлек. те же 15 пар нуклеотидов, кот. встр. в генах gal и bio. За пределами этих 15 п. н. гомология отсутствует. ССР проводит фермент интегразы, кодируемый локусом int фага  $\lambda$ .

Использование в ген. анализе: при картировании 1-2 мин карты, где необх. картирование по 3 точкам., картирование на коротких. участках(P1). Об относительном расположении маркеров при ТД судят по частоте совмест. включения в част БФ при селекции трансдуктантов по одному из них (коТД).Аналогично при ТФ.

#### 41. ПЛАЗМИДЫ. РОЛЬ В ГОРИЗОНТАЛЬНОМ ПЕРЕНОСЕ ГЕНОВ.

Плазмиды — дополнительные факторы наследственности, расположенные в клетках вне хромосом и представляющие собой кольцевые замкнутые) или линейные молекулы ДНК. Плазмиды способны удваиваться (реплицироваться) автономно, но при этом они эксплуатируют репликационную систему клетки хозяина.

Большинство плазмид кодирует специальные белки — инициаторы репликации. Эти белки начинают процесс репликации, который затем подхватывается и продолжается репликационной системой клетки. Для кольцевых плазмид известны несколько механизмов (способов) репликации:

- механизм катящегося кольца (rolling cycle)
- тетта-механизм (механизм «глазка»)
- D-механизм

Некоторые плазмиды могут с определенной частотой интегрироваться в бактериальный геном и размножаться затем вместе с ним как его составная часть.

- R-плазмиды - резистентность.
- Hly-плазмиды - гемолизины
- Ent-плазмиды - энтеротоксины
- Плазмиды бактериоциногенности кодируют синтез бактериоцинов — белковых продуктов, вызывающих гибель бактерий того же или близких видов
- Плазмиды патогенности контролируют вирулентные свойства многих видов, особенно энтеробактерий

- Скрытые (криптические) плазмиды не содержат генов, которые можно было бы обнаружить по их фенотипическому проявлению.

Плазмиды бывают трансмиссивные и нетрансмиссивные. Трансмиссивные плазмиды (F-плазмиды) более крупные и наряду с генетической областью, контролирующей их репликацию, содержат также так называемую tra-область (tra-оперон). Эта область определяет способность клетки быть генетическим донором, т.е. вступать в конъюгацию с клеткой-реципиентом и передавать ей свой генетический материал (плазмидную либо хромосомную ДНК). Под контролем tra-генов синтезируются F-пили клетки-донора, необходимые для ее конъюгации с клеткой-реципиентом, а также ферменты, обеспечивающие метаболизм ДНК в процессе конъюгации.

#### **43. КОНЬЮГАЦИЯ (К) . СТРУКТУРНО ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ F-ФАКТОРА. ОБРАЗОВАНИЕ HFR-КЛЕТКИ. F'-ФАКТОРЫ И СЕКСДУКЦИЯ. КОЛЬЦЕВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КАРТА E. coli**

Конъюгация(К) - непосредственный контакт между кл. бактерий, сопровождаемый переносом ген. материала из кл. донора в кл. реципиента.

К у бакт. *Escherichia coli* была открыта в 1946 г. Дж. Ледер-бергом и Е. Тэйту-мом на осн. генетич. подхода. Классические принципы при обнаружении полового процесса у любых микроорганизмов: 1. Необходимо работать со штаммами одного вида бакт. 2. След. учит. различия по нескол. стабильным признакам. 3. Для получ гибридов или рекомбинантов необх. применять метод селективных сред, для того чтобы регистрировать даже очень редкие события.

Взяли два штамма *E. coli*, маркированные несколькими мутациями ауксотрофности:

(thr leu thi + + и + + + bio met). 1-ый нужд. в thr, leu... Восстановление прототрофности по отдельным признакам, наблюдали с частотой около  $1 \times 10^{-7}$  => штаммы могли бы ревертировать к дик. типу, т. е. к полной прототрофности с частотой  $1 - 10^{-14} - 1 \cdot 10^{-21}$ , если реверсии независимы.

Штаммы смешали в жид. полноцен. сред. Смесь выселили на мин среду. Прототрофы появились с частотой  $1 \cdot 10^{-7}$ , что превосх. частоту спонтанного ревертирования. => эфф. обусловлен именно совместным инкубированием двух штаммов и явл. каким-то вариант. пол. процесса.

Необходимо было выяснить, не трансформация? Обработка 1-ого штамма фильтратом среды, в кот. выращивали др., не приводила к появлен. прототрофов, так же как и выращивание двух штаммов в разных отсеках-U образной трубки, разделенной посередине бактериальным фильтром. Эффект только при непосредствен. контакте бакт. и не подавлялся ДНКазой.

Перенос генетического материала от донора к реципиенту. В 1952 г. У. Хейс провел реципрокные скрещивания между штаммами *E. coli*, устойчивыми и чувствительными к стрептомицину ( $Str^r$  и  $Str^s$ ): I  $Str^s$  thr leu thi + + X  $Stf^r$  + + + bio met и II  $Stf^r$  thr leu thi + + X  $Str^s$  + + + bio met

Для учета рекомбинантов смесь кл. высевали на 2 среды: со стрептомицином и без него. 1 скрещ- только на среде без стрептомиц., 2-ое на 2 средах. => для образ рекомбинантов необх. сохранение клеток родителя: thr leu thi + +, кот. обозначили как женский (F-), а штамм + + + bio met — как мужской (F+).

Рекомбинация происходит в клетках F- — реципиентах, а клетки F+ — доноры — передают генетический материал в клетки F-. Клетки F- круглые, а F+ — продолговатые. Изолирую кл после ко конъюг., удалось показать, что только в потомстве бакт. F- появляются рекомбинанты.

#### **44. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД И ЕГО СВОЙСТВА**

Генетический код — свойственный всем способ последовательности при помощи последовательности [нуклеотидов](#).

- Триплетность — значащей единицей кода является сочетание трёх нуклеотидов (триплет, или кодон).
- Непрерывность — между триплетами нет знаков препинания, то есть информация считывается непрерывно.
- Неперекрываемость — один и тот же нуклеотид не может входить одновременно в состав двух или более триплетов. (Не соблюдается для некоторых перекрывающихся генов вирусов, митохондрий и бактерий, которые кодируют несколько белков, считывающихся со сдвигом рамки).
- Однозначность (специфичность) — определённый кодон соответствует только одной аминокислоте. (Свойство не является универсальным. Кодон UGA у *Euplotes crassus* кодирует две аминокислоты — цистеин и селеноцистеин)
- Вырожденность (избыточность) — одной и той же аминокислоте может соответствовать несколько кодонов.
- Универсальность — генетический код работает одинаково в организмах разного уровня сложности — от до (на этом основаны методы [генной инженерии](#))

Помехоустойчивость — мутации замен нуклеотидов не приводящие к смене класса кодируемой аминокислоты, называют консервативными. Мутации замен нуклеотидов, приводящие к смене класса кодируемой аминокислоты, называют радикальными.

Ф.Крик — гипотеза последовательности — посл-ть эл-тов гена опред. посл-ть АК-ост. в полипепт. цепи. Код триплетен.

4 пары осн-й — 4 АК. Если 1 АК — 2 пары осн-й, то можно закодировать 16 АК, 1 АК-3 пары — 64 кодона.

Ф. Крик: код триплетен; между кодонами нет «запятых», т.е. разделяющих знаков; считывание кода в пределах гена происходит с фиксированной точки в одном направлении. Код неперекрывающийся, т.к. 1 мутация приводит к замене 1 АК. Код вырожден.

Во многих случаях для кодирования АК существенны две первые позиции кодона. Для восьми АК замена осн-й в третьем положении кодона будет нейтральной: не приведет к замене АК в белке. А в тех случаях, когда это все же произойдет, такая замена не изменит свойства полярности АК. Эти особенности кода, по-видимому, отражают его эволюцию. Все кодоны опознаются антикодонами тРНК, за искл. трех нонсенсов, или бессмысленн. кодонов, они предст. собой знаки терминации трансляции (UAA, UAG, UGA).

#### 45. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ТРИПЛЕТНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА.

Эксперимент. док-ва триплетности кода еще Криком в 1961г. Исп. систему rll фага T4 и профлавина (производное акридина) в качестве мутагена. Акридин внедряется между осн-ями ДНК, увеличивая расстояние между сосед. осн-ями в 2 раза: с 0.34 до 0.7 нм. Далее такая искусств. удлиненная ДНК вступает в неравный кроссинговер с интактной мол-лой, в рез-те обр-ся мол-лы с лишней парой осн-й или с делецией пары осн-й.

В кач-ве исход. мутанта Крик использ. мутант FCO, индуцированный профлавином и несущий изменения в левой части гена rll в фага T4. В рез-те спонтанного ревертирования мутанта FCO были получены ревертанты, способные образовывать негативные колонии на штамме E.coli K12. Больш-во этих мут. имели промежуточный фенотип между диким (r+) и мутантным (r). Генет. анализ показал, что ревертанты возникли за счет внутригенных супрессорных мутаций, т.е. повторных мутаций того же гена (rll B). При срещ-ии с фагом д.т. каждый псевдодиккий ревертант выщеплял два класса рекомбинантов типа rll. Один нес исходную мутацию FCO, другой – мутации, к-рые супрессировали FCO, но сами по себе тоже приводили к появлению фенотипа rll.

Далее у этих рекомбинантов, неущих только супрессор. мут-ии, вновь получили рев-ты псевдодик. типа, тоже супрессор. Новые внутриген. супрессоры втор. порядка отдел. от супрессор. перв. пор., убедились в том, что они тоже приводят к возник-ю мутант. фенотипа, и с двумя из них повтор. процедуру еще раз. В рез-те – 80 независимых мутаций rll, к-рые – супрессоры мут-ии FCO или супр. супр-в этой мут-ии или супр. супр-в мут-ии FCO.

Не знали, была ли мут-я рез-том вставки или вып-я осн-й. Условно ей приписали знак "+", супр-м перв. пор. – знак "-", втор. пор. – "+", супр. третьего пор. – "-". Теперь путем рекомбинации стали объедин. их в одном гене. Оказалось, что при объединении трех мут-ий одинак. знака были получ. фаги псевдодик. типа. Получ. рез-ты подтверд. исходные предположения. Так, если предст. посл-ть пар осн-й: ...ABC ABC ABC ABC ABC ABC ...

считываемая слева направо – участок гена rll, то вставка лишней пары осн-й исказит записанную информацию вследствие сдвига рамки гипотетического читающего устройства:

A... ABC AAB CAB CAB CAB C...

Если выпадет пара осн-й вблизи вставки (слева или справа), то за пределами уч., огранич. вставкой или выпадением (прямой мут-й или супр-м) нуклеот. пар, исход. инф-я будет восст. Благодаря сдвигу рамки( сдвигу считывания) в обратн. напр-ии:

A B

↓ ... ABC AAB CAB CAB CAB C... ↑

Очевидно, такое восст-е прежней записи невозм. при двух последоват. вставках или двух последоват. выпадениях. В то же время три вставки и три вып-я должны нормализовать запись за пред. уч., огранич. крайними мут-ями:

A B C

↓ ↓ ↓  
... ABC AAB CAB VCA VCC ABC ABC ABC

или

↓ ↓ ↓  
... ABC VCA VCA CAB ABC ABC

A B C

Все подобные рассуждения осн. на том, что ген rllB кодирует белок, что позже док. Кроме того все рассм. взаим-я между мут-ями могли быть только при усл., что левая часть гена может изм-ся без особых нарушений функций генного продукта. Сейчас обнар. в генах ибелках уч., допускающие вариации по составу.

Код неперекрывающийся, т.к. 1 мутация приводит к замене 1АК.

Если бы код не был вырожденным, между вставкой и выпадением с большой вероятностью должны были возникать бессмысленные триплеты, и тогда нормальное считывание было бы невозможно.

#### Биохимические. (Ниренберг – бесклеточные системы)

1. Добавив синтетическую полиуридиловую РНК (полиU) в бесклет. сист., приготовленную из E.coli, обнаружили, что полиU стимулирует включение в полипептид только одного типа АК ост. – Фен. Таким обр., учитывая триплетность кода, кодон для Фен был расшифрован как UUU в иРНК. Стали исп. этот способ для разных нуклеотидов, выяснили состав, но не последовательность.

2. Г. Коран: метод хим. синтеза ДНК-подобных полимеров с заданной посл-ю нуклеотидов – матрица для синтеза РНК – при помощи ДНК-завис. РНК-полимеразы пол. РНК с заранее известной посл-ю и исп. в бескл. сист. синтеза белка.

3. Ниренберг и Ледер: исп. то, что промез. пр-ты в синтезе белка – АК, связ. с тРНК. Одного тринуклеотида на рибосоме достаточно для связывания и с рибосомой, и с тРНК.

