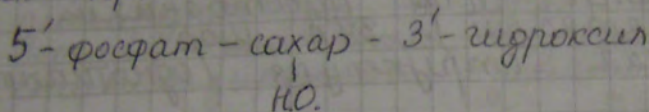


Молекулярная биология

- наука о генах и путях реализации генетической информации.

1869г: Мисшером из ядер белых кровяных тел выделена НК. Потом они были очищены, установлено их простейшее строение (30' и 20В)



В доказательстве ген. роли ДНК ключевую роль сыграли эксперименты:
- трансформация бактерий: Гриффит, 1928
Заражение мыши инактивированной и неvirulentной штаммами пневмококка одновременно приводит к смерти

Эйвери 1944: этот же эффект достигается при смешивании неvirulent штамма с ДНК virulentного.
- опыт Херши и Чейза: белки фага помечены ^{35}S , а НК — ^{32}P ; при заражении в бактерию попадает при этом при встряхивании и отрыва-нии радиоактивная метка остается.

Ряд важных наблюдений до создания модели:

- правила Чаргаффа $A=T$, $G=C$,
- открытие α -спирали в белках, кот. стабилизируются водородными связями;
- получение дифракционных рентг. снимков ДНК.

Анализ вертикально растелуток волокон ДНК Розалинда Франклин получена снимок (в камере при 100% влажности) (B-структура; 72% - A-форма).

Из снимков:

- молекула - спираль
- расстояние 3,4 Å между остатками, 34 Å шаг (по расстояниям между пятнами)
- равномерная структура (однотипные блоки)
- толщина спирали позволила предположить, что она состоит из 2 или 3 цепей ДНК;

Уотсон и Крик назвали паровыми пурин и пиримидинов одинаковые сферически и дающие одинаковые пятки на снимке. Объяснено правило Чаргаффа. Все другие типы спаривания не дают такой структуры. 1962г. НП У, К и Чилкингс.

Чтобы сохранялась равномерность, цепи должны идти антипараллельно.

B-форма шаг 33,2 Å
10 пк на виток
правозакрученная
-1,2° отклонение плоскости оснований от горизонтальной

A-форма шаг 24,6 Å
10,7 пк на виток
правозакрученная
отклонение +19°

Двунитевое РНК и РНК-ДНК гибриды в растворе нах в А-форме.

Z-форма: шаг $45,6 \text{ \AA}$, 12 пн на виток левозакрученная

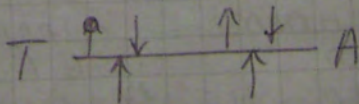
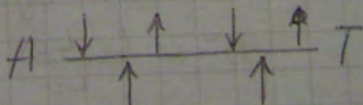
основания "перевернута" В нек промоторах (по крайней мере, бактериальных) точно есть и играет важную роль. Антитела к Z-форме реагируют и в ядре, хотя есть версия, что это неустойчивая форма, стабилизируемая взаимодействием с АТ.

ДНК с параллельными цепями: дискуссионная тема.

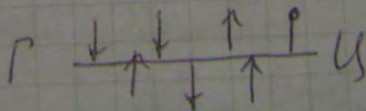
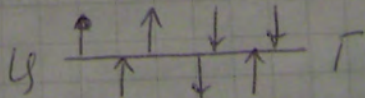
Внутри пары основания могут смещаться. Э даже конформации подобных изменений (tilt, twist ...)

Разное атака, экспонирована в большой и малой бороздках ДНК. Возможно специф. взаимодействие белками.

$A = T$





$C \equiv G$



\downarrow - акцептор; \uparrow - донор

Напр, нуклеозид раб. по угаскам с особой характерной "схемой" расположения доменов и акцепторов (часто с центральной симметрией - палиндромом)

Кроме того, возникают взаимодействия между основаниями триплекса (напр, в TCTCTCT... - тройная спираль), квадруплекса (часто прис. в теломерах, более устойчива). Обычно неканонические пары.

Обращенные повторы и обр. шпильки , крестообразная структура 

Суперспирализация ДНК обычно происходит с кольцевыми молекулами.

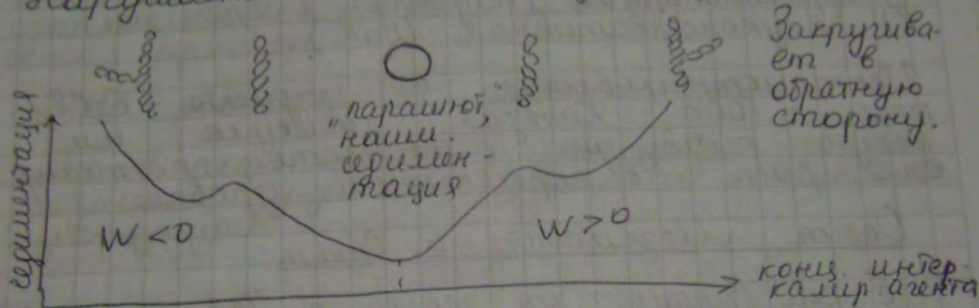
$$L = T + W$$

- L - Linking number - число перекрещивания цепей
- T - twist - число витков двойной спирали
- W - writhe - число супервитков

$$\sigma = \frac{L - L_0}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0}$$

σ - плотность суперспирализации. Обычно $\sim -0,06$ (меньше 1 супер-витке на 17 витков ДНК).

Большая этидия интеркалирует в ДНК, уменьшая спиральзацию ~ на 26 раз, боразивают двойную спираль). Нарушает стеклин взаимодействие.



Топологию ДНК рег. Топоизомераза:

- т.и I вносит врем. оркони. разрыва, релаксирует супервитки про, эукариота
- т.и II вносит врем. 2-х разрыва, релаксир. суперв., разделяет хроматин эу
- гиразы генерирует негативное супервитки, исп. энергии АТФ про
- обр. гиразы ген. + супервитки

Топоизомераза II имеет сложную структуру т.к. оба конца разрезанной ДНК удерживаются. При этом необходимо пропустить другую цепь. Конф. перестройки. (N-ворота, C-ворота...)

DATE 09.10.2009

Репликация ДНК

Альтернативные модели репликации ДНК: (сони 50x)

- а) консервативная (родительская → новая + она же)
- б) фрагментарная (получается 2 50/50 цепи)
- в) полуконсервативная (Уик)

Центрирование в градиенте CsCl:
 при ~ 100g каждая молекула или некую плавучую плотность, поэтому она расп. в определенной úrovке

Опыт Мезельсона и Сталя 1958:

- E coli выращ. на среде с ^{15}N долгое время
- перенесли на ^{14}N
- отбирали проб. ДНК и смотрели ультрацентрированием в град. CsCl.

Предсказание: после смеси тяжелой и легкой (через полуживую) полуконсервативной молекул. Так и произошло: после 2^х делений легкая и полуживая.

В большинстве случаев репликация идет как у про-, так и у эукариот в двух направлениях.

Репликацию ДНК осущ. особые Ф-Тн-
ДНК-Pol. Первой такой Ф-Тн был выделен в лаб. Корнберга (Pol I) в 1956г.

ДНК-Pol I или 3 активных центра. Или активности: 5'-3' - экзонуклеаза, 3', 5' - эндонуклеаза, полимераза.

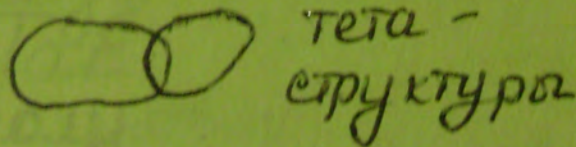
Генетическими методами показано, что ДНК-Pol I в репликации не участвует. Непоср. репликация: ДНК-Pol III. Фрагмент Кеннона.

Опыт Мезельсона

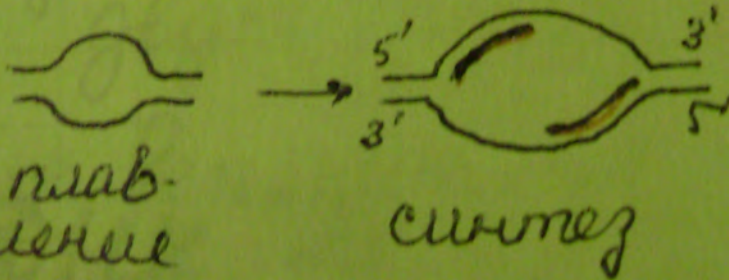
- E. coli выращив. на ^{15}N
- перенесли на ^{14}N
- отбирали пробн

Предсказание: после

репликация колен:



образуется репли-
кативная вилка:



ДНК - Pol I, или
или активности

Все полимеразы ДНК или подобной устроены
 подобие руки (большой палец)
 Все они синтезируют ДНК только в
 одном направлении (5' → 3') и если
 есть праймер.

DNA-pol - palm domain

Сер 2 акт. центра, ори. осущ. полиме-
 ризацию, другой — удаление ошибок
 нуклеотидов

finger

Св. dNTP, помещает правильно в
 кат. центр.

thumb

Прямо не участвует, больше у
 в прикреплении ДНК,

Точность работы обеспечив. же св
 3' и 5' экзонуклеазных участков (непаренное, ошибки
 нуклеотидов). Процессивность

Свойства ДНК-Pol: E. coli: I II III (core)

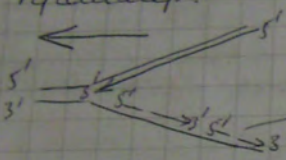
полимераза 3' → 5'
 корр. экзонуклеаза 5' → 3'
 репар. экзонукл

I	II	III (core)
+	+	+
+	+	+
+	-	-

D1 нагала праймер.