#### 46. СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ.

- информативность - специфическая последовательность четырех нуклеотидов в полинуклеотидной цепи
- точность полуконсервативный механизм репликации ДНК
- стабильность – двуспиральная структура, способность к самовоспроизведению (репликации)
- пластичность
- мутационная изменчивость -> новые признаки

- рекомбинационная изменчивость - механизмы обмена генетическим материалом, принадлежащим разным особям, "по горизонтали", и возникновение на базе этого особей с рекомбинантным геномом. При генетических рекомбинациях новых генов в генофонде, как правило, не появляется. В результате ген рекомб обеспечивается возможность объединения разных генов и создание разных вариантов генных сочетаний в геноме
- видовая специфичность состава ДНК (нач 50-х гг) Э. Чаргафф показал, что соотношения 4 сортов ее мономеров - G, A, C и T - различ у разн видов орг-мов

#### Репликация ДНК. Принципы репликации

*Комплементарность.* Каждая из двух цепей "материнской" молекулы ДНК служит матрицей для синтеза дополняющей её, т.е. комплементарной "дочерней" цепи

*Полуконсервативность.* В результате репликации образуются две двойные "дочерние" спирали, каждая из которых сохраняет (консервирует) в неизменном виде одну из половин "материнской" ДНК.

*Антипараллельность и униполярность.* Две комплементарные цепи в молекуле ДНК ориентированы в противоположных направлениях - антипараллельно. При этом синтез комплементарных нитей всегда ведётся в 3' направлении, то есть униполярно. Поэтому в процессе репликации одновременный синтез новых цепей идёт антипараллельно

*Прерывистость.* репликация начинается одновременно в нескольких местах молекулы ДНК. Участок между двумя точками, в которых начинается синтез "дочерних" цепей, называется *репликоном*. В эукариотической клетке в каждой молекуле ДНК имеются в зависимости от размеров сотни и даже тысячи репликонов, в которых можно видеть "репликативную вилку". Ведут синтез два по-разному организованных репликативных ферментативных комплекса. Одна "дочерняя" цепь (лидирующая) растёт непрерывно, а другая (отстающая) - в виде "*фрагментов Оказаки*". Механизм синтеза "дочерних" цепей ДНК фрагментами называют прерывистым.

*Потребность в затравке.* Его синтезирует особая РНК-полимераза, называемая *праймазой*.

#### **47. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И ЭНЗИМОЛОГИЯ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ ДНК. СОБЫТИЯ В РЕПЛИКАТИВНОЙ ВИЛКЕ.**

Ошибки репликации возникают из-за возможности существования оснований ДНК в неск таутомерных формах. Спонтанная мутабельность повышается в результате мутационного изменения генов, контролирующих репликацию ДНК. Ген-мутатор: мутация гена 43 (контролирует репликативную ДНК-полимеразу, которая обладает двумя активностями: 5-3-полимеразной и 3-5-экзонуклеазной (последняя – функции коррекции при репликации)) бактериофага T4 (Дж Спейсер, 1965г) -> повыш частота мутаций в гене *gII*, контролирует скорость лизиса. Ген-антимутатор: также мутация гена 43 фага T4 -> понижен мутагенез под действием 2-аминопурина: антимутаторная ДНК-полимераза включает меньше 2-аминоурина в ДНК, чем полимеразы дикого типа или мутаторная. Т.о. частота ошибок репликации зависит от соотношения полимеразной и экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы. Мутаторную и антимутаторную активность проявляют также и аллели других генов, контролирующих репликацию: гены, кодирующие ДНК-лигазу, ДНК-связывающие белки и др. Также есть данные о мутации активности гена *dnaE*, контролирует ДНК-полимеразу у *E.coli*, а также обнаружение мутагенной ДНК-полимеразы в клетках человека, больного лейкемией. Мутаген, действующий непосредственно в репликативной вилке: N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ), который взаимодействует с одноцепочечными участками в вилке или действует на белки реплисома.

Процесс репликации ДНК согласован с клеточным делением и требует совместного действия многих белков. В нем участвуют:

1. ДНК-хеликазы и дестабилизирующие белки; они расплетают двойную спираль родительской ДНК и формируют репликационную вилку.
2. ДНК-полимеразы, которые катализируют синтез полинуклеотидной цепи ДНК в направлении 3'-5', копируя в репликационной вилке матрицу с высокой степенью точности. Поскольку две цепи двойной спирали ДНК антипараллельны, в направлении 5'-3' непрерывно синтезируется лишь одна из двух цепей, ведущая; другая цепь, отстающая, синтезируется в виде коротких фрагментов Оказаки. ДНК-полимераза способна к исправлению собственных ошибок, но не может самостоятельно начать синтез новой цепи.
3. ДНК-праймаза, которая катализирует короткие молекулы РНК-затравки. Впоследствии фрагменты РНК удаляются - их заменяет ДНК.
4. ДНК-топоизомеразы, помогающие решить проблемы кручения и спутывания спирали ДНК.
5. Инициаторные белки, связывающиеся в точке начала репликации и способствующие образованию нового репликационного глазка с одной или двумя вилками. В каждой из вилок вслед за инициаторными белками к расплетенной ДНК сначала присоединяется белковый комплекс, состоящий из ДНК-хеликазы и ДНК-праймазы (праймосома). Затем к праймосоме добавляются другие белки и возникает "репликационная машина", которая и осуществляет синтез ДНК.
6. РНК-полимеразы, кодирующие геном *dna G* – инициация репликации.

Спираль расплетается ДНК-хеликазой; этому процессу помогают ДНК-топоизомераза, раскручивающая цепи ДНК, и множество молекул дестабилизирующего белка, связывающихся с обеими одиночными цепями ДНК. В области вилки действуют две ДНК-полимеразы - на ведущей и отстающей цепи. На ведущей цепи ДНК-полимераза работает непрерывно, а на отстающей фермент время от времени прерывает и вновь возобновляет свою работу, используя короткие РНК-затравки, синтезируемые ДНК-праймазой. Молекула ДНК-праймазы непосредственно связана с ДНК-хеликазой, образуя структуру, называемую праймосомой. Праймосома движется в направлении раскрытия репликационной вилки и по ходу движения синтезирует РНК-затравку для фрагментов Оказаки. В этом же направлении движется ДНК-полимераза ведущей цепи и, хотя на первый взгляд это трудно представить, ДНК-полимераза отстающей

цепи. Для этого последняя накладывает цепь ДНК, которая служит ей матрицей, саму на себя, что и обеспечивает разворот ДНК-полимеразы отстающей цепи на 180 градусов. Согласованное движение двух ДНК-полимераз обеспечивает координированную репликацию обеих нитей.

События в репликативной вилки *E. Coli*: присоединение к хромосоме белка DnaA – разделение цепей и работа геликазы. Гираза решает топологические проблемы, связанные с разделением цепей двойной спирали. С образовавшейся одноцепочечной ДНК связываются белки SSB, стабилизирующие вилку репликации. Праймаза – синтезирует РНК-праймеры на лидирующей и отстающей цепях. У сайта начала репликации много АТ пар.

Инициация репликации у дрожжей: G1 – формирование пре-репликационного комплекса, в состав которого входят шесть белков комплекса ORC и белки Cdc6 и Mcm. При переходе к стадии S *frlbdyjcnm Cdk1* возрастает и Cdc6р покидает комплекс, на его место встает Cdc45. После инициации репликации комплекс превращается в пост-репликационный, он состоит только из белков ORC, связанных с хроматином. Этот комплекс сохраняется до конца митоза, когда активность Cdk1 падает. Разделение двойной спирали происходит с помощью ДНК-геликазы и репликационного белка RPA. Репликационный белок А связывается с одноцепочечной ДНК, затем альфа-ДНК-полимераза-праймаза синтезирует короткие РНК-праймеры на лидирующей и отстающей цепях, после чего происходит замена полимеразного комплекса на комплекс дельта-ДНК-полимеразы. Синтез новых цепей ДНК осуществляется ДНК-полимеразами. ДНК-лигазы сшивают фрагменты okazaки.

#### **48. ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК. РОЛЬ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ В ИХ ВОЗНИКНОВЕНИИ. СЛЕДСТВИЯ.**

Алкилирование (метилаза Dam), пиримидиновый димер и 6-4-фотопродукт (UV), одно- и двунитевой разрыв ( $\gamma$ -, X-rays), 8-оксигуанин (АФК), АП-сайт (гидролиз N-гликозидной связи), межнитевая сшивка (от митомицина С, азотистого иприта), сшивка ДНК-белок, ошибка спаривания (А-С, Т-Г и т. д.), дезаминирование оснований.

Следствия: запуск системы репарации – эксцизионная репарация, репарация неспаренных оснований (Mismatch repair – MMR), пострепликативная рекомбинационная репарация. Если репарация не помогла, запускается SOS-репарация, которая ошибается. При низкой активности репаративных механизмов повреждения ДНК приводят к мутациям.

#### **49. МУТАГЕНЕЗ, ВЫЗВАННЫЙ ХИМИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ АНАЛОГАМИ ОСНОВАНИЙ, ИНТЕРКАЛИРУЮЩИМИ АГЕНТАМИ, АЛКИЛИРУЮЩИМИ АГЕНТАМИ, АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА.**

Нарушения: ковалентные сшивки двух близко расположенных оснований, ковалентное связывание азотистых оснований с алифатическими и ароматическими радикалами; химические перестройки азотистых оснований, нарушения свхрофосфатного каркаса.

Алкилирующие агенты – переносят алкилирующие группы на биологические макромолекулы. Этиленимины, алкилалкансульфаноаты, эпоксиды, многоатомные спирты, производные нитрозомочевины и аминокимидазола. Транзиции – основной тип изменений под действием алкилирующих агентов.

Аналоги оснований – более высокая способность к таутомерным переходам, так же повышают чувствительность к другим мутагенам.

Акридиновые красители – мутации типа рамки считывания. внедряются между соседними основаниями ДНК – либо редупликация с новым основанием, либо ошибка в репарации и рекомбинации.

Экзогенные ДНК – формирование множества видимых и летальных перестроек – генные мутации, делеции. Очень пролонгированный эффект.

#### **50. МУТАГЕНЕЗ, ВЫЗВАННЫЙ ФИЗИЧЕСКИМИ МУТАГЕНАМИ – ИОНИЗИРУЮЩИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ, УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ.**

Ионизирующее излучение – электромагнитные рентгеновские, гамма и космические лучи, а так же высокоэнергетические альфа, бета и другие корпускулярные излучения. Выбивают электроны из внешней оболочки атомом или молекул, превращая их в положительные ионы, освобожденные электроны выбивают электроны из других атомов и молекул. Атомы, захватившие такие электроны, приобретают (-)-заряд.

Разрывается углеродно-фосфатный скелет ДНК, разрушаются основания (особенно пиримидиновые), происходят химические перестройки оснований, изменяющие способность к спариванию (например, производное пурина спар с пурином). Образуются сшивки как в молекулах нуклеиновых кислот, так и между молекулами ДНК и белками.

УФ-лучине действуют на половые клетки, проникают в ткани очень слабо, не обладают достаточной энергией для индукции ионизации атомов и только возбуждают электронные оболочки. Сутации в клетках, образующих монослой. Возникают пиримидин-пиримидиновые димеры, так же под действием УФ-облучения эти димеры разрушаются. Присутствие диеров приводит к ошибкам при репликации.

#### **51. ПРИЧИНЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ СПОНТАННЫХ МУТАЦИЙ. УРОВЕНЬ СПОНТАННОГО МУТАГЕНЕЗА. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СПОНТАННОГО МУТАГЕНЕЗА. ГЕНЫ МУТАТОРЫ И АНТИМУТАТОРЫ.**

Ошибки процесса репликации ДНК в клетках здорового человека происходят с частотой  $\sim 10^{-9}$ - $10^{-10}$  на 1 нуклеотид ДНК на 1 клеточное поколение.

В каждой клетке при температуре тела человека от ДНК отрываются >10000 оснований (в основном пуриновых) вследствие разрывов N-гликозидных связей между основанием и дезоксирибозой.

Частота спонтанных реакций дезаминирования цитозина в урацил – более 100 на клетку за сутки.

В ходе репликации ДНК, транскрипции и других процессов постоянно рвутся цепи ДНК. И это только часть реакций деструкции ДНК, происходящих в нормальной клетке в обычных условиях.

В то же время частота фиксированных наследственных изменений – мутаций генов несравнимо ниже частоты повреждений ДНК.

Менее 1 повреждения ДНК из 1000 превращается в мутацию. Этот факт объясняется работой систем репарации повреждений в ДНК.

Мутаторы – гены, повышающие частоту возникновения мутаций, антимутаторы – понижающие эту частоту (dam, mutH, mutL, mutS, mutU). Антимутаторными могут быть гены, кодирующие ферменты репликации, например, при мутации в полимеразном домене ДНК-полимераз. Мутаторными могут быть гены с мутацией в репаративном домене ДНК-полимеразы I.

## 52. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК И СПОНТАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Скорость репликации бактериальной хромосомы составляет около 1000 п.н./секунду. Скорость репликации у эукариот (млекопитающие) составляет около 100 п.н./с.

Прежде, чем начать репликацию необходимо расплести ДНК. Это расплетание осуществляется специальным инициаторным белком DnaA. Сайты связывания этого белка находятся в ориджине. Кроме белка DnaA в раскрытии ДНК принимают участие и другие белки (FIS, HU, HIF).

С помощью этих инициаторных белков на ДНК садится ДНК-хеликаза DnaB/DnaC (оба белка – гексамеры). Хеликаза двигается по ДНК и разрывает водородные связи между комплементарными основаниями, разделяет цепи и продвигает репликационную вилку. С односторонними участками ДНК связывается белок SSB. Это дестабилизирующий ДНК белок, он полностью покрывает односторонние участки и предотвращает восстановление дуплекса.