синтез необходим РНК-

Pol I - заполнение брешей и удаление праймеров.

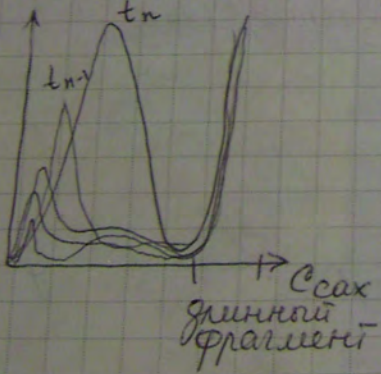


фрагменты Оказаки (показано центриф. в преформе рованном градиенте сахара)

Опыт Оказаки:

ДНК была темпелами

помечена короткое время нуклеотирами, отбора проб в разное время



Есть одна тяжелая фракция и легкая, кот. меняется: 1 цепь формируется непрерывно, другая - из прерывистых фрагментов.

Синтез отстающей цепи:

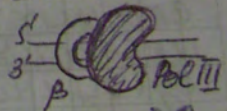
праймаза строит праймер РНК, на кот. сарится ДНК Pol III и строит фр. Оказаки. Затем ДНК Pol I заменяет праймер на ДНК I. Разрыв зашивает лигаза за счет 5'-3' экзонуклеазы

Основные компоненты репликативной машины *E. coli*: (~12-13 шт)

- DNA-гираз : уничтожает супервитки
- праймосома : праймаза хеликаза
- SSB - белок
- pol III, β -clamp, γ -белки и δ -комплекс
- pol I

Процессивность полимераз: количество нуклеотидов, кот. окр. м. синтезируют за то, как свалится с ДНК.

β -кольцо: у *E. coli* сост. из 2х орнаментов. Садится на ДНК в зоне праймера. К нему присоед. ДНК-pol III. Поэтому в таком комплексе ДНК-pol III 3 стаян. от. высокопроцессивной (шаг ~10к). Д/полярки неох. другие белки (напр., clamp-loader)



Инициация репликации ДНК на *oriC*

AT-бог участок, DNA-Boxes
накручивание на белки ДНАА



Затем присоединяются хеликазы, кот. начинают раскручивать ДНК в обоих направл.

Репликация ДНК эукариот

Одновременно начинается во многих участках. Полимераза раб. $5' \rightarrow 3'$
 Эта проблема решается так же - фрагменты Оказки. Полуконсервативная.

В эукар. полимеразы тоже нутедаются в РНК-праймере, но активность праймазы они обладают.

У эукариот от. много Pol с разными свойствами ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon \dots$) Они отлич. и расположением в клетке (напр. только в митохондриях). Точность воспроизведения у всех Pol кроме β , достаточно высокая. δ и ϵ - репликативные, α обладает δ праймазной активностью. ДНК-Pol δ удерживается на ДНК структурой РСМА, которая почти идентична β -кольцу, но состоит из 3х субъединиц. Сами по себе белки разные.

Репликативный комплекс очень похож на прокариотический. Инициацию синтез ф. О м. проводить только Pol α , т.к. только она ил. праймазную активность. Есть репликац. ф. ζ . структуру создает.

Прочесывае хеликазы, уг. в репликация ДНК

Движутся перер вилкой. Изучаются на ДНК-сод. вирусах (SV-40 Антиген - $3'-5'$ проч. хеликазы), ν денат. ν = 75-100 пн/мин, исп. ЕАТР Эукар. хеликазы сост. из 6 субъединиц МЕМ-комплекса ($3'-5'$), активизируется РНК-м.

Сейчас известно > 15 ДНК Pol. Они выполняют довольно узкие ф, а именно замечают ДНК Pol 2, которые встречаются (незарепарированные тиминовые димеры и т.п.) и есть опасность перехода к апоптозу.

Проблема репликации концов ДНК

Если 3' конец недостаточно длинной, чтобы вставить праймер и синтезировать. Оказавшись (50-200 вр) - Незореплицируемо

Тогда: у эукар. хромосом есть теломеры простых коротких из оригинальных блоков (напр. (TTGGGG)_n) (киш. связываются белки (TRF1 и TRF2), предотвр. смятие концов. Ч.к: 5-15kb

Теломераза достраивает теломер, исп. РНК-матрицу находящуюся в самом ферменте, особая ДНК-Pol.

Тогда если произошла незорепликация, теломеры достраиваются. Теломераз пер. теломерными белками (если их много - участок длинной - ингибирование). Если фермента нет, клетки быстро перестают пролиферировать. И наоборот его очень много бывает в раковых клетках.

У разных организмов теломерное повтор отличается => Различаются и РНК-матрицы.

Человек: ~ 15 Pol.

4 группы:

A - γ , ν и θ

B - α , δ , ϵ , ξ

X - β , λ , μ

Y - η , i , κ , Rev 1

γ - реплицирует
МХ ДНК

θ - включает Г-С

Проблема реп

Если $3'$ конец не
заклода вставить
ф. Оказаки (50-

Имитация репликации ДНК у эукариот

Эксперим. подхода:

- функциональное (изучение модельных систем, создание бесклеточных систем);
- структурное (картирование позиций начала репликации и изучение последовательностей).

На дрожжах: найдены ARS-элементы. Нестабильный рост плазмиды в клетку попарает, но не реплицируется. Поэтому сначала хороший рост, а потом плазмиды стаб. мало, есть слетки без нее \Rightarrow на селективной среде плохо растут.

ARS - автокожно реплиц. последовательности

ARS - AT-бог. регион - 11 bp consensus у плазмид!

Считается, что ARS им. дощечную структуру. Всегда есть: AT-бог. регион, 11 bp consensus, легколабкий домен

Вопрос: так ли в хромосомах? Если так, то все ли ARS - точки начала репликации?

Слопенки электрофоретическим методом показано, что все точки ими-циации - ARS, но не все ARS работают in vivo как точки начала репликации.

В геноме внешних эукариот есть точки, кот. преимущественно эв. участвовали на этапе репликации. Их сила разная. Изучение на клетках китайского хомячка. Ori в 3'-области гена D DNA. Предпочтительные позиции на этапе репликации, а не точки.

С пом. техники интеграции ДНК в новые геномные позиции показано, что часто эти участки на этапе репл. и в других местах генома. Интересно, что конкретных признаков нет.

Комплексы и 6 высококонсерв. белков (ORC1-6) с общей $M \sim 450$ кДа связывается с консервированной посеребрительностью дробящихся ARS и с участками начала репликации внешних эукариот.

Инициация:

ORC + комплекс белков MCM 10	Cdc (cell division cycle) Cdc 6 и Cdt1 неода с (посадки MCM 2-7 белков на связ. с ДНК MCM 10
---------------------------------------	---

Cdc 7 (Dbf4 - зависимая киназа) Pct малая активация латентной геликазы.

Белки ORC-комплекса (либо Pct, либо подверг. модификациям - напр., убиквитинирование).

DATE 16.10.09

cdc-гены, cell division control

Как правило каскад

- убиквитинирование;
- циклин: управляет циклом клетки;
- киназа, активирует циклины;
- фосфорилирование и фосфатазы;
- протеосома.

Cdk - циклин-зависимая киназа. Зависит от клеточной циклин от уровня Cdk. Напр., возможность сборки репликационного аппарата.

2 главные фазы кц: S и деление. G1 и G2 (Gар1 и Gар2 - "дожки") - между ними. Критические моменты (чекпойнты).

- переходить к S или кет
- делиться или кет (если все в порядке)
- Долго до деления с двойным набором хромосом клетки вперед не могут.
- завершение митоза (когда все на веревке)

Опять по перенесению цитоплазма из клеток в одну и т.д. этапе в клетку ко другом. Напр., и заставить клетку делиться

MPF - mitosis promoting factor

"
Cdk1 (всегда есть в клетке)

Cyclin B (синтез начин. в G1 и заканч. в середине M, накопление продукта)

Cdk1 неактивна вне комплекса с Cyclin B.

2^o уровень регуляции: 6 АУ 2 остатка (Trt14 & Tyr15). Если Р-на, Cdk7 неактивна
даное в присутствии Cyclin B. Реме
химазой Wee1 (стерилизу прел. связь -
важно АТР & АУ). APC - anaphase promoting complex

В конце работа комплекса Cdc25.
Разрушает связь с Р, активирует
Cdk1 - Cyclin B. А белки APC убив. cyclin B,
и он провер. противосп. убиив. cyclin B,
остатки (АУ слова Р-на)

Переход от G1 к S
(G1 checkpoint)

Клетка легко существ. в G0: вне
цикла возвращение к G1 иногда опасно
и ведёт к обр. злокач. опухолей.

G1 → S: зависит от вн д/клетки условий

Cdk2 - циклин E
Cdk4 } циклин D
6 }

Актив. работу ТФ E2F-1,
активирующий от много
генов, ксодх. д/репликации
(полимераза, митохон.,
регулятор и др.)

Белок ретинобластомы связ. с E2F-1 и
плат его неакт. Cdk4 + Cdk6 (Рем
ретинобластоме и освоб. E2F-1. Регуляция
сверху

- Ф роста, возглавляющий рег. каскад и синтез циклина B
- ингибитор; от многих Ф зависят.
- Напр, контактное торможение: клетки в монослое дальше не растут.
- Через каскад киназ.