ДНК закручена в спираль, поэтому при продвижении репликационной вилки еще не удвоенная часть ДНК должна вращаться с большой скоростью. Эта топологическая проблема решается с помощью ДНК-топоизомераз, которые способны делать в цепях разрывы, менять скрученность ДНК, а потом зашивать эти разрывы, которые раскручивают ДНК впереди репликационной вилки. Топоизомераза I релаксирует суперскрученную ДНК, делая разрыв в одной цепи и протягивая вторую цепь через этот разрыв, и зашивает разрыв. Топоизомераза II, к которой относится ДНК-гираза, делает двунитевой разрыв.

ДНК-полимеразы не могут начинать синтез ДНК на матрице, а способны лишь добавлять новые дезоксирибонуклеотиды к 3'- концу уже имеющейся цепи. Т.е. синтез ДНК на матрице должен быть иницирован коротким олигонуклеотидом, который формирует участок двунитевой ДНК. Такие короткие олигонуклеотиды называются затравками или праймерами. Праймаза (DnaG) образует комплекс с матричной ДНК и дополнительными белками, такими как DnaB, DnaT, PriA, PriB, PriC – это иницирующий комплекс или праймосома, которая синтезирует РНК-праймер.

Все ДНК-полимеразы способны синтезировать новую цепь только в одном направлении- 5'-3'. Синтез ДНК осуществляется непрерывно только на одной нити, называемой ведущей (ДНК-полимераза III). На второй нити, называемой отстающей, ДНК синтезируется короткими (длиной от 100 до 1000 нуклеотидов) фрагментами, названными фрагментами Оказаки по имени обнаружившего их ученого. Таким образом, одна из нитей синтезируется в направлении, противоположном направлению передвижения вилки.

Синтез фрагмента Оказаки терминируется перед началом РНК-праймера предыдущего фрагмента. Здесь начинает работать ДНК-полимераза I. Ее 5'-3'-экзонуклеазная активность удаляет РНК-затравку, и одновременно достраивает предыдущий фрагмент ДНК. Затем два состыкованных фрагмента Оказаки соединяются между собой ДНК-лигазой.

## 53. РЕПАРАЦИЯ ДНК И МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Мутации некоторых генов, ответственных за репарацию у *E. coli*, бактериофага T4, дрожжей, а также в клетках высших эукариот, проявляют мутаторный или антимутаторный эффект, подобно мутациям в генах, ответственных за репликативный комплекс.

Наиболее подробно участие процессов репарации в возникновении мутаций исследовано у бактерии *E. coli*. Показано, что мутация в гене *uvr E*, контролирующем ликвидацию односторонних разрывов после ультрафиолетового (но не ионизирующего) облучения, повышает спонтанное возникновение транзаций AT - GC в 350—400 раз, а транзаций GC- AT в 150—200 раз. Она повышает также частоту мутаций, индуцированных ультрафиолетовым светом и метилметансульфонатом.

Изучение генетического контроля репарации (а также рекомбинации) позволило доказать участие некоторых нормальных процессов, происходящих в клетке, в превращении *предмутационных изменений* ДНК в мутации. В частности, оказалось, что процесс становления мутаций может быть генетически блокирован так же, как любой другой физиологический процесс. Так, изменение генов *lex A* или *rec A* ведет к частичному или полному подавлению мутационного процесса под действием ультрафиолетового света, ионизирующих излучений и некоторых химических мутагенов.

Э. Виткин обратила внимание на связь нескольких явлений, для которых общей причиной служит облучение клеток ультрафиолетовым светом: 1) индукция профага лямбда; 2) повышение выживаемости облученного бактериофага лямбда при заражении им предварительно облученных клеток *E. coli* по сравнению с выживаемостью в необлученных клетках — так называемая *W-реактивация*, открытая Дж. Уэйглом; 3) блокирование клеточных делений у некоторых мутантов *E. coli*, в результате чего клетки приобретают нитевидную форму; 4) повышение частоты рекомбинации; 5) повышение частоты мутаций.

Оказалось, что *W-реактивация* бактериофага сопровождается повышением его мутабельности. Кроме того, явление *W-реактивации* так же зависит от дозы ультрафиолетового света, как и индукция профага лямбда. Для осуществления



обоих процессов требуется нормальное состояние генов *rec A*<sup>+</sup> и *lex A*<sup>+</sup>. У мутантов *rec A* и *lex A* они подавлены, как и образование нитей, не говоря уже о мутагенезе, индуцированном ультрафиолетовым светом.

Параллелизм в проявлении индукции профага и W-реактивации (сопровождаяемой повышением мутабельности) указывает на существование индуцируемой системы репарации, которая в связи с этим получила наименование SOS-репарации, т. е. репарации, включаемой для спасения. Индуцибельная система репарации действует по механизму пострепликативной репарации. На это указывает ее зависимость от гена *rec A*. SOS-репарация включается в тех случаях, когда «безошибочная» дорепликативная система репарации не справляется с устранением повреждений или когда она блокирована мутационным путем. Для индукции системы SOS-репарации требуется 30—60 димеров тимины на геном *E. coli*. Сигналом индукции служит задержка репликации, которая при этом наблюдается.

Связь репарации и мутационного процесса показана для *Drosophila melanogaster*. Так, при действии кофеина на недокармливаемых мух наблюдается четкий антимутагенный эффект, судя по критерию спонтанных потерь X-хромосомы. Известен мутатор *tu* у дрозофилы, в присутствии которого мухи проявляют повышенную чувствительность к рентгеновым лучам и метилметансульфонату. Мутатор *tu* находится в непосредственной близости к мутации *C(3)G*, блокирующей мейотическую рекомбинацию.

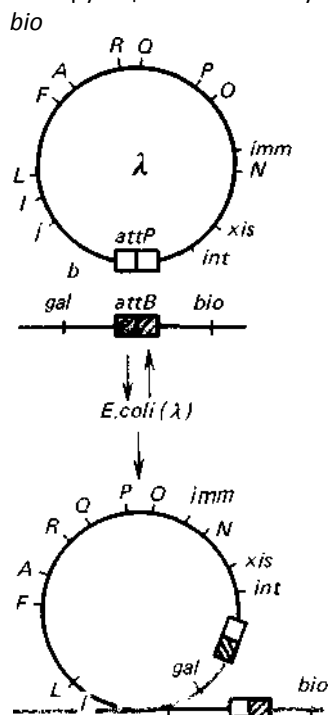


Рис. 9.8. Схема интеграции и эксцизии генома бактериофага  $\lambda$  за счет сайт-специфической рекомбинации с хромосомой *E. coli* и образование трансдуцирующих частиц

#### 54. РЕПАРАЦИЯ НЕСПАРЕННЫХ ОСНОВАНИЙ

Mismatch repair – MMR. С неправильным основанием связывается белок MutS, с которым затем связываются белок MutL. Это событие активирует латентную эндонуклеазу MutH. Образуется репарационный комплекс с затратой 1 молекулы АТФ.

Белок MutH разрезает неметилированную нить ДНК по сайту GATC, который может располагаться по любую сторону от неправильного основания.

Затем ДНК-хеликаза II (MutU = UvrD) расплетает надрезанную нить ДНК между надрезом и неспаренным основанием (включая его) и вытесняет ее из гетеродуплекса.

Эксонуклеаза I (если это 3'-конец) или эксонуклеаза VII (если это 5'-конец) гидролизует вытесненную нить. Этот процесс нуждается в MutL и MutS. Вырезаются фрагменты порядка 1000 н.

Затем образовавшаяся брешь застраивается ДНК-полимеразой III в присутствии белка SSB. В завершение, ДНК-лигаза восстанавливает фосфодиэфирную связь.

Система MMR у эукариот организована сложнее функционирует эффективнее по сравнению с бактериями. У эукариот MMR исправляет все некомплементарные пары оснований и, кроме того, репарирует делеции или инсерции размером до 12 н. У бактерий MMR неспособна исправлять пары С\*С и репарирует делеции/инсерции не более 3 н. Ключевые белки MMR – MutL и MutS высококонсервативны, их гомологи обнаружены у всех организмов от *E. coli* до человека.

#### 56. РЕПАРАЦИЯ ДНК. ОСНОВНЫЕ ФЕРМЕНТЫ. РОЛЬ В ПОДДЕРЖАНИИ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕН. МАТЕРИАЛА.

Удивительная стабильность генетического материала — ДНК связана отнюдь не с ее консервативностью, а с существованием в клетках всех живых организмов специальных систем репарации, устраняющих из ДНК возникающие в ней повреждения.

Явление репарации, или восстановления жизнеспособности клетки, после действия на нее гамма- и рентгеновых лучей было открыто в 1958 г. В. И. Корогодиным у диплоидных дрожжей. Повреждения ДНК, возникающие при действии излучений и химических агентов, в конечном счете приводят к нарушению регулярной Уотсон-Криковской структуры, что

выражается в локальной денатурации молекулы и приводят к частичному или полному блокированию репликации. Именно такие нарушения конформации, а не конкретные изменения мономеров служат мишенью для большинства систем репарации ДНК. Существует несколько систем, осущ.репарацию. В каждую входит 4 типа ферментов:1й – узнающий «неправильный»участок и разрывающий цепь вблизи него, 2й – удал.повр.участок,3й-днк-полимераза,4й-днк-лигаза. В заав от типа повреждений меняются 1й и 2й фермент. У бактерий имеются по крайней мере 2 ферментные системы, ведущие Р. Первая осуществляет вырезание и ресинтез на небольшом участке в 5—7 нуклеотидов, вторая — на участке в тысячу нуклеотидов и более. Ферменты второй системы Р. участвуют также в процессах генетической рекомбинации. В случае повреждений, вызванных, например, УФ-светом, нормальная клетка кишечной палочки способна репарировать до 2000 повреждений; клетка с выведенной из строя первой системой Р. — около 100 повреждений; клетка с выведенными из строя обеими системами Р. погибает от одного повреждения. Существуют бактерии с исключительно активными ферментами Р. (например, *Micrococcus radiodurans*), которые благодаря этому способны выживать в воде, охлаждающей ядерные реакторы.

Ферментные системы Р., как полагают, принимают участие и в нормальной репликации ДНК, т. е. её удвоении. При репликации материнская ДНК деспирализуется (раскручивается), что может сопровождаться разрывами её нитей. Кроме того, дочерние цепи ДНК синтезируются в виде небольших фрагментов. Поэтому заключительная фаза репликации — Р. всех дефектов, возникших при синтезе ДНК. Важная функция второй системы Р. — её участие в образовании мутаций . Под действием различных мутагенов в ДНК образуются производные нуклеотидов, чуждые клетке. Они устраняются системой Р., которая заменяет их на нуклеотиды, естественные для ДНК, но иногда измененные по сравнению с первоначальными. Открытие Р. ДНК привело к коренным изменениям представлений о молекулярных механизмах, обеспечивающих стабильность генетического аппарата клеток и контролирующих темп мутационного процесса.

### **57.РЕПАРАЦИЯ ДНК –ФОТОРЕАКТИВАЦИЯ,ДЕАЛКИЛИРОВАНИЕ,РЕП.ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ,Р.АП-САЙТОВ.**

Мутации, вызванные воздействием ультрафиолетового света, могут репарироваться благодаря явлению фотореактивации. Фотореактивация заключается в восстановлении биологической активности клеток или молекул ДНК, поврежденных ультрафиолетовым излучением в результате последующего воздействия видимого света. При фотореактивации происходит мономеризация циклобутановых димеров тимина и других пиримидиновых димеров *in situ*. Известна так называемая неферментативная коротковолновая фотореактивация, которая заключается в мономеризации димеров при действии ультрафиолетового света с длиной волны 240 нм, а также ферментативная фотореактивация. Именно последнюю обычно и подразумевают под собственно фотореактивацией. Фотореактивация при действии видимого света (300—400 нм — наиболее активная часть спектра) была обнаружена в 1949 г. в нескольких лабораториях. Механизм этого явления был раскрыт в начале 60-х годов нашего века после выделения К. Рупертом из клеток микроорганизмов фермента фотореактивации — *дезоксирибопиримидинфототилазы*. Экстракты дрожжей оказались способными восстанавливать трансформирующую активность ДНК *Haemophilus influenzae* на свету. Субстратом фермента фотореактивации служат димеры пиримидиновых оснований, с которыми он образует комплекс в темноте (с неповрежденной ДНК фермент не связывается). На свету комплекс распадается, при этом происходит мономеризация димеров. В клетке эукариот фермент локализован в ядре, у прокариот — в непосредственной близости к нуклеоиду. В частности, он не обнаруживается в безнуклеоидных миниклетках, которые образуют некоторые мутанты *E. coli*. Известен мутант *phg E. coli*, у которого блокирована фотореактивация. При облучении видимым светом у этого мутанта не исчезают тиминовые димеры из ДНК. Фермент фотореактивации найден у примитивных микроорганизмов, как микоплазмы, у многих высших растений и животных. Фермент образует стабильный комплекс с пиримидиновым димером и используя энергию поглощенного им света разрушает димер без разрыва цепей ДНК.

Если под воздействием алкилирующих агентов - N-метил-N-нитрозомочевины или  $N^1$ , N-диметилнитрозогуанидина, в ДНК образовался  $O^6$ -метил- или  $O^6$ -алкиламещенные гуаниновые остатки, то деалкилирование таких остатков идет при участии ферментов -  $O^6$ -метилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы, которая катализирует перенос алкильных групп на сульфгидрильные группы цистеиновых остатков фермента, при этом акцепторный белок инактивируется. Это у бактерий и млекопитающих.

Репарация одонитевых разрывов ДНК осуществляется последовательным действием 3'-фосфодиэстеразы, ДНК-полимеразы  $\beta$  и ДНК-лигазы [18]. Восстановление одонитевого разрыва ДНК происходит с использованием в качестве матрицы комплиментарной цепочки ДНК. Репарация данного типа повреждений может также происходить с участием механизма эксцизионной репарации нуклеотидов.

Эксцизионная репарация осуществляется в несколько этапов. На первом этапе поврежденное основание удаляется ДНК гликозилазами, далее сахар без основания (АП-апуриновый-сайт) вырезается АП-эндонуклеазами. На втором этапе образовавшаяся брешь размером в одно основание восстанавливается до исходной последовательности с помощью совместного действия экзонуклеаз, полимеразы и ДНК лигазы

### **57. ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ. ГЕНЫ МУТАТОРЫ**

Эксцизионную репарацию, т. е. связанную с удалением поврежденного участка ДНК, называют также репарацией по типу выщепления — замещения или более образно «механизм режь — латай». Наиболее подробно изучена именно репарация ДНК, содержащей тиминовые димеры. Появление димеров приводит к локальной денатурации ДНК, что влечет за собой нарушение процесса репликации: каждый тиминовый димер в ДНК *E. coli* задерживает репликацию на 10 с.

Эксцизионная репарация представляет собой многоэтапный процесс и заключается в: 1) «узнавании» димера, 2) надрезании одной цепи ДНК вблизи димера — инцизии, 3) удалении димера — эксцизии, 4) ресинтезе ДНК и 5)

восстановлении непрерывности репарируемой цепи за счет образования ковалентных связей сахарофосфатного скелета молекулы.

«Узнавание» повреждения в ДНК осуществляет фермент УФ-эндонуклеаза, который реагирует не только на димеры тимина, но и на многие другие изменения, приводящие к локальному нарушению структуры ДНК. Эндонуклеаза ответственна и за инцизию, т. е. надрезание одной цепи ДНК (разрыв фосфодиэфирных связей) непосредственно около димера с 5'-конца в поврежденной цепи. Эксперименты *in vitro* с облученной ДНК показали, что число односторонних разрывов оказывается равным числу димеров в молекуле.

Эксцизию, или вырезание димера из молекулы ДНК, осуществляет другая нуклеаза. Димер удаляется в составе короткого олигонуклеотида (3—5 оснований), что может сопровождаться дальнейшей деградацией поврежденной спирали. Продукты деградации облученной ДНК, содержащие тиминовые димеры, можно обнаружить в клетках. У некоторых бактерий димеры находили и в культуральной среде. Деградацию ДНК осуществляет АТФ-зависимая ДНКаза. В результате эксцизии и последующей деградации ДНК образуются односторонние бреши, или пробелы.

*Ресинтез* ДНК, в результате которого заполняются бреши, идет с использованием в качестве матрицы интактной цепи. Такой репаративный синтез ДНК напоминает «дополнительную» репликацию, обнаруженную в пахитене у эукариот. Основным ферментом, ответственным за эксцизию димеров и репаративный синтез ДНК, — это ДНК-полимераза I, кодируемая геном *pol A*. Тем не менее у мутантов *pol A*, дефектных по ДНК-полимеразе I, все же наблюдается остаточный репаративный синтез, который связан с активностью ДНК-полимеразы II.

Известно, что неполуконсервативный синтез ДНК в 99% случаев происходит на коротких участках длиной до 30 нуклеотидов. За эту реакцию ответственна ДНК-полимераза I. В 1% случаев синтез идет на гораздо более длинных отрезках — 1000—1500 нуклеотидов. По-видимому, эту реакцию и осуществляет ДНК-полимераза II.

Последний этап эксцизионной репарации заключается в *восстановлении непрерывности* репарируемой цепи ДНК с помощью фермента ДНК-лигазы, кодируемого геном *lig E. coli*. Температурочувствительные мутанты по этому гену не способны не только завершать процесс эксцизионной репарации в непермиссивных условиях, но и накапливают фрагменты Оказаки при репликации ДНК.

## 58. РЕПАРАЦИЯ НЕСПАРЕННЫХ ОСНОВАНИЙ

Неспаренные основания в ДНК могут возникать в результате трех событий:

- 1) прямого повреждения оснований ДНК или их предшественников продуктами клеточного метаболизма;
- 2) ошибочной подстановки некоплементарного основания ДНК-полимеразой в ходе репликации
- 3) рекомбинационной интеграции одностороннего участка ДНК в неабсолютно идентичную ДНК, партнера по рекомбинации.

Все события приведут к образованию гетеродуплексной ДНК, которая и становится субстратом для ферментов, корректирующих неправильные пары оснований.

Процесс репарации ДНК при обнаружении ферментами неканонической пары в дуплексе ДНК проходит через ряд реакций.

Обычно такая цепь реакций начинается с обнаружения и удаления одного из нуклеиновых оснований неканонической пары в ДНК, катализируемого соответствующим ферментом группы AP-эндонуклеаз типа II (апуриновых/апириимидиновых эндонуклеаз)

Затем происходит гидролитическое расщепление 3'-фосфоэфирной связи, причем фосфат остается в 5'-положении уходящей цепи ДНК. Далее с 3'-концом в месте расщепления цепи связывается ДНК-полимераза бета, приводящая к образованию шиффа между ферментом и 3'-цепью ДНК, катализирующая гидролитическое удаление дезоксирибозилфосфатного остатка (реакция В), таким образом освобождая 3'-конец для включения соответствующего канонической паре нуклеотида.

## 59. SOS- РЕПАРАЦИЯ – МУТАГЕННЫЙ ПУТЬ РЕПАРАЦИИ ДНК

SOS-репарация относится к **пострепликативной репарации**. Этот тип репарации был открыт в клетках мутантов *E. coli*, не способных выщеплять тиминовые димеры. В таких клетках после ультрафиолетового облучения происходит репликация ДНК, хотя и медленнее, чем в клетках дикого типа. Показано, что в клетках мутантов *uvr A* после действия ультрафиолетового света синтезируется ДНК с односторонними пробелами, или брешами, причем длина вновь синтезированных фрагментов соответствует среднему расстоянию между возникшими в родительской ДНК тиминовыми димерами. Таким образом, после репликации нерепарированной ДНК против тиминовых димеров образуются бреши, которые, как оказалось, исчезают при последующей инкубации клеток в питательной среде. Этот тип репарации не происходит в клетках *hcs*-мутантов, дефектных по рекомбинации. Поэтому пострепликативную репарацию называют также *рекомбинационной репарацией*.

Механизм пострепликативной репарации наименее специфичен, так как здесь отсутствует этап узнавания повреждения. Представления об этом типе репарации связаны со знанием механизмов рекомбинации. Рекомбинационная пострепликативная репарация — это быстрый способ восстановления нативной структуры по крайней мере части дочерних молекул ДНК. При этом тиминовые димеры остаются в исходных родительских нитях. Эта репарация происходит уже в первые минуты после облучения.

Существует и другая разновидность — медленная пострепликативная репарация, для осуществления которой требуется несколько часов. Ее проводит система ферментов, которых нет в необлученных клетках и которую индуцирует облучение. Этот механизм получил наименование *SOS-репарации*. Его характерная черта — неточность восстановления первичной структуры ДНК, в связи с чем он получил также название *репарации, склонной к ошибкам*. При этом, по

мнению ряда авторов, возможен репаративный синтез ДНК «в обход» тиминовых димеров, или, точнее, за счет использования в качестве матрицы цепи ДНК, содержащей димеры.

Пострепликативная репарация существует не только у бактерий, но и в клетках эукариот. Она обнаружена и у млекопитающих, для которых получены данные о том, что пострепликативные бреши могут заполняться не за счет рекомбинации, а за счет синтеза ДНК de novo. Один из типов пигментной ксеродермы у человека ( $XP_{var}$ ) связан с блоком пострепликативной репарации.

## 60. МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ

С момента возникновения хромосомной теории наследственности до конца 70-х годов представление о том, что каждый ген имеет определенное место на хромосоме и не способен произвольно менять его, казалось незыблемым. Единственным известным способом перемещения генов друг относительно друга были хромосомные мутации — транслокации и инверсии. Другое очень распространенное и обоснованное представление гласит о том, что в геноме данного вида организмов содержится вполне определенное количество копий какого-либо конкретного гена. Изменение числа копий может также происходить в результате хромосомных мутаций — дупликаций и делений. В 40—50-х годах XX в. американская исследовательница Б. Мак-Клинтон генетическими методами показала, что в хромосомах кукурузы предположительно существуют генетические элементы, способные перемещаться в геноме — исчезать с прежних мест и появляться в новых. Спустя четверть века американские и советские генетики независимо методами молекулярной биологии и геномной инженерии доказали существование генетических элементов, способных к перемещению.

**Свойства мобильных генетических элементов.** Мобильные генетические элементы обнаружены у самых разных организмов: у бактерий, дрожжей, растений и животных. Мобильные генетические элементы, выделяемые у разных видов, существенно отличаются по длине нуклеотидной последовательности и, следовательно, свойствам. У дрозофилы, хорошо изученной в этом отношении, описано около десяти типов мобильных элементов, одни из которых похожи друг на друга, иные резко отличаются. Количество копий, содержащихся в одном геноме, колеблется для разных мобильных элементов от К) до 1000. Длина нуклеотидной последовательности мобильных элементов варьирует в широких пределах, от 1 тыс. до 10 тыс. пар нуклеотидов. Наличие на концах длинных концевых повторов — типичная черта строения мобильных элементов.

**Способы перемещения.** Существует, вероятно, не менее двух способов перемещения мобильных генетических элементов. Первый из них связан с «вырезанием» мобильного элемента в одном месте хромосом и встройкой его в другом месте. Такие перемещения, по-видимому, имеют обычно случайный, ненаправленный характер. Другой тип событий представляет собой направленные перемещения генетических элементов. В этом случае в исходном положении мобильный элемент сохраняется, но появляется и в новом, хотя и вполне определенном месте. Таким образом, в данном случае речь идет о появлении дополнительной копии мобильного элемента. Для этого необходимо удвоение молекулы ДНК данного мобильного элемента и его последующее встраивание в определенное место генома. Роль мобильных генетических элементов еще предстоит тщательно изучить. Однако в отдельных случаях уже имеется ясность. Так, Б. Мак-Клинтон показала, что встраивание мобильного элемента рядом с геном, контролирующим окраску семян у кукурузы может включать этот ген. В результате окраска зерен изменяется, например с красной на белую. Прозорливость Б. Мак-Клинтон состоит в том, что своими генетическими исследованиями она предсказала существование мобильных элементов в каком-либо гене или в непосредственной близости от него, что может приводить к резким наследуемым изменениям его состояния, т. е. по существу к появлению мутации.

В последнее время стало ясно, что многие давно известные и хорошо изученные точечные мутации у дрозофилы, мыши и других организмов в действительности представляют собой результат встраивания или вырезания мобильных генетических элементов.

45% генома – подвижные (мобильные, или мигрирующие) элементы (ПЭ).

Биологическая роль ПЭ. Проявляются как в онто-, так и в филогенезе.

1. Горизонтальный перенос устойчивости к антибиотикам, лекарствам, ядам – у бактерий.
2. Мутации генов за счет включения ПЭ в кодирующую часть генов.
3. Вмешательство в работу клеточных генов – изменение их активности (рак).
4. Перестройки хромосом, перенос генов и целых наборов генов в пределах одного генома и из одного генома (напр., вируса) в другой (хозяина).
5. Стабилизация концов хромосом у дрозофил.

## 61. ОБЩАЯ СХЕМА ГОМОЛОГ. РЕКОМБИНАЦИИ. ОБРАЗ-Е ДЕЛЕЦИЙ И ДУПЛИКАЦИЙ В РЕЗУЛЬТ ВНУТРИМОЛЕК И МЕЖМОЛЕК ЭКТОПИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ.

Чаще всего рекомбинацию в узком смысле слова связ с кроссинговером, т.е. с перекомбинацией генов, локализованных в гомологичных хромосомах (т.е. гомологичная рекомбинация = кроссинговер). Разработана гипотеза «разрыв-воссоединение». Модель Холлидэя: Проц рекомбинации инициируют разрывы в нитях ДНК одинаковой полярности. Разрывы могут быть и не строго гомологичны. 1 этап: молекулы ДНК, вступающие в рекомбинацию, образуют гибридные участки — так называемые гетеродуплексы, в которых одна цепь происходит от одной молекулы, а другая — от другой. Это полухиазма. Затем она может видоизменяться путем миграции вдоль конъюгирующих хроматид (молекулы ДНК). Этот процесс называется миграцией ветвей полухиазмы. 2 этап: в точке перекреста нити разрываются. При этом рвутся либо нити, в которых были первичные разрывы, либо другие две. Предполагается, что оба типа разрывов равновероятны. Т.е., получаются либо две нерекомбинантные по

концевым маркерам молекулы (A-C, a-c), несущие гибридный участок-зону гетеродуплекса в районе средн маркера V\b, либо 2 мол,рекомбинантные по концевым маркерам и также гетеродуплексные в районе средн маркера.