Cdk2 - циклин E
Cdk4 } циклин D
6 }

Арт
арт
гене
(но
пер

ФР → Ras → Map → CyeD → Cdk4
киназа

CKIs - ингибиторы Cdk4

↑
cell.
cell
contact

p53
апоптоз
в норме его
нет (если
наруш. ДНК,
возрастает синтез)

Бласте
Медик
и

возра
мелк
от
пакт
монд
к

Порядок действия р53: через него и включать клеточный цикл.

По ходу репликации сестр. хроматидов скрепа когезиновыми связками. Кольца из когезина так или иначе навешивают дочерние хроматиды. Когда надо разойтись: слизины расцепляются сепаразой (она неактивна пока есть ингибитор securin) (сепараза по Φ - протеаза).

Репликоны и кластеры репликонов

Геном очень крупный (у г-ка $2 \cdot 10^5$ в.р.) поэтому накладываются репликация в во многих точках. растеливают на стеклах ДНК "fiber autoradiography" - (Руберман)

Сначала показано на меченых dNTP. Потом на антителах к бромдезоксисуридину: кластеры репликонов различны (по своему виду - большие / маленькие) на протяжении S фазы.

Затем на AT к PCNA. В начале S-фазы небольшие, много (нек. 100к) к концу - крупные немногочисленные.

Фокус репликации: 10-30 вилок в примерно одном месте.

Размер репликонов и скорость репликационной вилки

Сигнал γ измеряется с пом. 32 -dU визуализируя каскадом антител, ме-

генных флуорохромом. Растягивание
 ДНК на стекле.

Результаты:

- среднее раст. м/у т. начала репликации (~ 100 кв) Есть и очень длинные (600-1000 кв)
- короткие (15 кв)
- В эмбриональных клетках репликация не > 4 кв (наро. от. быстро делятся)
- скорость движения вилок (~ 2 кв/мин; бывает намного быстрее, до 12 кв/мин)
- Частота изменяется по ходу репликации. Приём орновременн. справа и слева (в обоих плечах). Иногда (исключения) - одно плечо.
- кластеры репликаков расположены довольно далеко. Иногда 1 кластер на хромосому.

Можно ли соотносить кластеры репликаков и специфич. посеровательности? Долгое время проблема казалась неразрешимой.

"Метод штрих-кода": по этому методу точки начала репликации на раст. ~ 20 кв. Как? Было обнаружено, что если в точке нач. репликации то ~ на 100 кв направо и налево инициация репликации подавляется. А в разных клетках по-разному.

Между кластерами активно работающих ori обычно большие расстояния. Длина репликаков м. составлять 1000 нт и >.

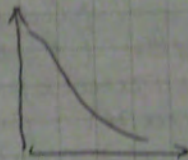
Структура генома эукариотического

Ренатурация (денатурация: $>80^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} > 11$)

Зависит: от сложности и размера ДНК

Опыт: берется лигированый ДНК. Один репетит, другой денат. пробо. Концентрация в порезанной выше! Поэтому репат. быстрее.

два - ренатурации:



ДНК человека ренатурирует не так. Из-за сложности состава (повторенные пост-ти ренатурируют быстрее). Тогда про повт. пост-ти мало знаем. К чему пришли?

1. Наличие перегибов \rightarrow сложение неск. кривых. Возьмем пост-ти:
 - уникальные ($\sim 50\%$)
 - умеренно повторяющиеся ($25-40\%$) 10^3-10^5 копий на n
 - высокоповт. $> 10^5$ копий на n ($10-25\%$)
 Как узнать? Легкий клонир. участок в сред. коллекциях генов. \rightarrow ренатур. с ячейкой. Как отнесается

2. Высокоповторяющиеся:
 - (1) перемещ. повтора;

Структура генов

Ренатурация (денатурация)

Критич. параметра, опр. полноту ренатурации:

- C_0t кривая
- $t_{1/2}$ инкубации

100-200 нт : при изучении кинетики

ренат. пробат со таких размеров.

$t = t_2$, $C_0t \approx 100 \text{ г/мл}$

Чем сложнее ДНК, тем больше времени требуется для ренатурации.

ДНК человека ренат.
Из-за сложности
после-ти ренатурации
всего генома

- 2) процесс неавтогени;
- 3) повтора, соед. из простых посл-тей (минисателлитов и микросателлитов);
- 4) сегментные дупликации;
- 5) сателлит.

Сателлитное ДНК

Плавкая плотность неск. отличается от просто ДНК. Особые последовательности из повторяющихся блоков разного уровня.

У человека - альфа-сателлит в центромерах. Некого отличают у хромосом, поэтому их и отличить гибридизацией по этим сателлитам. Внутри нас еще повтора.

Минисателлиты

- протяженность варьирует от 1 до 20 kb
- размер повторов 10-500 bp
- количество повторов варьирует у разных особей (на этом осн. много прикладных методов - фиджерпринтинг, устан. отцовства...)

Микросателлиты

От простые блоки. Д/генам неуробные. На них часто полиморфизм застривает, процес. экспансия нуклеотидных блоков и наруш. соседних генов (из-за рекомбинации) - тандемные повтора (STR). $L \approx 2-8bp$, протяжс блока $\leq 150bp$. Примеры: $(A)_n$, $(CA)_n$, $(CAG)_n$. Также исп. д/фиджерпринтинга

Семикотное дупликация
 От похопеи; 1-300 kb (чаще 10-50 kb), кот. дуплици-
 рованы на одной или разных хромосомах. 3,5-5% генома г-к

Дисперсированные повторы

~45% ретроинверта + ДНК транспозона.
 Ретровирус: ил. ген Δ ad, ρ l, ρ v.
 LINE, SINE. У LINE есть активные гены:
 OR, полимераза-интеграза.

SINE: наиб. широко представлен Алл.

23.10.09

Репарация ДНК

Причины мутаций

- ошибки репликации: Pol очень точное, но все же делает ошибки
- излучение
- повреждение ДНК эндогенными агентами
 окисление; депуринизация и др. гидролиз
 (напр. дезаминирование - уход NH_2 в аз. бен)
- экзогенными агентами: облучение, по удару
 поврежд. хим. агентами (напр. алкилирование)
 (азотистыми соед, алкилсульфокатами, нитрозоог.)
- репликация "через повреждения с исп.
 полимераз, стимулирующих низкую
 точность копирования

Пример дезаминирования: $\text{C} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O, NH}_2} \text{U}$ и при
 репликации происходит замена $\text{C} \in \text{G}$ на $\text{A} = \text{T}$.
 $\text{G} \rightarrow \text{X}$, который все равно спар. с цитозином,
 нет последствий $\text{A} \rightarrow \text{HX}$, гораздо вреднее,
 спарив. с C и приводит к замке пары.
 X - ксантин, HX - гипоксантин

Алкилирование и прив. к замкам
этир в стар. с Т, а этир. Т с С(?)

Образование Т димеров под действием УФ
двойные "связи" разрываются и отр.
"квадрат" связей.

Коррекция повреждений

- а) Ошибки репликаши:
 - 3'-5' экзонуклеаз (сама ФНК Pol)
 - репарация неспар. оснований (mismatch)
- б) Эндо- и экзогенное повреждение:
 - прямое удаление
 - эксцизия оснований (BER)
 - NER: эк. нуклеотидов: вырезается фрагмент цепи ДНК на его место встраив. новый, не содержит мутации
 - рекомбинация и гомодупликация (не удаляет ошибок, но прод. реплика.)

Прямое удаление ошибок

Удаление циклобутановых димеров ДНК (Т-Т)
фототаза (E. coli; у млекоп. нет) 40^{лет}.
Только на свету! Не УФ. Световая репарация
Фототаза связ. с этир. блоками и
расширяет их. Ф-т связывается в тесноте
с димером, но д/ работы необходим End.

Все живые организмы им. Об-метилтрансферазу, кот. удал. метильную/
этильную группу из позиции Об гуанина.
Фермент связ. с группой необратимо, но
ДНК репарируется. Чтобы ф-т работал,
Об "вводраживается" наружу. Перенос алк.
групп на сульфогидрильные остатки
цистеина.

Другие повреждения удал. с пом. более сложных мех-мов

BER (base excision repair): про и эту

Удал. мидиф. (в т.ч окисл.) оснований и по ошибке большого dU. Как? ЗНР-
-глюкозилаза адресно делают апурификацию. Спец. ферменты узнают этот сайт и разрезают перед и после сахараосер-ост. Кирка по кольцам. Цели зашивается (Pol β или Pol I). AP-эндоглюкозилаза: боцелитот апури/апирии сайты.

Спать все ф-т г. имеют доступ, поэтому происх. сильное стереическое изменение, осн. вворачивается наружу.

В кл. γ огромное количество специфических гликозилаз (напр., удал. U, алкил оснований и др.) Повреждения гораздо больше, поэтому они не м.в. скорректированы. N-гликозилазы раб. с дезамин.

С пом BER удаляются повреждения, кот. не имеют репликацию.

Пр. на E. coli

- γ 4 белка, названия от мутаций (Uvr - UVResistance). Uvr-ABC-эндоглюкозилаза
1. UvrA и UvrB скан. ДНК и нах. повреждения (напр., пиримидиновой димер)
 2. UvrA уходит из комплекса, UvrB локально денатурирует и привл. UvrC
 3. UvrBC вносит 3' и 5' разрывы (5' : 3' и 3' : 5' разрыв)
 4. Гликозилаза UvrD удаляет плохое место
 5. Pol I восстан., лигаза сшивает.