Поскольку, согласно положению Уотсона и Крика, мутации- это изменения чередования нуклеотидов в ДНК, аллели одного гена, в частности V/b, различаются по составу нуклеотидов( как мин по 1 паре оснований). Тогда в участке гетеродуплекса должна образоваться зона локального неспаривания оснований. Эти участки узнают спец ферменты репарации,обеспечивающие структ стабильность ДНК. Они устраняют неспаренное основание и заменяют его на комплементарное. В таком проц коррекции с равной вероятностью матрицей служит 1 из 2 нитей гетеродуплекса.

Эктопическая рекомб. –кроссинговер между отдельно повторяющимися гомологичными последовательностями,разбросанными по геному.

Внутрихромосомные перестройки(=абберации) подразделяют на дефишенси, или концевые нехватки; делеции — выпадения частей хромосомы, не захватывающие теломеру; дупликации, или удвоения (умноже-ния) части хромосомы; инверсии — изменения чередования генов в хромосоме вследствие поворота участка хромосомы на 180°.Межхромосомные перестройки включают транслокации — пе-ремещения части одной хромосомы на другую, не гомологич-ную ей. Делеции.Вследствие нехваток хромосомы укорачиваются, и физическое отсутствие участка одного из гомологов приводит к гемизиготному состоянию генов, находящихся в нормальном гомологе. Если теряются доминантные аллели одного из гомологов гетерозиготы, то наблюдается фенотипическое проявление рецессивных аллелей хромосомы, не затронутой абберацией. Поскольку вследствие делеций теряются участки хромосом, у гетерозигот по этим..перестройкам наблюдаются характерные нарушения .Более длинная хромосома образует петлю на участке, соответствующем делеции. Делеции обычно летальны в гомозиготе,что указывает на выпадение жизненно важных генов. Дупликации могут происх в пределах одной хр или сопровождаться переносом копии участка на др хр.

Повторы, возникшие в одной хромосоме, могут распола-гаться тандемно (ABCBCDE...) или инвертировано(ABCCBDE). По-видимому, главной причиной множественных повторов участков генетического материала является так наз не-равный кроссинговер. Дупликации и делеции часто возникают в результате разрывов хромосом. Дупликации играют существенную роль в эволюции генома, поскольку они создают дополнительные участки генетического материала, функция которых может быть изменена в результате мутаций и последующего естественного отбора.

## 62. САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ.

Геном фага  $\gamma$  проникает в бактериальную клетку в линейной форме, однако на концах линейной молекулы ДНК есть так называемые липкие концы — однонитевые участки по 12 нуклеотидов, комплементарные друг другу. В клетке ДНК  $\gamma$  замыкается в кольцо. В таком виде она интегрирует в геном бактерии. Кольцо генома А, реципрочно рекомбинирует с кольцом бактериальной хромосомы. Один обмен приво-дит к интеграции ДНК фага  $\gamma$  с ДНК бактериальной хромосомы. Интеграция профага может про-исходить только в одном месте на хромосоме E. coli, названном att X (attachment site/.)- Аналогичный участок есть в геноме бак-териофага. При этом рекомбинация происходит в отсутствие про-тяженной гомологии. Общим у фага и бактерии оказался участок всего в 15 п. н.:

...GCTTTTТАТАСТАА...

(показана только одна цепь ДНК)

Вырезание (эксцизия) профага из хромосомы осуществляется по тому же механизму реципронной, сайт-специфической реком-бинации. Как интеграцию, так и эксцизию профага Л контролируют два фаговых гена: int и xis.Сайт-специфическая рекомбинация происходит точно, но не безошибочно. Приблизительно один раз на 1 млн. при эксцизии профага рекомбинация осуществляется не в сайте, а захватыва-ет участки gal или bio. Так возникают трансдуцирующие частицы, у которых часть генетического материала профага замещена гена-ми бактерии. Во всех этих случаях в рекомбинацию во-влекаются те же последовательности из 15 пар нуклеотидов, кото-рые встречаются в генах gal и bio. За пределами этих 15 п. н. гомология отсутствует. Сайт-специфическую рекомбинацию про-водит фермент интегразы, кодируемый локусом int фага  $\gamma$ .

## 63. ТРАНСПОЗИЦИЯ. СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ПРО- И ЭУКАРИОТ.

Классификация мутаций: внутрихромосомные, межхромосомные перестройки и промежуточное положение – *транспозиции*, т.к. они могут происходить как между негомологичными хромосомами, так и в пределах одной хромосомы.

Транспозиция – перемещение небольших участков генетического материала в пределах одной хромосомы или между разными хромосомами. Происходят при участии особых подвижных или мигрирующих генетических элементов. Изучение молекулярной структуры мобильных генетических эл-тов на мутантной по 3 lac-генам E.coli –1960. Общими для этих мутантов были вставки большей или меньшей длины. Эти вставляемые в разные участки генома молекулы ДНК – IS-элементы (insertion sequenses). Особенности этих элементов: 1)на концах инвертированные повторы нуклеотидной последовательности (десятки пар нуклеотидов) 2) большинство Isэлементов содержит ген для фермента транспозазы, ответственных за их перемещение 3) могут содержать несколько сигналов начала и конца транскрипции 4) в точке внедрения каждого элемента всегда обнаруживается дупликация (4-9 пар нуклеотидов). Есть 3 мех-ма транспозиции для эукариот: 1) эксцизия предсуществующего транспозона с переносом на новое место – нерепликативная транспозиция. 2) репликация ДНК транспозона с последующей траспозицией - репликативная транспозиция 3) обратная транскрипция РНК-копии транспозона и перемещение ДНК-копии на новое место – РНК-опосредованная транспозиция.

#### **64. РОЛЬ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПЕРЕСТРОЙКАХ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТРИАЛА И РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ. НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА.**

Перемещаясь случайным образом, мобильные генетические элементы существенно влияют на структуру генетического материала хозяина и имеют фундаментальное значение в формировании генетической изменчивости. Считают, что транспозиционная активность МГЭ вызывает до 80 % спонтанных мутаций и является основной причиной их возникновения. Мобильные элементы оказывают различные регуляторные эффекты.

ДКП содержат двунауклеотидные инвертированные повторы на концах и еще ряд повторов на некотором расстоянии от концов, разнообразные регуляторные элементы (промоторы и терминаторы и энхансеры транскрипции). Наличием регуляторных элементов в ДКП обусловлены различные эффекты ретровирусов и ретротранспозонов, встроенных в хромосомы, на экспрессию соседних генов.

Стабильность гена *in vivo* является одним из его жизненно важных свойств. Однако оказалось, что существование большинства позвоночных животных зависит не только от стабильности их генома, но и от запрограммированной нестабильности ряда генетических локусов.

Например, функционирование иммунной системы основано на происходящих в онтогенезе перестройках генетического материала в локусах, заключающих в себе последовательности генов и ммуноглобулинов .

#### **65. IS-ЭЛЕМЕНТЫ. МЕХАНИЗМЫ ИХ ТРАНСПОЗИЦИИ**

В большинстве своем мобильные элементы прокариот и эукариот построены по сходному плану. Сами элементы состоят из центральной части, фланкированной инвертированными повторами (ИП). Центральная часть обычно содержит ген (или гены), кодирующие белки транспозиции. Главный белок транспозиции – транспозаза. Некоторые бактериальные транспозоны имеют на концах длинные ИП, в свою очередь являющиеся мобильными IS-элементами. В этих случаях центральная часть транспозона содержит только посторонние гены, а гены транспозиции находятся в IS-элементах, причем один из них инактивирован одной или более мутациями.

Структура мобильных элементов определяет механизмы их перемещений. Хотя эти механизмы различаются в деталях, имеется общий принцип реакций транспозиции.

Процесс происходит в 3 этапа.

На первом этапе 2 молекулы транспозазы соединяются с концами подвижного элемента, сводят концы вместе и генерирует в них разрывы, чаще всего в обеих цепях. Затем транспозаза делает в обеих цепях ДНК-мишени ступенчатые разрывы, отстоящие друг от друга на столько пар нуклеотидов, сколько обнаруживается в ДПП данного элемента.

Второй этап – обмен цепями, приводящий к рекомбинации между ДНК оставляя, за счет ступенчатости разрывов, бреши между 5'-Р-концами элемента и 3'-ОН-концами мишени. Катализируемое транспозазой расщепление и замыкание концов цепей ДНК происходит без потери энергии связей и не требует АТФ, что напоминает консервативную сайт-специфическую рекомбинацию. Отличие от последней заключается в том, что транспозаза не образует ковалентной связи с 5'-Р концом ДНК.

На третьем этапе происходит репаративный синтез брешей, формирующий ДПП, а иногда еще и репликация элемента. Таков общий механизм транспозиционной рекомбинации.

IS-элементы: небольшие (размером не более 2,5 т.п.н.) элементы, которые состоят из центральной части с геном транспозазы, фланкированной двумя инвертированными повторами. Основные механизмы транспозиций(на рисунках):Репликативная транспозиция отличается тем, что мобильный элемент, перемещаясь в другую молекулу, оставляет свою копию в исходной ДНК. Это может произойти только за счет удвоения (репликации) элемента.

При репликативной транспозиции на концах подвижного элемента происходят разрывы с образованием выступающих 3'-ОН-концов. Одновременно транспозаза делает разрывы в ДНК-мишени. 3'-ОН-концы подвижного элемента ковалентно связываются с 5'-Р-концами мишени, и образуется структура с двумя вилками репликации на концах подвижного элемента. В вилках репликации иницируется синтез ДНК (направленный «внутри»). В результате образуется две копии мобильного элемента. При этом репликоны, содержащие «старую» и «новую» копию мобильного элемента сливаются (образуется коинтеграт).

Коинтеграты разрешаются (разрезаются) на 2 репликона в рекомбинационном *res*-сайте ферментом резолвазой. Старая и новая копии мобильного элемента в коинтеграте находятся в одной ориентации, и разрешение коинтеграта идет через сложную фигуру, напоминающую восьмерку. В результате снова образуется 2 репликона, но теперь каждый из них несет копию мобильного элемента. Реакция относится к сайт-специфической рекомбинации.

Репликативный механизм транспозиции распространен сравнительно мало. Он обнаружен у мобильного элемента *Is6*, фага *Mu* и бактериальных транспозонов семейства *Tn3* с короткими ИП.

Нерепликативная транспозиция заключается в вырезании элемента и его перемещении в новое место. При этом 2 молекулы транспозазы связываются с концами мобильного элемента и делают разрывы одновременно в обеих цепях ДНК на концах мобильного элемента и в ДНК-мишени. Далее транспозаза сводит вместе концы мобильного элемента и ДНК-мишень, 3-ОН-концы элемента соединяются с 5-Р-концами ДНК-мишени, а между 3'-ОН-концами ДНК-мишени и 5'-Р-концами элемента образуется брешь, которая заполняется с помощью репаративного синтеза ДНК, в результате чего на концах мобильного элемента возникают ДПП строго фиксированной длины.

В исходном репликоне остается ДНР. Будет ли он репарирован – зависит хозяйской клетки.

Этот механизм характерен для большинства мобильных элементов бактерий и эукариотических элементов с короткими ИП. По такому типу перемещаются многие IS-элементы и мобильные элементы, которые называют составными: *Tn5*, *Tn9*,

Tn10 и другие. Составные транспозоны отличаются тем, что у них инвертированные повторы представлены IS-элементами, которые находятся в обратной или (гораздо реже, например, Tn9) в прямой ориентации.

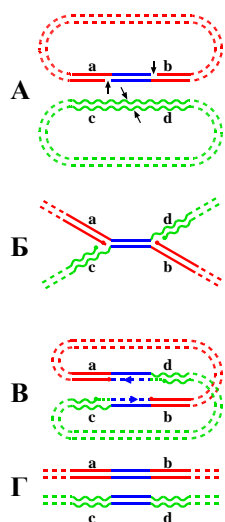
## 66. ТРАСПОЗОНЫ ПРОКАРИОТ. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ. МЕХАНИЗМЫ ТРАСПОЗИЦИИ СОСТАВНЫХ И НЕСОСТАВНЫХ ТРАСПОЗОНОВ.

Собственно транспозоны несут кроме транспозазы другие гены, не имеющие отношения к транспозиции (чаще всего гены устойчивости к антибиотикам).

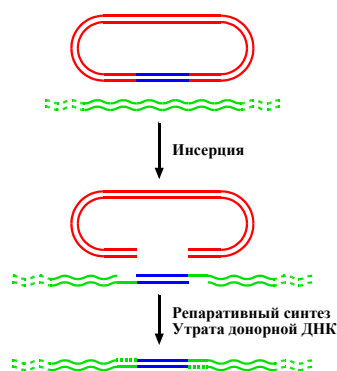
Собственно транспозоны можно в свою очередь разделить на следующие группы

- 1) **Сложные транспозоны** (семейство Tn3) – короткие ИП на концах, делают в ДНК-мишени ДПП из 5 п.н. и перемещаются по механизму репликативной транспозиции.
- 2) **Составные транспозоны** (Tn5, Tn9, Tn10) с длинными ИП, представляющими собой различные IS-элементы. Длина ДПП обычно 9 п.н.

Модель репликативной транспозиции (Shapiro, 1979)



Модель нерепликативной транспозиции (Berg, 1977)



**Транспозон Tn3** представляет семейство мобильных элементов с короткими ИП (35-50 п.н.), перемещающимися с помощью **репликативной транспозиции** и образующими ДПП из 5 п.н.