изменяется, осн. ваворам

В кн. 7 огромное количество глицерофосфатов (напр., основания и др.) Повреждены больше, поэтому они ректированы. N-глицерофосфат

Репарация с помощью пириим. димер-N-глицерофосфата:

Глицерофосфатная св. мрн. орн. из T в дезоксирибозе разрезается так, что T-димер остается на 5'-конце разорванной цепи, а 3'-ОН группа на дезоксирибозе. Образовавшийся 3'-AP-конец отщепляется с помощью 3'-5'-экзонуклеазной активности ДНК-Pol, а затем путем ник-трансляции и лигирования управляется нуклеотид вместе с прилепленным T-димером, заполняется отр. пробел и сшиваются концы.

У человека циклобутановые димеры не репар. напрямую. Улучена сложенная система NER. Если нет - болезнь Xeroderma Pigmentosum 8 генов отвечают.

Узнавание повр. у человека - 2 пути:

- Global NER - группа белков
- Transcription-coupled NER: РНК-Pol

a) Global NER

Сенсор - XPC. В комплексе с др. белком узнает повреждение (XPC + hHR23B). Связ. повр. целью. XPB воздв. локальную денатурацию XPA связ. с компл. целью, стаб. комплексе и привлекает белки XPB + XPD (TFIIH - транскриптор, он же). Они локально расширяют денатурацию, тем обдарают хеликазной активностью.

Затем сюда привлекаются экзонуклеазы ERCC1 + XPF (5') разрыва происх по границам денатур. участка XPG (3') низам денатур. участка RPA обр. филамент, связ. с целью, чтобы нуклеазы правильно позиционировать (иначе было бы сложно найти концы).

- РНК-Pol: играет роль XPA - XPC - hHR23B когда "наткается" на повреждение. Далее точно так же; привлекает XPB, XPD...

Управление ошибок репликации (Mismatch repair)

Как найти неспаренные нуклеотиды? Как понять, какой заменить. Потому наряду с мех-мом узнавания

У человека циклобутановые димеры не репар. напрямую. Зупена сложенная система **NER**. Если нет - болезнь Xeroderma Pigmentosum. 8 генов отвечают.

Узнавание повр. у человека - 2 пути:

- а) global NER - группа белков.
 б) transcription-coupled NER: РНК-Рол

а) Global NER

Сенсор - ХРС. В комплексе с др. белком узнает повреждение (ХРС + hHR23B). Связ. повр. целью. ХРВ связ. локальную денатурацию ХРА связ. с катал. целью, стаб. комплексе и привлекает белки ХРВ + ХРД (TFIIH - трансфактор, ок же). Они локально расширяют денатурацию, тем обладают хеликазной активностью.

Затем сразу привлекается экзонуклеаза ERCC1 + ХРФ¹ (5') разрыв происходит по границам денатур. участка ХРГ (3'). РРА обр. фрагмент, связ. с целью, чтобы нуклеаза правильно позиционировать (иначе было бы сложно найти концы).

- б) РНК-Рол: играет роль ХРА - ХРС - hHR23B когда "натягается" на повреждение. Далее точно так же; привлекает ХРВ, ХРД ...

Управление ошибок репликации (Mismatch repair)

Как найти непарные нуклеотиды? Но надо понять, какой из них наружд. с мех-мом. Поэтому наряду с мех-мом замечать указания

надо понять, какая цель "материнская".

У *E. coli* MutS сканирует ДНК. Ошибка нах. по изменению конформации. Привл. MutL и MutH. MutH вносит ss разрыв ДНК, потом работает хеликаза MutD...

Узнается:

- MutS димер (у дрожжей Msh2/Msh3 или Msh2/Msh6 димеры)
- MMR узнает все коэб. неспар. нукл, кроме CC а также короткие (<4 пн) делеции и инсерции
- неспар. G:T и A:C и инсерции/делеции в 1^н особенно хорошо узнаются. Наиболее частые ошибки ДНК-Рвл.

Как удалить неправильное?

У *E. coli* F система ^{Dat} метилирования. MutH связ только с метилированной, новой цепью. Механизм селективной цели. У нек штаммов есть другие вместо Dat-системы.

В эукариотических клетках

обнар. гомологи MutS и MutL, а гомолог MutH не найден. ||

2 гетеродимера $\left\{ \begin{array}{l} \text{MSH2-MSH6 (Mut S}_\alpha) \text{ - неспар. "индекс"} \\ \text{MSH2-MSH3 (Mut S}_\beta) \text{ - др. "индекс"} \end{array} \right.$

Возможно, $\delta 1$ узнавание исп. β -мети-рование. Но не у всех.

Сейчас есть предположение, что узнается цель с разрывами (за ссб фрагментов Оказаки). Точного механизма не известно.

От много заболеваний, связ. с этими системами.

Если все ДНК реплицируется с повреждением?

В кл. E. coli есть SOS-репарация. Остановка. Нупоко сообщают: RecA связ. с ss-Dнк и обр. на её длину филамент. Где даются ss-участки? При остановке репликативной вилки, а оно чаще всего при повреждении.

Регулятор экспрессии ряда генов в репарации генов (31) - LexA. Димера связ. с SOS-филаментами (?) Ингибитор Транскрибируется на нек. уровне всегда транскрипцией.

RecA-филаменты этим. Аутопротезиз LexA, ингибитор \downarrow с и нарушается синтез РНК с этих генов (в состав кот. вх. низкоакриное LexA-боксы > (LexA, recA, umcA, umcB и umcD).

При дальнейшей \downarrow SlexA актив. гено, обесп. осуществление репарации с ошибками (мутазы). (Ути DС-оперон)

Ути D и Ути С: считалось, что связ. с ДНК-Pol и помогают пройти ошибки. На самом деле Ути D' активирует через полимеразу Ути С (Ути D подверт. аутопротезизу с обр. активного фрагмента Ути D')

ДНК-Pol V = (Ути D')₂ Ути С. репликация через AP-сайты, T-T, и др, вставляя слуг. нуклеотиды. "Черездоловкий" синтез катализируемой "мутасьмой" (DNA Pol V)

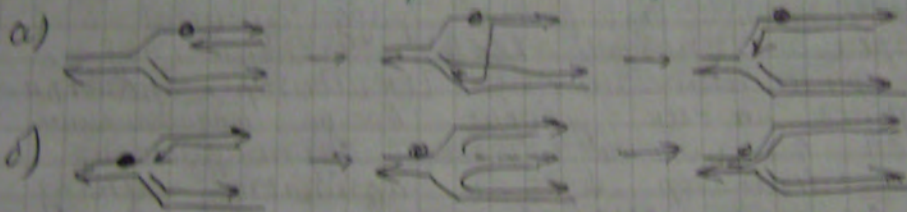
DNA Pol V формируется в филаменте RecA, в-записи (много "сва штея") непосредственно в месте повреждения ДНК связ. с SSB.

ДНК Pol V (внесением RecA-филаментов не происходит в β -зацепке)
 mismatch model - модель (контрраспознавателя)

Кора Pol доходит до ds ДНК
 а флюид и возвращается ДНК Pol III.

У эукариот есть свои Pol пррезисковые,
 узнающие "свои" ошибки.

Обход препятствия посредством
 сдвига нитчатых цепей



Репарация двуцепевых разрывов

Возникают

- под действием излучения
- нек хим агента (карр., ингибитора ДНК топоизомеразы II, используемые в противораковой терапии (?))

2 пути основных:

- гомологичная рекомбинация
- негомологичная сопр. цепей

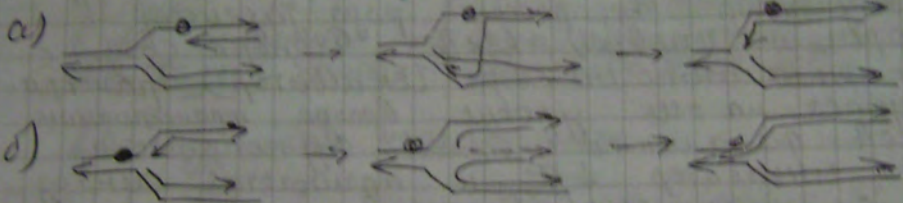
1. Сигнал: при повреждении ДВС Pol систем КЗНХ. Сигн из сигналов репарации Pol IIIе осущ. АТМ-киназы - глобальными регуляторами многих процессов и сигн. цепей, ведущих к:
 АТМ - ataxia telangiectasia mutated.

ДНК-Pol V. Включает KcsA-филамент
(скажем не входит в β -зачеши)
Cowcatcher model - модель скотосборщика

Когда Pol доходит до ds ДНК
она глотит и возвращается ДНК Pol III.

У эукариот есть спец. Pol: α (пределающее),
узнающие "свои" ошибки.

Обход препятствия посредством
слияния матричных цепей



Репарация двуцепочечных разрывов

Возникают:

- под действием излучения
- нек хим агента (напр., ингибитора ДНК топоизомеразы II, используемые в противораковой терапии (?))

2 пути основных:

- гомологичная рекомбинация
- нехомологичная состр. цепей

1. Сигнал: при появл DSB Pol имеет KLNХ. Один из сигналов репарации Pol IIIе осущ. ATM-киназой - глобальной регуляторки многих процессов и сит. цепей веруцих к ATM - ataxia telangiectasia mutated

DATE

через локотное
поширзао

сннтез
с
ошибок

безоши-
божное

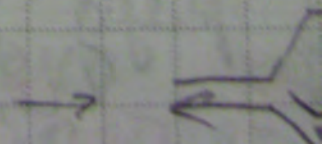
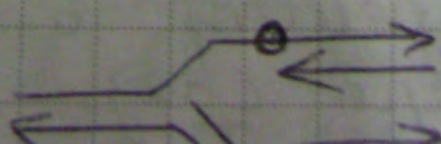
взте
ойдет
tel -

доход
возв

ест
евои

Обход препятст
Смена матри

a)



- checkpoint G1 или апоптоз;
- остан S-фазы;
- checkpoint G2

Начало пути - аутофагия и ее связывание с ДНК.