У самого Tn3 центральная часть содержит гены транспозазы, резолвазы и бета-лактамазы *bla* (обеспечивает устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда). Ген транспозазы *tnA* кодирует большой белок из примерно 1000 а.о., ген резолвазы *tnR* кодирует белок из 185 а.о. Гены транспозазы и резолвазы транскрибируются в противоположных направлениях с промоторов, расположенных в межгенном пространстве длиной 170 п.н. В межгенном пространстве находится и сайт *res*, по которому происходит разрешение коинтеграатов.

Транскрипции генов резолвазы и транспозазы конкурируют друг с другом, и ген резолвазы выступает как ген-регулятор гена транспозазы. К семейству Tn3 относятся Tn1, Tn1000 и др.

**Нерепликативная транспозиция** заключается в вырезании элемента и его перемещении в новое место. При этом 2 молекулы транспозазы связываются с концами мобильного элемента и делают разрывы одновременно в обеих цепях ДНК

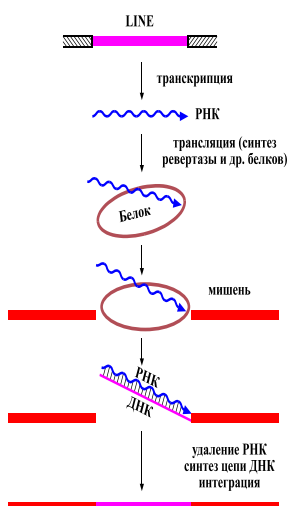
на концах мобильного элемента и в ДНК-мишени. Далее транспозаза сводит вместе концы мобильного элемента и ДНК-мишень, 3'-ОН-концы элемента соединяются с 5'-Р-концами ДНК-мишени, а между 3'-ОН-концами ДНК-мишени и 5'-Р-концами элемента образуется брешь, которая заполняется с помощью репаративного синтеза ДНК, в результате чего на концах мобильного элемента возникают ДПП строго фиксированной длины.

В исходном репликоне остается ДНР. Будет ли он репарирован – зависит хозяйской клетки. Этот механизм характерен для большинства мобильных элементов бактерий и эукариотических элементов с короткими ИП. По такому типу перемещаются многие IS-элементы и мобильные элементы, которые называют составными: Tn5, Tn9, Tn10 и другие. Составные транспозоны отличаются тем, что у них инвертированные повторы представлены IS-элементами, которые находятся в обратной или (гораздо реже, например, Tn9) в прямой ориентации.

## 68. ХАРАКТЕРИСТИКА РЕТРОТРАСПОЗОНОВ У ЭУКАРИОТ. МЕХАНИЗМ ТРАСПОЗИЦИИ. ГЕНОМЫ ЭУКАРИОТ И РЕТРОЭЛЕМЕНТЫ.

У эукариот широко распространены ретротранспозоны, в транспозициях которых задействованы фермент обратная транскриптаза (ревертаза) и РНК-копия элемента в качестве интермедиата. Ретроэлементы подразделяются на 2 группы:

- 1) Ретротранспозоны с длинными прямыми концевыми повторами (ДКП) (класс I.1). Их структура соответствует ДНК-копиям геномов ретровирусов позвоночных, которые также являются мобильными элементами.



- 2) Ретроэлементы (класс I.2), не содержащие повторов на концах (некоторые авторы используют для них название «ретропозоны»).

Ретровирусы являются «прототипами» ретротранспозонов.

У ретроэлементов с ДКП транспозиция происходит по схеме, включающей РНК-интермедиат. С геномной ДНК элемента транскрибируется РНК-копия, но уже с короткими концевыми повторами, с нее путем обратной транскрипции синтезируется ДНК-копия с ДКП, которая встраивается в новое место с помощью интегразы.

Интеграция ретротранспозонов с ДКП происходит по механизму, идентичному с нерепликативной транспозицией у прокариот.

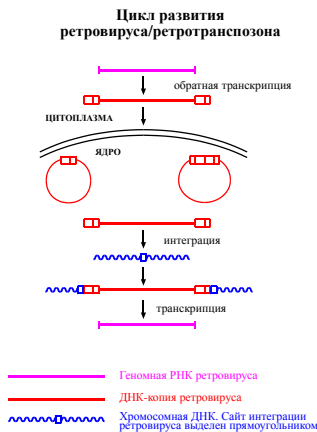
Интегразы ретротранспозонов, несмотря на различие в названиях, полностью соответствуют транспозазам.

Рекомбинация у ретроэлементов без концевых повторов менее изучена, но она также осуществляется через РНК-интермедиат.

Другая группа ретротранспозонов – элементы класса I.2 (ретропозоны). Их размер – тоже около 5-6 т.п.н., но на концах они не имеют повторов. На 3'-конце они содержат небольшую последовательность поли-А.

Прямых повторов в ДНК-мишени они либо не образуют, либо делают не всегда, и, если делают, то нерегулярной длины. Ретротранспозоны класса II можно разделить на 2 типа:

LINE (long interspersed nuclear elements) и SINE (short interspersed nuclear elements) – длиной 200-300 п.н., которые не кодируют никаких белков и не способны к самостоятельному перемещению, а перемещаются, по-видимому, за счет элементов LINE.



Механизм перемещения LINE- и SINE-элементов представлен на рисунке. В отличие от ретротранспозонов I типа, здесь реакцию интеграции в хозяйский геном инициирует РНК-копия элемента. Эндонуклеаза делает ступенчатые ОНР в ДНК-мишени и РНК-копия прикрепляется к концу ДНК-мишени в точке разрыва. На матрице РНК-копии с помощью обратной транскриптазы строится ее ДНК-копия. Свободная группа 3'-ОН в точке разрыва используется как праймер для обратной транскриптазы. Потом РНК-копия удаляется с помощью РНКазы H, клеточная репаративная система достраивает вторую цепь ДНК, которая оказывается интегрированной в реципиентную ДНК. При этом на концах встроенного элемента могут возникать ДПП различной длины.

SINE-элементы не способны к самостоятельной транспозиции и используют соответствующий аппарат LINE.

Рассмотренный процесс принципиально отличается от других механизмов не только транспозиции, но и других типов рекомбинации вообще тем, что здесь не происходит расщепления ДНК на концах элемента и не происходит обмена цепями ДНК.

## 69-72. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ЭУКАРИОТ. ЛАС-ОПЕРОН ПРОКАРИОТ (СТРОЕНИЕ И ТИПЫ РЕГУЛЯЦИИ).

Часто гены экспрессируются последовательно: активация одного гена вызывает экспрессию другого или нескольких генов, приводя в к каскаду событий. Некоторые гены или родственные группы генов экспрессируются координированно, т. е. отвечают на регуляторный сигнал одновременно и, как правило, в одинаковой степени.

### Регуляция экспрессии генов у прокариот

#### А) Регуляция содержания РНК в процессе биосинтеза

Образование РНК у прокариот чаще всего регулируется на уровне инициации транскрипции несколькими способами. Первый заключается в модификации структуры РНК-полимеразы. Так, бета-(или бета-прим) субъед. РНК-полимеразы *E. coli* изменяется при заражении клеток некоторыми бактериофагами. Другой пример - образование новой, сигма-субъед. при споруляции определенных штаммов *Bacillus*. И в том и другом случае изменяются способность РНК-полимеразы к связыванию с промотором и скорость транскрипции соотв-щих генов. Второй способ - изменение пространственной структуры ДНК, что влияет на способность РНК-полимераз связываться с определенными промоторами и инициировать синтез РНК. И наконец, взаимодействие РНК-полимеразы с некоторыми промоторами может ингибироваться или стимулироваться белками, которые связываются с ДНК в месте присоединения полимеразы или вблизи него. На связывание таких регуляторных белков - *репрессоров* и *активаторов* - часто влияют определенные метаболиты, играющие роль *корепрессоров* и *коактиваторов*.

Скорость элонгации РНК зависит также от вторичной структуры мРНК. Сигналы, которые определяют, дойдет ли транскрипция до конца или закончится преждевременно, играют ключевую роль в регуляции уровня мРНК. В подобных случаях за прекращ-е или продолж-е транскрипции отвечают определ. нуклеотидные последов-ти и белки.

#### Б) Согласованная регуляция экспрессии генов

Согласованная регуляция групп родственных генов. У *E. coli* гены, кодирующие белки одного и того же метаболического пути или определяющие близкородственные функции, часто рег-ся соглас-но. Это значит, что их экспрессия нач-ся и заканч-ся или согласованно продолжается в ответ на один и тот же регуляторный сигнал. Гены, подчиняющиеся согласованной регуляции, в геноме часто бывают сцеплены и транскрибируются с промотора, находящегося на 5'-конце такой группы генов (кластера), в виде единственной молекулы РНК, называемой **полицистронным** (или полигенным) транскриптом. Группа координированно экспрессирующихся генов называется **опероном**. Три гена, кодирующие ферменты, ответственные за метаболизм галактозы у *E. coli*, организованы в оперон с промотором (P) и примыкающим к нему регуляторным сегментом-оператором (O) на 5'-конце транскрибируемой последовательности: *galE-galT-galK*. Ген *galR*, кодирующий репрессор *gal*-оперона, не сцеплен с опероном.

Гены, кодирующие несколько родственных функций, не всегда образуют единый оперон. Так, гены, кодирующие 30S- и 50S-рибосомные белки, организованы во множественные опероны, в чей состав иногда входят гены, кодирующие другие белки, которые участвуют в транскрипции и/или трансляции

**Позитивная и негативная регуляция.** Негативная регуляция инициации транскрипции, или репрессия, осуществляется белками-репрессорами, которые связываются с операторами. Поскольку последовательности оператора и промотора часто перекрываются, связывание репрессоров со своими операторами ограничивает доступ РНК-полимеразы к промотору, подавляя тем самым инициацию транскрипции. Позитивная регуляция может осущ-ся путем связывания специфических белков с нуклеотидными последовательностями, расположенными в области промотора. Считается, что связанный активаторный белок способствует ассоциации РНК-полимеразы с промотором и, следовательно, увеличивает вероятность инициации транскрипции.

Гены, кодирующие регуляторные белки, которые связываются с операторными или активаторными последовательностями, могут находиться как вблизи контролируемых ими генов, так и далеко от них. Например, ген, кодирующий репрессор галактозного оперона (*galR*), не сцеплен с транскрипционной единицей, состоящей из генов



*galE*, *galT* и *galK*. Напротив, позитивная или негативная регуляция транскрипции арабинозного оперона зависит от того, образуется или нет комплекс между арабинозой и белком, кодируемым только сцепленным с опероном геном *araC*.

#### В) Регуляция экспрессии лактозного оперона

**Негативная регуляция.** Бактерии *E. coli* могут использовать в кач-ве единств. источника углерода и энергии лактозу, поскольку они способны образовывать в большом количестве  $\beta$ -галактозидазу - фермент, расщепляющий лактозу на глюкозу и галактозу. Однако при росте на других источниках углерода в клетках *E. coli* образуется очень мало  $\beta$ -галактозидазы. Ген, ответственный за синтез  $\beta$ -галактозидазы (*lacZ*), называется индуцибельным, поскольку кодируемый им фермент синтезируется только тогда, когда в клетке присутствуют сахара, имеющие  $\beta$ -галактозильные остатки. Помимо  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозиды индуцируют образование еще двух белков:  $\beta$ -галактозидпермеазы (кодируемой геном *lacY*), необходимой для проникновения  $\beta$ -галактозидов в клетку, и  $\beta$ -галактозидтрансацилазы (*lacA*), фермента с невыясненной пока функцией. В этих трех генах - *lacZ*, *lacY* и *lacA* - содержится вся информация о белках, кодируемых *lac*-опероном. Они транскрибируются в единую полицистронную РНК, при трансляции которой образуются почти одинаковые количества соответствующих белков.

Со структурными генами *lac*-оперона связаны несколько типов регуляторных элементов. **Промотор**-это нуклеотидная последовательность, с которой связывается РНК-полимераза и начинается транскрипция трех структурных генов.

**Оператор**-это сайт, с которым связывается *lac*-репрессор, подавляющий транскрипцию *lac*-оперона. Ген *lacI*, не входящий в состав *lac*-оперона, кодирует репрессор-полипептидную цепь с мол. массой 37000 Да. Репрессор прочно связывается с оператором, находясь в тетрамерной форме.

Поскольку промоторная и операторная последовательности перекрываются, связывание репрессора с оператором мешает связыванию РНК-полимеразы с промотором, что приводит к блокированию транскрипции структурных генов.

Транскрипцию оперона можно индуцировать, если заблокировать связывание репрессора с оператором. Такое блокирование происходит при связывании одного из  $\beta$ -галактозидов с той или иной субъединицей репрессора, что уменьшает сродство последнего к оператору. После отсоединения репрессора от промотора полимеразы может связаться с промотором и инициировать транскрипцию оперона.

Очень важно сохранение нуклеотидной последовательности домена *lac*-оператора, связывающего репрессор. Мутации, уменьшающие сродство репрессора к оператору, приводили к **конститутивному** синтезу ферментов, кодируемых *lac*-опероном, т. е. к экспрессии *lac*-ферментов в отсутствие индуктора. Мутации, сопровождающиеся накоплением репрессора в клетках или увеличением сродства репрессора к оператору, делали *lac*-оперон неиндуцибельным.