Привлечение белков:

- связывающих свѣт. концы;
- участников репарации.

2. Репарация через гомологичную рекомбинацию: Неполная гомологичная цепь. Но сестринская хроматида далеко (не так как в S-фазе).

Поэтому удал. экзонуклеазы часть одной цепи. 3'-длинные концы.

Инвазия 3'-конца первой цепи в участок, где есть сестринская. И далее как при мейозе.

RcsA у *E. coli*: если ss-ДНК свѣз. с RcsA, легко происходит замещение ею (показано *in vitro*) гомологичной цепи в ds-ДНК. В гибриде RcsA нет.

У эукариот гомолог RcsA - Rad51.

30. 10. 09

Мезоморфичное соединение ронцов ДНК

Белок К₁ из 2х субъединиц — К₁80 и К₁70.
 Кольцо, кон. саркофага на конце ДНК в
 месте разрыва (преотмраивает расплетание)
 Помощи протиссегрив гетавление нуклеотид.

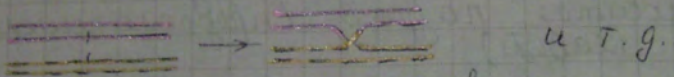
Возможна асимметрия, работой сдвиговой концы
 удвоят присоединяется к нуклеотиду →

Если "адаптом" на ДНК саркофага, то
 К₁ обхватывает 2 витка спиральной ДНК
 Между витками сдвигания с К₁ есть
 мосты, где сдвигаются и спускается белки.

Рекомбинация

Один из базовых процессов, проводящий к перетасовке генов и ↑ многообразия. Механизм рекомбинации основан на исп. ферментов, участвующих в репарации.

Многие были замечены еще от давно. 1^я модель — модель Холлидея: вносится разрыв в ~ орных участках ДНК (1964)



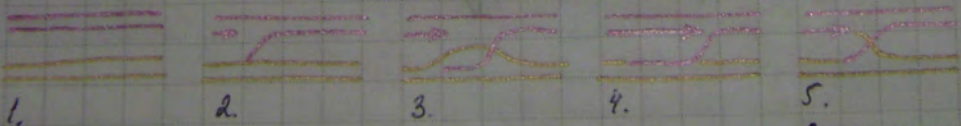
Далее разрыв и провести 2^{ий} способом



Д.Б. предложен механизм, по кот. происходит разрыв в орной точке. (такой фермент не нашли!)

Механизм гомологичной рекомбинации. Новая модель: вносится 1 разрыв. Орной цепочкой участок "внедряется" в гомологичную хромосому и находит там мутовый участок.

Модель Мезельсона - Рэддинга (1975, 1982)



Структура Холлидея

Реконбинация в клетках E. coli

Рес ВСД путь

Рес ВСД - комплекс расплетает ДНК и вносит однонитевой разрыв рядом с 3'-концом χ сайта (5'- CTGTGTGG -3'). Такие сайты встречаются в среднем 1 раз на 5000 пн.

Фрагмент ssДНК покрывается РесА и внедряется в гомологичной дуплете. В Д-петлю вносится разрыв (предположительно, комплексом РесВСД).

В результате происходит реципрокный обмен коллиментарными цепями. После мигрирования концов возникает типичная структура Холлидея. РнвА и РнвВ обеспечивают миграцию цепей. РесС вносит разрыв в структуру Холлидея.

РнвА узкает структуру χ и связывается с ней в виде тетрамера. К РнвА присоединяется димер РнвВ.

РесС - 2-субъединичный белок

Возможно 2 варианта: разрыв и.

- не привести к кроссинговеру ("холодная конверсия")
- привести к кроссинговеру.

Кросснотвер и грозеней

7 ступ. Нуклеара, продукт зена Sp011 с
Разрезаем ДНК и склдываем слаганной с
5'-концом.

Sp011 делаем второй разрез, продукт с
олионуклеотидными графами ~ 20 нт, это
проедадут при графами 2х Sp011, на
внесших коллелектарные разрезаем, на
2х цепях. Помощи преша гомпробуируемся.

МРХ - экзонуклеара ууфдываем ss преша у
5'-конца ДНК.

Дне 1 - шейотмшакский акалор Rad 51.

Генная конверсия

происх. в ходе гомологичной рекомбинации
цели часто отщипываются на небольшие
цепи, отдельные нуклеотиды.

Происходит репарация после рекомби-
ции по какой-то цели исправить.

Регуляция типа спаривания у дрозофилы

Дрозофилы, кот. и ух. в спаривании, б.
иметь разное особые генные локусы (MAT
/ α) Эти локусы кодируют рецепторы
ответственные за синтез лигандов к
другого типа спаривания.

1 слок г. имеет один тип спаривания,
но тогда избежать связанных с этим
проблем, дрозофилы м. менять тип
спаривания.

Если дрозофилы все одного типа, то
активация ДНК из этого локуса выбра-
совывается и замыкается путём гомоло-
гической рекомбинации на другую (на
послать из неактивного гена) *

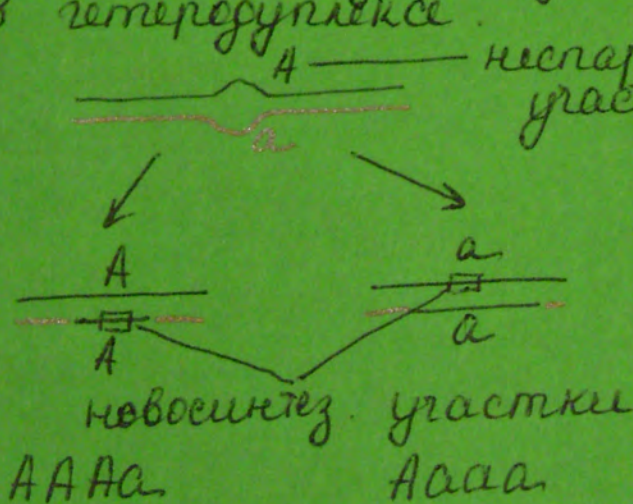
Дрозофилы м. Э в гаплоидной и ди-
плоидной формах, возник. при смене
гаплоидных с разными типами спаривания.



* Локус MAT (2 аллели: MATa и MAT α) Активный.
И полностью репрессированные гены α и A.
Э нуклеаза HO, кот. справа от локуса вносит
разрыв из. Работает. цепей Экзонуклеазой Rad51
Синтез 2^x новых цепей с инс. информацией
из "доминантного" локуса.

Генная конверсия

Г.к., как правило, является средством репарации неспаренных нуклеотидов (ННК) в гетеродуплексе.



но тогда избежать проблемы, дробности и спаривания.

Если дробности все орки активная ДНК из этого

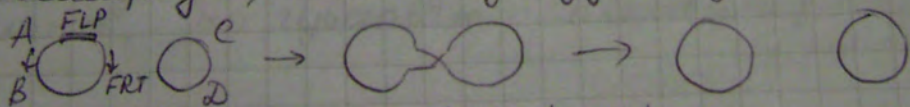
Эта же сайт-специфическая рекомбинация. Довольно редко исп. в природе, но крайне важные процессы. Кроме того, широко исп. в генной инженерии (напр., замена одной генной cassette на другую).

Сестринский хроматидный обмен

осуществляется точно так же, как и при кроссинговере. Обнаружено мететом включения радиоактивных нуклеотидов (+ $^3\text{H-T}$ / + BrdU)

2-микронной плазмиды дрожжей
 Рипаза и разрезать посерединности (почти палиндром) со сайтом внутри.

Биологическая роль: кольцо и отр. "восьмерку", если породят две FRT.



FRT - flipase recognition target
 Если это происходит, в плазмиде стан. вышки 2^x направлений, и реплицироваться ∞ долго.

FRT - 34 bp с 13-bp повторами инвертированными.

Интеграция и выщепление происходит, когда участки узнавания ориентированы в 1 сторону. Инверсия происх., когда участки узнавания ориентированы в противоположные стороны (происходит встраивание "наоборот").

Эталоны саім - энцэпедычныя **рэспублікаў**
 В асве рабонам **вэж.** брэсцкай **правінц**
 калініке і **равербанкай** **цельна**
 Рэспублікаўн → **тупоўнічэбэ** (шкэла)
 (кэпэ, кэпэрава фэах)
 → **сэрпнічэбэ** (кэсэчэ)

Боле **пачэснэ** **шэкакнэжэ** **дэс** **рэфрэнэ**
фэрлэктэр **д.** **рабонамэ** **посэпэрэ** **пэстэу**
Э **э** **фэрлэ** **д.** **аэмнэбнаэ** **и** **нэаэмнэбнаэ**
Рррррр. **радрррр** **дэ** **рэфрэнэ** **цэпэ** **зэтэпэ**
аэмнэбнаэ **дэ** **рапра** **рэфрэнэбнаэ**

Саім - энцэпедычэскаэ **рэспублікаўн?** **шр**
шр **аэчэбнаэ** **роль** **в** **"сэрбэбнаэ"** **шр**
шэкоб

В **рэф-мэ** **рэфрэнэбнаэ** **дрэп** **шэ**
бэршэаэмнэбнаэ **сэтэчэнтэ?**

Методы исследования ДНК

Принципиальная схема работы ДНК-матрицы: из организма выделается и метится (флуоро- или радиоизотопом) и пропускается через ДНК-матрицу с разрывом ss ДНК в последовательности.