**Позитивная регуляция.** Для экспрессии *lac*-оперона, как и других индуцибельных оперонов, необходимо не только снять репрессию оперона, но и получить некий сигнал. Таким сигналом служит комплекс **циклического АМР** (сАМР) с белком-активатором катаболизма (CAP-catabolite activator protein), который связывается со специфической послед-тью, находящейся в самом начале *lac*-промотора. сАМР, образуется из АТФ в ответ на самые разные вне-и внутрикл. события. CAP представляет собой димер из идентичных полипептидных цепей с мол. массой 22 кДа. Связывание комплекса CAP-сАМР со специфической последовательностью в начале промотора приводит к усилению транскрипции *lac*-оперона почти в 50 раз. Сам по себе CAP не способен к такому связыванию и стимуляции транскрипции. Усиление транскрипции с помощью комплекса CAP-сАМР можно объяснить тем, что, связываясь с ДНК в непосредственной близости от сайта присоединения РНК-полимеразы, он усиливает сродство этого фермента к промотору. Альтернативная гипотеза заключается в том, что связывание CAP-сАМР с CAP-сайтом предотвращает присоединение РНК-полимеразы к расположенному поблизости слабому промотору и увеличивает тем самым вероятность того, что полимеразы свяжется с «правильным» промоторным сайтом.

#### Г). Временная регуляция генной экспрессии в жизненном цикле бактериофага $\lambda$ .

У бактериофага  $\lambda$  есть два альтернативных способа существования. При **литическом** пути все вирусн. гены экспрессируются в определ. временной послед-ти, в рез-те чего образ. примерно сотня фаговых частиц и происходит лизис инфицированной бактерии. Интегрированная форма вирусн. генома называется **профагом**. В лизогенных клетках профаговая ДНК многократно реплицируется при помощи клеточн. ап-та так, как будто она является частью клеточного генома. При этом, однако, все фаговые гены, кроме одного, выключены.

**Литический путь.** Гены, кодирующие структурные белки (головки и хвосты), сконцентрированы в одной области ДНК; гены, кодирующие ферментативные (репликацию и рекомбинацию) и регуляторные (репрессию и антитерминацию) функции, сосредоточены в другой области генома.

После инфекции фаговая ДНК замыкается в кольцо путем соединения липких концов. Затем РНК-полимераза *E. coli* транскрибирует те фаговые мРНК, которые кодируют белки, необходимые на самых ранних этапах жизненного цикла, - т.н. предранние мРНК. Одна из этих предранних мРНК транскрибируется справа налево с промотора  $P_L$ , а терминатором служит последовательность  $t_{L1}$ . На этой мРНК ( $L1$ ) синтезируется регуляторный белок N, работающий как антитерминатор. Другая предранняя мРНК транскрибируется слева направо с промотора  $P_R$  к терминатору  $t_{R1}$  и кодирует только белок Cro.

По мере накопления белка N происходит аттенуация (ослабление; регуляция транскрипции с помощью сигнала терминации транскрипции, расположенного между промотором и началом первого структурного гена) терминации в  $t_{L1}$  и  $t_{R1}$ , РНК-полимераза продолжает транскрипцию через эти сайты с образованием мРНК второго типа - задержанных ранних транскриптов. Более крупный транскрипт, начинающийся с промотора  $P_L(L2)$ , кодирует ферменты, участвующие в рекомбинации, и ферменты, катализирующие встраивание ДНК фага  $\lambda$  в ДНК клетки-хозяина. Задержанный ранний транскрипт, начинающийся с промотора  $P_R(R2)$ , кодирует ферменты, ответственные за репликацию фаговой ДНК (белки O и P), и еще один регуляторный белок Q. Белок Q вызывает аттенуацию терминации транскрипции в терминаторном

сайте ( $t_{R3}$ ), расположенном сразу за промотором  $P_R$ . При транскрипции с промотора  $P_R$  транскрибируются гены (S и R), ответственные за включение лизиса клеток. К.т., поскольку ДНК фага  $\lambda$ , сразу после инфекции замыкается в кольцо, S- и R-гены оказываются рядом с генами, кодирующими белки головки и хвоста фага. След-но, в рез-те транскрипции, инициир-ной в  $P_R$  и продолженной через  $t_{R3}$ , образуется мРНК, кодирующая белки лизиса и все структурные вирусные белки. Итак, мы рассмотрели образование аппарата, необходимого для литич.инфекции: ферментов репликации вирусной ДНК и вирусных белков, участвующих в формировании зрелых фаговых частиц.

**Лизогенный путь.** Для того чтобы понять это, нужно усложнить схему строения промоторов  $P_L$  и  $P_R$  и ввести несколько дополнительных генов, генных продуктов и промоторов. На самом деле  $P_L$  и  $P_R$  являются частью сложной регуляторной области, в которой промоторы перемежаются с операторными послед-тиями  $O_L$  и  $O_R$  соответственно.  $O_L$  и  $O_R$  - это сайты связывания двух регуляторных белков: репрессора  $cl$  и антирепрессора  $Cro$ . Белок  $Cro$ -это продукт трансляции предранней мРНК, транскрибируемой вправо с промотора  $P_R$ . Репрессор кодируется геном  $cl$ , локализованным между  $P_R$  и  $P_L/O_L$ .  $cl$ -мРНК транскрибируется в направлении влево от промотора  $P_{RE}$ , находящегося справа от  $Cro$ -гена.  $P_{RE}$  сам активируется двумя «позитивными» регуляторными белками,  $clI$  и  $clII$ , которые синтезируются после того, как благодаря действию белка  $N$  образуются транскрипты мРНК, инициированные в  $P_R$  и  $P_L$  соответственно.

По мере накопления репрессора  $cl$  происходит его связывание с левым и правым операторными сайтами, в результате чего подавляется экспрессия всех генов, транскрибирующихся с  $P_R$  и  $P_L$ . В этом случае предпочтительным оказывается лизогенный путь, поскольку блокируется образование ферментов репликации и структурных вирусных белков, а небольшое количество интеграционного фермента  $Int$ , синтезированного с задержанной ранней мРНК, успевает катализировать рекомбинацию между фаговой и бактериальной ДНК до момента полной репрессии фаговых генов.

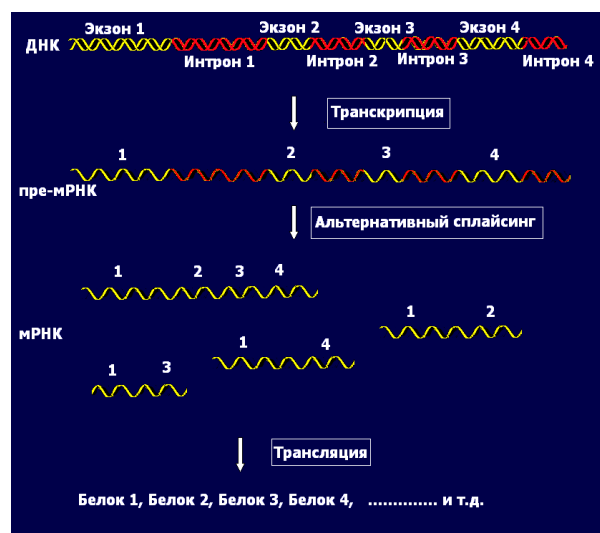
#### Д)Трансляционная регуляция экспрессии некоторых генных продуктов

Синтез белков, составляющих собственно аппарат трансляции, регулируется на уровне трансляции. Гены, кодирующие белки больших (L) и малых (S) субчастиц рибосомы и некоторых белков, участвующих в процессе трансляции (в том числе EF-Tu и EF-G), рассеяны по нескольким оперонам. Это позволяет координированно регулировать синтез тех генных продуктов, которые должны функционировать согласованно. Экспрессия таких генов как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции происходит координированно. Как мы увидим далее, синтез рибосомных белков частично регулируется также путем изменения содержания трех рРНК и кинетических параметров процесса сборки рибосом.

Контроль трансляции некоторых оперонов рибосомных белков осуществляется по одинаковому механизму. Один из рибосомных белков, кодируемый полицистронной мРНК, связывается со специфической последовательностью, локализованной либо на 5'-конце мРНК, либо в начале одной из кодирующих последовательностей в середине мРНК. В обоих случаях это блокирует доступ рибосом к ближайшей инициаторной трансляционной последовательности. В зависимости от места нахождения сайта инициации трансляции мРНК-вблизи 5'-конца кодирующей последовательности или в одном из внутренних участков-блокируется трансляция всей мРНК или ее части. Контроль по типу обратной связи, при котором продукт регулирует экспрессию собственного гена, называется **аутогенной регуляцией**. Регуляция может осуществляться на уровне транскрипции (например, репрессорный белок  $cl$  фага  $\lambda$ , регулирует транскрипцию соответствующего гена с  $P_{RM}$ ) и на уровне трансляции, как в приведенном примере.

При сборке рибосом некоторые из рибосомных белков связываются с рРНК. При наличии достаточного количества рРНК вновь синтезированные рибосомные белки ассоциируют с ней, чтобы иницировать сборку рибосом. При недостатке же рРНК накапливающиеся рибосомные белки связываются с собственной мРНК вместо рРНК и соответственно блокируют собственный синтез и синтез других родственных рибосомных белков. В рез-те предотвращается накопление свободных рибосомных белков. Т.о., некоторые ключевые рибосомные белки-это репрессоры, блокирующие трансляцию кодирующей их мРНК. Одновременно они блокируют синтез и других белков, кодируемых той же мРНК. Способность рибосомных белков узнавать как рРНК, так и свою собственную мРНК связана с тем, что обе эти РНК обладают сходными нуклеотидными последовательностями. Так, последовательности, в которых рибосомные белки S8 и S7 связываются с 16S-РНК и своими собственными мРНК, имеют сходную вторичную структуру, причем петли имеют идентичные послед-ти.

### 73. АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ.



**Альтернативный сплайсинг** – процесс, позволяющий индивидуальным генам продуцировать множество различных активных белковых изоформ.

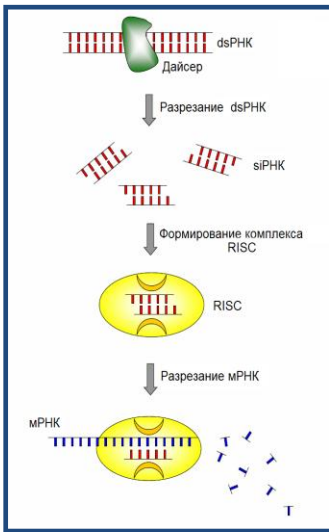
*Примеры альтернативного сплайсинга:*

1) Кальцитонин и белок CGRP - различные пептиды, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга одного гена. Кальцитонин образуется в клетках щитовидной железы и является пептидным гормоном, регулирующим уровень кальция в крови. Белок CGRP – синтезируется в нейронах и является сосудорасширяющим белком, участвующем в формировании вкусовых ощущений.

2) Один из ядерных генов риса продуцирует два совершенно неродственных белка – один является митохондриальным рибосомным белком S14, второй – В-субъединицей митохондриальной сукцинатдегидрогеназы.

## 75. РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ – ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ЭУКАРИОТ НА ПОСТТРАНСКРИПЦИОННОМ УРОВНЕ.

РНК-интерференция (RNA silencing) – это подавление экспрессии генов у эукариот (замалчивание генов) на посттранскрипционном уровне, индуцированное короткими интерферирующими РНК (small interfering RNA, siРНК).



Появление в клетке dsРНК вызывает каскад событий, известный как РНК-интерференция.

1. Фермент Дайсер связывается с dsРНК и разрезает ей на короткие фрагменты в 21-23 п.н. – siРНК (short interfering RNA).
2. siРНК связываются с ферментативным комплексом RISC (RNA-induced silencing complex), который использует одну её нить (комплементарную мРНК) для связывания с мРНК.
3. Нуклеазная активность комплекса RISC деградирует мРНК.

Основные свойства РНК-интерференции:

- Специфичность (подавляется экспрессия только того гена, нуклеотидная последовательность которого полностью соответствует нуклеотидной последовательности вводимой dsРНК).
- РНК-интерференция реализуется на посттранскрипционном уровне (фрагменты dsРНК, соответствующие последовательностям промотора или интрона не вызывали РНК-интерференцию).
- Эффект РНК-интерференции, возникший в каком-либо участке тела *C. elegans* может распространяться по всему организму и передаваться по наследству потомкам.

**76. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ** – использование методов молекулярной генетики и молекулярной биологии для конструирования in vitro рекомбинантных ДНК (или организмов) с заданными наследственными свойствами.

### Задачи генетической инженерии

1. Создание генетических конструкций для изучения фундаментальных научных проблем.
2. Получение биопродуктов.
3. Создание трансгенных организмов с новыми сочетаниями признаков.
4. Генетическая коррекция. Генотерапия.
5. Сохранение и рациональное использование генофондов.

Методы:

- Выделение и синтез генов
- Модификация генов
- Перенос генов
- Анализ генов
- Анализ продуктов генов

**77. РЕСТРИКЦИЯ И МОДИФИКАЦИЯ ДНК** (от позднелат. restrictio-ограничение и modificatio- видоизменение), специфич. р-ции метаболизма ДНК в клетках бактерий, обеспечивающие защиту собственной ДНК от встраивания в нее последовательностей ДНК чужеродного происхождения.

Функционирование систем рестрикции и модификации ДНК основано на след. принципах. С помощью ферментативных р-ций собств. клеточная ДНК специфич. образом модифицируется так, что рестриктазы оказываются по отношению к этой ДНК неактивными. Любая вторгающаяся в клетку чужеродная ДНК отличается от резидентной (собственной) ДНК по специфичности модификации. Это делает чужеродную ДНК чувствительной к действию рестриктаз; разрушению ("рестрикции") подвергаются те молекулы ДНК, к-рые не содержат соответствующих модифицир. элементов.

Роль систем рестрикции-модификации:

- Заключается в защите клеток от проникновения чужеродной ДНК
- По сути их роль у бактерий эквивалентна роли иммунной системы высших организмов

Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции) узнают в ДНК специфические для каждого фермента последовательности нуклеотидов и разрезают ее.

Известно три типа рестриктаз, на практике используют рестриктазы типа II.

Рестриктазы типа II узнают и расщепляют ДНК в строго определенных нуклеотидных последовательностях внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии.

Это ключевые ферменты генетической инженерии. В настоящее время известно около 3500 рестриктаз. Из них около 3200 – рестриктазы типа II.

Рестриктазы служат для получения фрагмента или фрагментов ДНК

Для выявления некоторых мутаций в отдельных генах после проведения ПЦР используется метод рестрикционного анализа. В основе метода лежит использование специальных ферментов – рестриктаз. Эти ферменты способны "находить" участки ДНК, в которых может быть локализована мутация, и "расщеплять" их. По количеству и длине фрагментов ДНК, полученных после действия рестриктаз, можно судить о наличии или отсутствии мутации или генетического нарушения в исследуемом гене.

## 78. СХЕМА ТИПИЧНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА ПО КЛОНИРОВАНИЮ ДНК. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОЛЕКУЛ ДНК.

Клонирование – процесс получения генетически идентичной группы клеток (клонов), основанный на бесполом размножении одной клетки.

Клонирование – процесс получения генетически идентичной группы клеток (клонов), основанный на бесполом размножении одной клетки.

Схема типичного эксперимента по клонированию фрагмента ДНК:

- 1) Получение фрагмента или фрагментов ДНК
- 2) Конструирование *in vitro* рекомбинантных молекул (встраивание фрагмента в вектор)
- 3) Введение их в клетку
- 4) Отбор клонов, несущих рекомбинантную молекулу.

Суть конструирования рекомбин. ДНК заключается во встраивание фрагментов ДНК, среди кот. находится интересующий нас участок ДНК, в так называемые векторные мол-лы ДНК (векторы) – плазмид. или вирусные ДНК, кот. могут быть перенесены в клетки про- и эукариот и там автономно реплицироваться. На след. этапе проводится отбор тех клеток, кот. несут в себе рекомбинант. ДНК (с помощью маркерных признаков, кот. обладает сам вектор), и затем индивидуал. клонов с интересующим нас сегментом ДНК (используя признаки или пробы специфич. для данного гена или участка ДНК).

Существует три основных способа встраивания чужеродной ДНК:

1 случай. 3'-концы фрагментов ДНК, среди кот. находится интересующий нас участок ДНК (ген или его сегмент, регуляторный район), с помощью фермента терминальной нуклеотидилтрансферазы наращиваются гомополинуклеотидной последовательностью (например, поли (Т)). 3'-концы линейной формы векторной ДНК тем же способом наращиваются комплементарной ей гомополинуклеотидной послед-тью (т.е. поли(а)). Это позволяет

соединить две молекулы ДНК путем комплементарного спаривания искусственно полученных «липких» концов.

2 случай. «Липкие» концы создаются с помощью расщеплений мол-л ДНК (как вектор., так и содерж. интересующей нас фрагмент ДНК) одной из эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз). Рестриктазы высоко специфичны. Они «узнают» в ДНК последоват-ть из нескольких нуклеотидных остатков и расщепляют в них строго определенные межнуклеотидные связи. Поэтому даже в ДНК больших размеров они вносят ограниченное число разрывов.

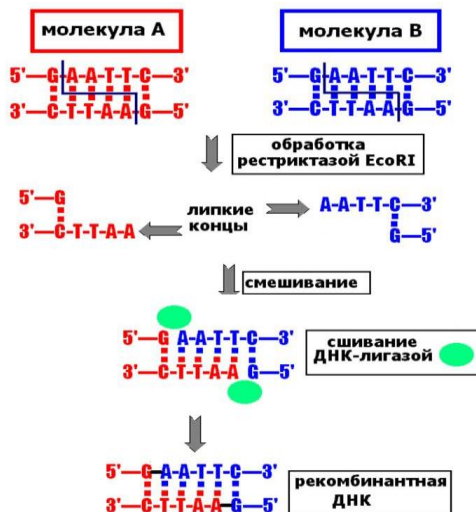
3 случай. Смесь 1 и 2ого. Когда «липкие» концы ДНК, обр. рестриктазой удлинняются синтетическими последоват-ми.

Концы фрагментов можно превратить в «липкие», наращивая их двукратно олигонуклеотидами («линкерами»), в состав кот. входит участок узнавания рестриктазой. Часто в качестве «линкера» используется полинуклеотидные фрагменты, кот. содержат специф. участки для нескольких рестриктаз («полилинкер»-сайт множественного клонирования, включает сайты узнавания многих рестриктаз).

После встраивания чужеродной ДНК в вектор, их ковалентное сшивание

осущ-ся ДНК-лигазой. Если же размер бреши в рекомбиниру. мол-ле больше, чем одна фосфодиэфирная связь, то она встраивается *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы или *in vivo* с помощью репарационной системы.

Принцип конструирования рекомбинантных молекул (см. рис. выше)



## 79. ПОНЯТИЕ О ВЕКТОРАХ. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ВЕКТОРАМ. ВЕКТОРЫ КЛОНИРОВАНИЯ.

Вектор (векторная молекула) – молекула ДНК, способная переносить чужеродную ДНК и обеспечивать ее поддержание в реципиентных клетках. Природными векторами являются многие плазмиды и вирусы (фаги). *Вектор должен:* 1)

Автономно реплицироваться в клетках хозяина; 2) иметь селективный маркер (маркеры); 3) иметь уникальный сайт (сайты) клонирования; 4) не утрачивать способности к автономной репликации в результате инсерции чужеродной ДНК.

+ доп. свойства 5) Стабильно поддерживаться в клетках; 6) Быть многокопийным; 7) быть небольшого размера. + Желательно также иметь сайты рестрикции внутри генов устойчивости к антибиотикам (для плазмидных векторов).

Векторы классифицируются на две большие группы: по назначению и по происхождению. К первой группе относятся векторы общего назначения и специализированные (векторы клонирования, векторы экспрессии, векторы для секвенирования и др.). Ко второй, плазмиды, фаговые (на основе фага λ, на основе однонитчатых фагов), + для клеток животных – векторы на основе эукариотических вирусов: ретровирусов, аденовирусов, вируса герпеса.

Векторные системы включают в себя: 1) Вектор переноса генов (“челночный вектор”), 2) Вектор амплификации (увеличение числа копий генов) 3) Вектор интеграции (включение в хромосому) 4) Вектор экспрессии (увеличение активности гена).

В технологии рекомбинантных ДНК клонирование – это использование процедур манипулирования ДНК для получения множественных копий гена или фрагмента ДНК. Клонирование достигается с помощью перемещения фрагмента ДНК в векторную молекулу. Поскольку имеет место клонирование в векторе одного фрагмента ДНК, такую технологию называют МОЛЕКУЛЯРНЫМ КЛОНИРОВАНИЕМ.

## 80. МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОЛЕКУЛ В КЛЕТКИ.

1. Трансформация — процесс поглощения клеткой организма свободной молекулы из среды и встраивания её в геном, что приводит к появлению у такой клетки новых для неё наследуемых признаков, характерных для организма-донора ДНК. Иногда под трансформацией понимают любые процессы горизонтального переноса генов, в том числе трансдукцию, и т. д. В любой популяции лишь часть бактерий способна к поглощению из среды молекул ДНК. Состояние клеток, при котором это возможно, называют состоянием компетентности. Обычно максимальное число компетентных клеток наблюдается в конце фазы логарифмического роста. Поглощаемая ДНК должна быть двухнитевой (эффективность трансформации однонитевой ДНК на порядки ниже, однако несколько возрастает в кислой среде), её длина — не менее 450 пар оснований. Для некоторых бактерий поглощаемая ДНК должна содержать определённые последовательности. ДНК необратимо адсорбируется на ДНК-связывающем белке, после чего одна из нитей разрезается эндонуклеазой на фрагменты длиной 2—4 тыс. пар оснований и проникает в клетку, вторая полностью разрушается. В случае, если эти фрагменты имеют высокую степень гомологии с какими-либо участками бактериальной хромосомы, возможна замена этих участков на них. Поэтому эффективность трансформации зависит от эволюционного расстояния между донором и реципиентом. Общее время процесса не превышает нескольких минут. Впоследствии, при делении, в одну дочернюю клетку попадает ДНК, построенная на основе исходной нити ДНК, в другую — на основе нити с включённым чужеродным фрагментом (выщепление).

2. Микроинъекции. Принципиальное преимущество микроинъекций в том, что они позволяют эффективно создать трансгенные животные, но их серьезные недостатки: нельзя вводить гены в клетки на более поздних стадиях, в процессе интеграции происходит множество перегруппировок, в геноме оказывается множество копий встраиваемой ДНК, и, наконец, интеграция происходит в произвольное место генома случайным образом.

3. Инфицирование (рекомбинантные фаги и вирусы). ДНК фага встраивается в геном и воспроизводится с каждым циклом репликации.

4. Электропорация. **Электропорация** — воздействие на клетки электрическим импульсом. При этом в клетках образуются поры, через которые проникает ДНК.

5. Бомбардировка микрочастицами с адсорбированной ДНК. ДНК или РНК преципитируется на микрочастицах золота. Стреляет сжатым гелием, ДНК с носителем находится в микрокапсуле.

6. Липосомы (комплекс ДНК с липидами). Гидрофобная частица, состоящая из двойного слоя липидов, без труда проходит в клетку эндоцитозом. ДНК защищена от разрушения ферментами эндосом. Метод применяется для получения трансгенных животных.

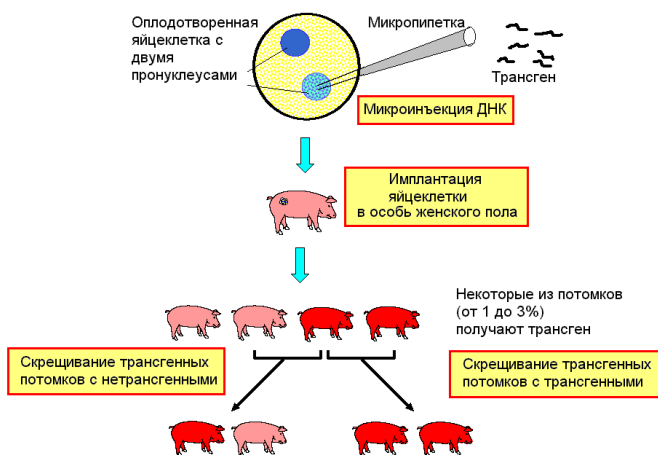
## 81. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ.

ПЦР — это один из методов синтеза определенных последовательностей ДНК *in vitro*. В реакции используются два праймера, которые гибридизуются (отжигаются) с противоположными нитями и фланкируют последовательность ДНК, которую необходимо амплифицировать. *Поскольку фрагмент ДНК, синтезированный в данном цикле может служить в качестве матрицы в следующем цикле, то количество копий заданной последовательности ДНК удваивается в каждом цикле. Повторные серии циклов, включающие денатурацию матрицы, отжиг праймеров и их последующее наращивание с помощью ДНК-полимеразы приводят к экспоненциальному накоплению специфического фрагмента ДНК, концы которого заданы 5'-концами праймеров.*

**Синтез кДНК (сДНА)** Синтез кДНК — это ферментативный синтез двуцепочечной ДНК с использованием в качестве матрицы поли(А)-мРНК.

Первичным субстратом служит биологически активная поли(А)-мРНК, изолированная из эукариотических тканей или культуры клеток и очищенная на олиго (dT)-целлюлозе (афинная хроматография).

Обратные транскриптазы Это РНК-зависимые ДНК-полимеразы у некоторых РНК-содержащих вирусов, которые на матрице геномной РНК синтезируют ДНК-копии РНК. Обычно используют обратные транскриптазы, кодируемые вирусом миелобластома птиц (AMV) или вирусом лейкемии мышей Малони (MMLV).



## 82. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ.

С помощью микроинъекции ДНК в оплодотворенную одноклеточную яйцеклетку. Рекомбинантную ДНК вводят с помощью микроинъекции в один из пронуклеусов оплодотворенной яйцеклетки. Интеграция трансгена (перенесенного генетического материала) происходит случайно и может привести к нарушению экспрессии генов и быть летальной. Трансген интегрирует только в одну хромосому, поэтому трансгенное животное является гемизиготным.

**Трансгенные животные как фармацевтические фабрики (биореакторы).** Продукция фармацевтически- важного белка (например активатора плазминогена для растворения кровяных тромбов) с молоком трансгенной овцы. **Трансгенные быстрорастущие** породы лосося были получены введением гена гормона роста под контролем сильного промотора. Все

особи одного возраста; вес трансгенных рыб в 11 раз выше веса нетрансгенного контроля.