Deep-sequencing.

Секвенирование 454
Геном сегментируется дизайном. Так можно секвенировать за 1 раз геном бактерии. Амплификация (гибридизация) быстро и точно (99,5%) геном бактерии.

Принцип пиросеквенирование: при присоединении нуклеотида отщепляется пирофосфат. Обр. световой сигнал; проблема: блоки одинаковых нуклеотидов (сигнал слабее, но чувствит. плохвата)

Секвенирование методом синтеза на матрице: (Illumina)
Главный вопрос при N секвенировании — создать несколько корректирующих молекул, чтобы получить детектирующий сигнал.
~ 1 миллион оснований за цикл секвенса (равно исп. с 3 мил. оск. за цикл).

DATE 13.11.09

Мобильные генетические элементы (транспозоны)

- фрагменты ДНК ($10^3 - 10^4$ нт)
- способны перемещаться в геноме
- представлена в геноме разными типами копий (до 10^6)

Если нах. в нескольких копиях и слупить местами гомологичной рекомбинации. Внедрение транспозона в геном эктопическую рекомбинацию. От мощной источник крупных перестроек в геноме.

Вставки: наиболее простые транспозоны **IS-элементы**. Длина ~ 1000 нп. Кодирует рамку считавания для транспозазы, обеспечивающей перемещение моб. элемента. Ограничивают его образцовые повторы - палиндромы. * $750 - 3200$ нп.

Окружает прямой повтор Д/капсаго элемента с/воз транспозазы.

Обр. комплексе: Транспозаза + с. белки, вырезает транспозон и "пересаживает" в другой участок. $\frac{1}{25}$ транспозосома

F-фактор: при конъюгации, плазмиды, содержащая IS-элемент. М. встроиться в хромосому.

Oit: механизм переноса. Обр. окончательной разрыв, ДНК расплетается и сс ДНК перерабатывается реципиенту. * Потом сс достраивается. * У комплекса белков, кодируемых F-ф.

Транспозоны сит. горизонтальным способом передачи ген. инфор.

Между днкерной ДНК и ее копиями обр. четверодуплексе.

случиться местами
ции. Внедрение
эктопическую рекол
источник крупных

Вставки: наши

IS-элементы

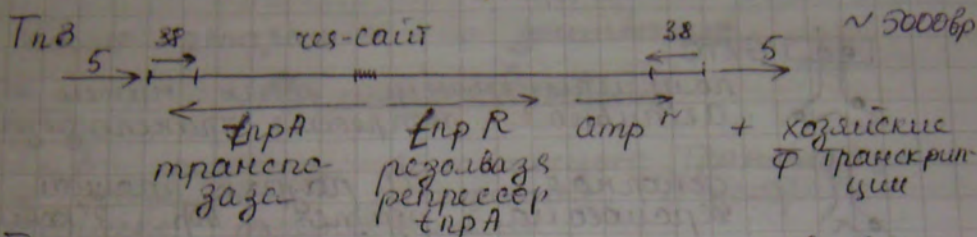
Изучают мех. агрессию
мутаций у бактерий,
скарипиди МЭ:

- вставки в гкм,
- вст. частотой $10^{-5} - 10^{-7}$ на поко-
ление (\approx частота
возникновения
спонтанных му-
таций).

F-фактор

илистая IS-элементы

Транспозоно бактерий Tn Репликативная транспозиция



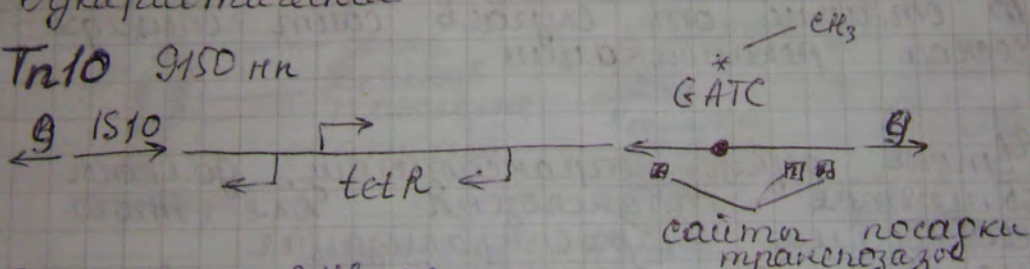
Транспозон делает копию, одна остается, другая - в новое место.
tpr R:

- определяет механизмы перемещения;
- рег. эффективность транспозиции (репрессор tprA; в какой-то мере + эф-ть транспозиции).

Нерепликативная транспозиция (впрыскивание - встраивание)

Эукариотические

Tn10 9150 нп



Ограничен для IS-элементами, напр. др. к др. у.
tetR: устойчивость к тетрациклину
Белок мембрана, откачивающий этот антибиотик.

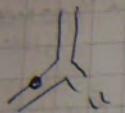
Транспозаза связ. с определенными сайтами (находится в правой IS; левый - не @)

В процессе репликации образуют метилированные последовательности. (в одном из повторов)

Полюс метилирования: образование
транспозазы умеренное. В полуметилр.
состоянии на оборот.



*GATC
полуметилирование обеих нитей =>
активная экспрессия транспозаз



донорная хромосома
de разрыв процесси-
руется, обр. 3'-конца,
соединяется особыми
деками и забрасы-
вается в гомологичные
хромосомы.

Механизмы транспозиции

Через ковалентной
(вырезание-встраивание)

В отличие от случаев сайт-специфич-
еской рекомбинации,

Чтобы осущ. транспозиция, должно
сблизиться транспозон. Для этого
необходима суперспирализация.
Сначала обр. ортонитевое разрыва и
3'-ОН конца, атакующие субстрат.
связь в соседней нити. Такой же
механизм у дукриот. Обр. шпильки замк-
нутой: →

Транспозон довольно безразлично к
месту встраивания, но бывают
предпочтения. Консенсус 8/Tp10:
5' GCTNAGC 3'
• камигроми



В месте ветвления
транспозонов отр.
повторя (по косой разрывам)

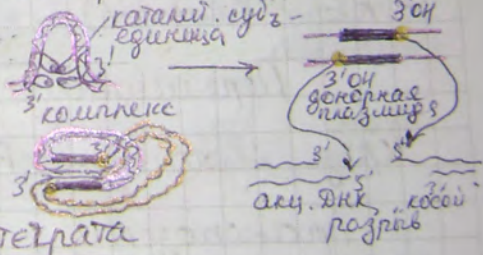
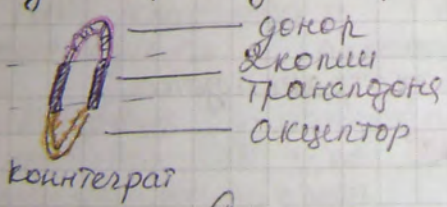
Далее репарация и зашивание.

Репликативной

ТпЗ: перемещ. с помощью Транспозазы из нескольких субъединиц. Д. собратся в комплексе транспозазы.

Транспозаза связ. с ДНК одним концом. Затем тем каталитическим концом, но не на том участке, с кот. связалась, а на другом.

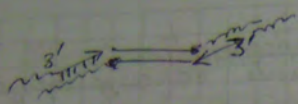
Дальше узнается мишень, произв. косой разрыв. Одна плазмиды дочерная, другая акцепторная. Чтобы транспозазы произвела, надо провести репликацию



Судьба контрграта



скаж рекомбинация с базой;
сайт состоит из персайтов : $\begin{matrix} \text{I} & \text{II} & \text{III} \\ \text{---} & \text{---} & \text{---} \\ 28 & 34 & 25 \end{matrix}$
~ 920bp
проник. только в одном бр. синаптосома в кот. молекулы резолваза. того, что эту угадали



В месте встраивания
транспозонов обр.
повторя (по косам разрывам)

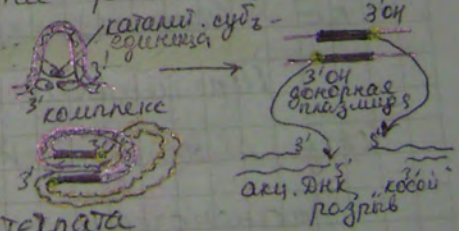
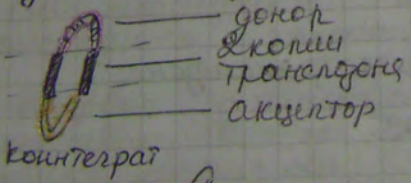
Далее репарация и зашивание.

Репликацией

ТпЗ: перемещ. с помощью Транспозазы
из нескольких субъединиц. Д. собрался
комплексе транспозазы.

Транспозаза связ. с ДНК одним концом.
Затем гибк катализирует другим, но
не на том участке, с кот. связалась,
а на другом.

Дальше узнаете мимень, произв.
косой разрыв. Одна плазмиды дочерная,
другая акцепторная. Чтоб транспозазы
произшла, надо провести репликацию



Судьба кооперата



екая рекомбинация с
вазы;
сез-сайт состоит из
посайтов : $\frac{28}{-}$ $\frac{34}{+}$ $\frac{25}{-}$
~ 120bp
промах. только в орном
бр. синапсом в кот.
молекула резолваза.
того, что эту участками

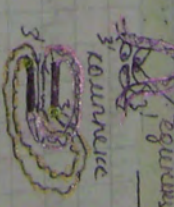
Тр 3: репликация с помощью ДНК полимеразы и лигазы. Вспомогательные белки: праймеры, РНК-лигаза, ДНК-лигаза.

После репликации образуются две дочерние молекулы ДНК. Каждая молекула состоит из одной материнской цепи и одной дочерней цепи. ДНК-лигаза соединяет фрагменты дочерней цепи.

Данные участки называются фрагментами ДНК, которые образуются при репликации. Они соединяются с помощью РНК-лигазы.



генетический материал
оригин репликации
репликационная вилка



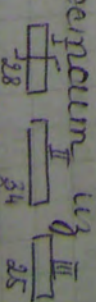
3' OH, 5' OH, 3' OH, 5' OH, 3' OH, 5' OH, 3' OH, 5' OH

Синтез комплементарных цепей

Синтез - процесс образования комплементарных цепей. Синтез происходит в направлении 5' к 3'.



При репликации образуются две дочерние молекулы ДНК. Каждая молекула состоит из одной материнской цепи и одной дочерней цепи. ДНК-лигаза соединяет фрагменты дочерней цепи.



6 строк и 6 строк

репликация



Синтез - процесс образования комплементарных цепей. Синтез происходит в направлении 5' к 3'.

DATE _____
 I обр " I происходит перестройка.
 катакан, разрешаемый топсизамеразой
 IS транспозон Helicobacter pylori

Продукт транспозиции-
 ss кольцо. Концы соединяет несовершенные
 палиндромные последовательности. Транспо-
 заза, образует ss разрыв. При конъюгации и
 репликации.
 Транспозон - joint

Перемещение с обр ковалентной (S'-Y)
 связи, как тирозиновые сайт-специфичные
 рекомбиназы.

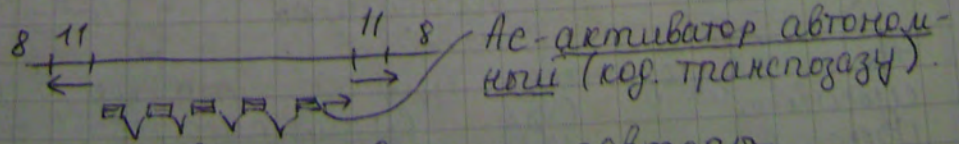
Транспозоны эукариот

- ДНК (класс 2)
- RE (класс 1)

Перемещение ретротранспозона

Через посредство РНК.

Транспозоны эукариот похожи на
 прокариот. Повторы + рамки считывания.
 Полноценной или ген транспозазы,
 сфермации интрона. Автономной.
 Навтономное: дефектное (Ds)



Имеют инвертированные повторы
 * Дисцентрики - хромосомы с 2 центромерами *
 30% МДНК человека - RE.

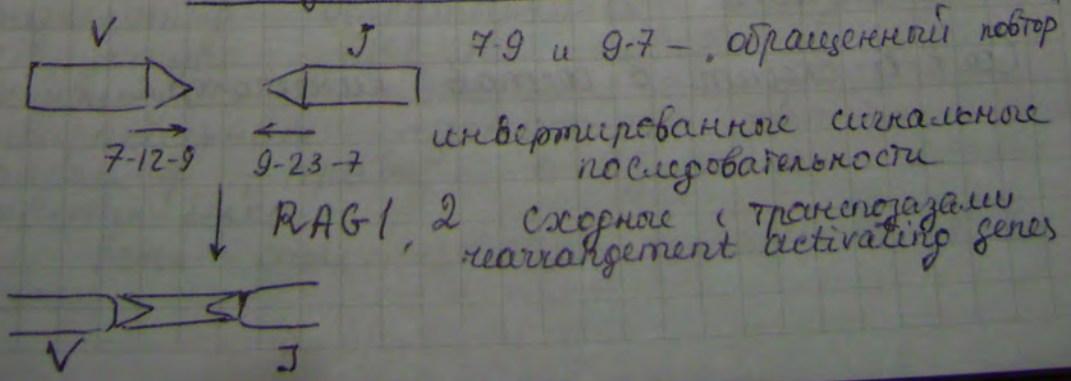
Неавтономный диссоциатор (Ds):
" " " активируется автономным RE
" " " только инвертиров. повтор

1/10 - 1/100 в пользу дефектных копий ("типают" транспозазу)
Наличие неавт. элементов сказывается на количестве транспозазы. После вырезания Ds - аз разрыв, и вылететь, и слиться с др. (обр. диспетриков)
Цвети: часто транспозонной попов. рядом с геном синтеза антоцианов.
При его вырезании все равно остаются следы, изменяется транскрипция.
В зависимости от того, какой комплекс белков - TP регулирует синтез, разв. окраска. ДНК-транспозона

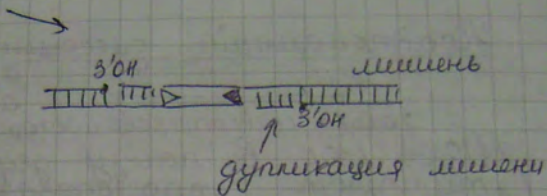
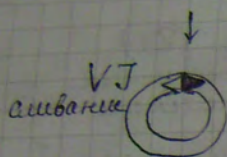
Нштаг1 - семейство гетероциклических транспозонов; активны были еще в древней позвоночных, но происх. нарушения: по остаткам транспозонов и происходит аномальная рекомбинация

Впервые транспозоны среди позв. обнаружены у лососевок. У ч-ка 2,5% генома (найдено биохимически).

Транспозоны в эволюции млекопной системы



DATE:



Когда нет контроля, и происходят серьезные мутации. Опасный процесс

Защита от мобильных элементов и "домашкивание" Транспозонов

- эпитопическая защита: метилирование (цитозин в 5) (распр. на оба класса транспозонов)
- С₆В (С₄З - в цитозине)
- реактивация транспозонов при деметилировании.
- "домашкивание" транспозонов:
 - метилированные "кластеры" транспозонов в центромерных и прицентромерных участках (расхождение хромосом)
 - центромерный белок Сеп Р-В (ДНК-связывающий домен транспозазы)
 - "войны" м/у транспозонами и геномом.

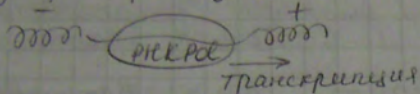
Сеп Р-В входит в состав кинетохора.

DATE 20.11.09

РНК-полимераза

Бактерии: трансляция сопряжена с транскрипцией.

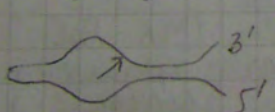
Суперспирализация ДНК:



Сама транскрипция в значительной степени спос...

Как и регулироваться синтез РНК у бактерий.

лучше переопределить удобные условия синтеза РНК (с ~ 200 нт) когда условия неподходящие, синтезируется РНК.



РНК "имитирует" ДНК в синтезе РНК, связывает полимеразу.

РНК-зависимый синтез РНК (как др. "воспоминание" о том процессе).
Загатки системы некодирующих РНК у прокариот.

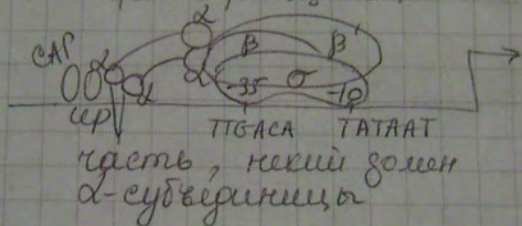
РНК-Pol обладает иногда эндонуклеазной активностью. Она чувствует неправильной нуклеотид, откатывается назад и в структуре РНК-Pol наворачивает эндонуклеазная активность, она выцепляет неправильной нуклеотид. Это достигается рядом Ф, прибор. к изменению активности белка.

Есть спец. центр, узнающий 3'-ОН концы.

РНК-Рол

σ -субъединица узнает сайты:
 TTGACA } консервусное, обозначенные.
 TATAAT } Чем ближе к консервусу
 промотор, тем он сильнее
 (напр., сильный у рибосомальных
 генов и слабый у транслозаза)

α -субъединица: ир-сайт А6-7 Встречается
 рядом с сильными промоторами,
 ↑ транскрипцию.



Расширена структура РНК-Рол.
 Обязательно 2 исследования исп. ферментов
 термостойких (первичность меньше)

β и β' переплетаются и обр. АЦ

Катаболические опероны

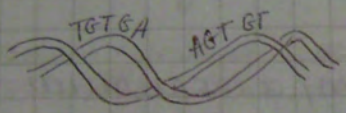
- обесп. исп. лактозы, галактозы и др.
 при недостатке глюкозы
- накопление цикла 3'-5' AMP, активирующе-
 го белок CAP (catabolite activating
 protein). CAP умеет узнавать
 определенное последовательности ДНК.

Принцип узнавания белками особых послепоследовательностей ДНК

узнает опред. посл-ть димер белка.
Каждый домен имеет долины:

- узнающую часть палиндрома по
большой бороздке;
- связ. САР.

САР: TGTGA TCACA
 АСАСТ АСТГТ
 10кп

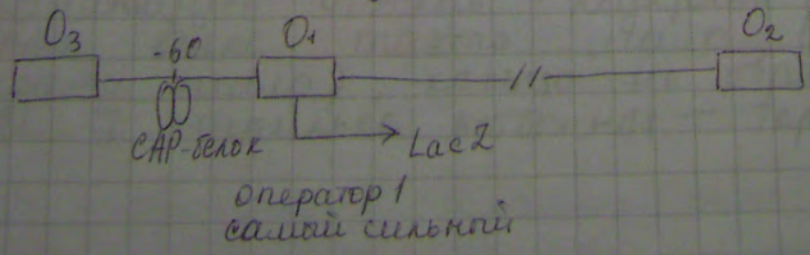


Кинк: $\frac{CA \text{ } \overset{90^\circ}{\curvearrowright} \text{ TC}}{TGT / АСАСТ \quad AСТГТ / АСА}$ участвует в узнавании

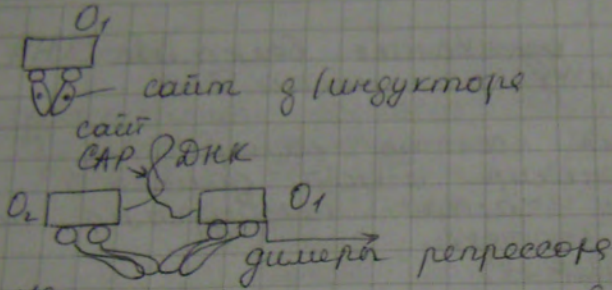
Узнается не только опр. посл-ть, но и сахарофосфатный скелет (не специфичность, но сила взаимодействия)
 Если замечивать - не реализуется

НТН - структура : многие репрессоры ил..

Лактозный оперон



DATE



Наиболее сильное подавление латентного оператора.

Если есть CAP, CAP садится на ДНК и ↑ транскрипцию.

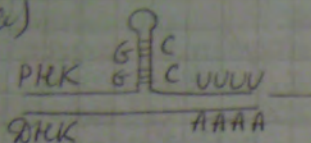
Регуляция транскрипции фага λ

10

Оператор / промотор

В интегрированном состоянии генетическая информация зарепрессирована.

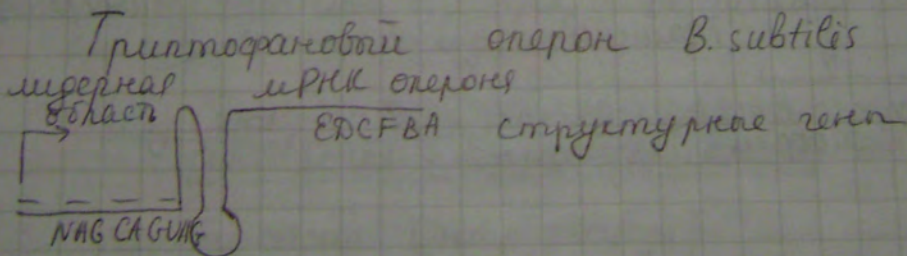
Терминация транскрипции

а) 
 β-субвертикала узнает шпильку
 РНК G C U U U U — нестабильной легкоплавкий участок
 ДНК АААА

Так образована РНК, что на конце С-Г богатый участок.

б) Rho-φ АТР-зависимая Rho-хеликаза, гексамер (гемо). Новобразованная РНК и слезоваться в шпильки.

Если пошел синтез белка, то терминация не нужна. Но! Если есть к-л мутация в начале, рибосома отваливается, хеликаза садится и прекращает синтез.

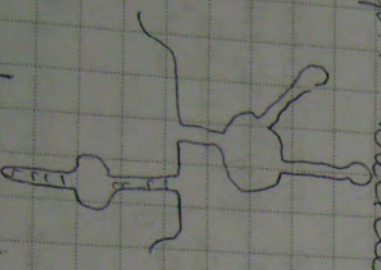


Взаимно исключаются шпильки: триптофановое образование в белке обр. структуру из 11 мономеров, узнают часть лидерной области. Если белка такого мало (триптофана мало), кольцо не образуется. И 7 шпильке небольшая — Терминатор!

Рибонуклеотидамели riboswitches

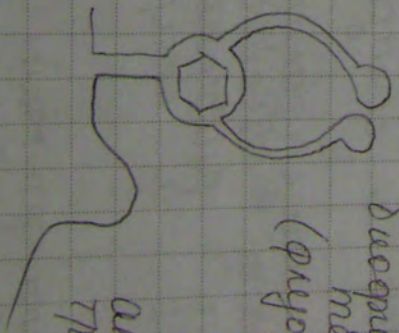
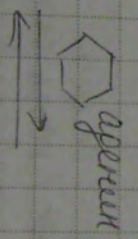
Вместо того как сенсор, не кодирует
присущие им температуры как
и РНК термостатом как "рибонуклеотид"
для метаболизма / координации
когда в них специфических
составляющих в результате образования
активных в морфологии структуры

Пр. *Bacillus subtilis*



Термостат

акрилат и
thiouracil



Дисрегуляция
(фигурформа)

акрилат
Thiouracil

Транскрипция у эукариот

Транскриптом — набор транскриптов (РНК) исследуемого генома.

РНК Pol I рРНК (18S и 28S) 80% РНК

II мРНК и разные некодирующие РНК, как короткая, так и длинные (18S, 28S рибосомные)

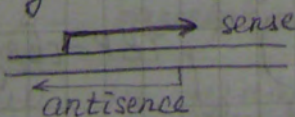
III тРНК, 5S, 7S (связ. с секретией белков), 7SK, U6

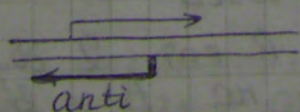
Ог. быстро идет иссл. некодирующих РНК (как закор. мРНК, так и антисенс-ловые, уг. роль в регуляциях).

Количество некодирующих превосходит число известных мРНК ог. сильно. Особ. у сложных организмов.

Регуляторный потенциал antisense-транскриптов

Пр. арабидопсис (на слайде)

pol I:  рибосомная РНК

 уменьшение синтеза sense при ↑ транскрипции antisense.

Пр. дрозофила

pol II фосфатаза 4: antisense — ингибитор sense
фосфатаза 5: antisense — + регулятор sense

Эукариотический промотор

Только при плавлении участка промотора начинается нормальной синтез транскрипта.

Обычно Φ транскрипции: есть d / них особое место, они составляют комплекс, называемый транскр.

TATA-бокс: посл-ть из 8 нк, лежоловка.

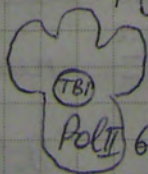
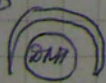
Motiv ten element (MTE (10)); за ним DPE (10) - downstream promotor element.

Это посл-ть небольшого шела спазн-измов (прим. млекопитающих) Если его нет, Φ волокняют группе участка (в т.ч. downstream промотора).

TFII B : взаим. на участке -35 до TATA, и ур. после него. Очень важной.

TBP: tata-binding protein (TAF1 2... - TATA-associated factors) TBP = TFII D).

TBP обр. очень крупный комплекс:



TBP-связ. белки

Pol II : 12 субъединиц, в кот. 2 большие субъед. похожи на β и β' .

TBP взаимодей. с малой бороздкой (!). Это связ. с тем, что плоские фенилаланиновые остатки проникают м/у нукл.

парали — стеклинг — взаимодействие.

Промоторы

а) TATA

часто тканеспецифичные, довольно сильные и у кот. синтез кап. почти рядом downstream.

б) CpG — сер. промоторы млекопитающих (чаще у члв. домашнего хозяйства, менее специфичны по тканям):

- нет TATA
- нет 5mC в CpG островках
- ряд стартов транскрипции (дисперсные) на протяжении 50-100 н

CpG: метилирование — опасный процесс. Клетка осторожна. Есть спец. островки. Как регулируются CpG-промоторы, известно мало.

Экзосомы
преинициация

Узнавание промотора зависит от количества и "качества" нуклеосом.

Rol сама не узнает промотор, ей помогает TBP (TFIID)

Важными элементами явл. экзосомы и сайленсеры, как, даже за десятки кб. Необходима петля. Чтобы ее сформировать — архитектурные белки.

Коактиватор

Важным фактором в формировании инициации комплекса является структура — медиатор (20 белков). Эффекторные молекулы: взаимодействуют с коактиватором и меняют его структуру, это потом влияет на TFIIID или другие белки.

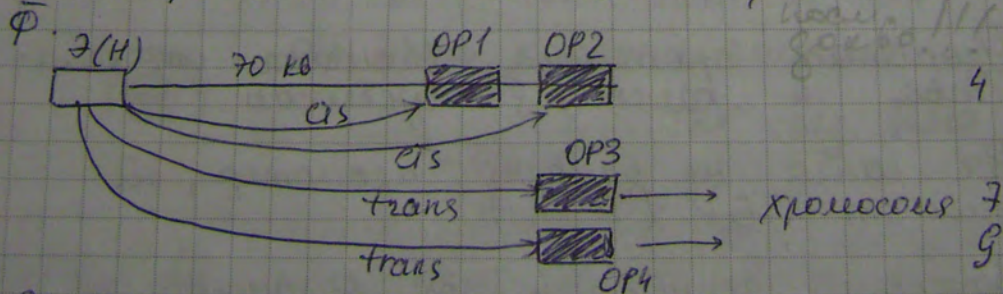
TFIIID + медиатор (> 1 MDa)

обмен субъединиц: очень медленный процесс, отвечающий на внутр. и внешние от рецептор. сигнала. Динамический

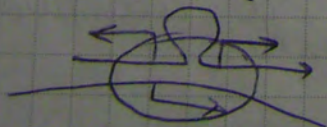
CIS + TRANS - взаимодействия (морум ДНК) (белки и кодирующие РНК)

Экспрессия обменных рецепторов (ОР) в нервных клетках

Показывает сложную сеть взаимодействий. Экспрессия и.б. не только CIS, но и TRANS.



Сложные физические взаимодействия:

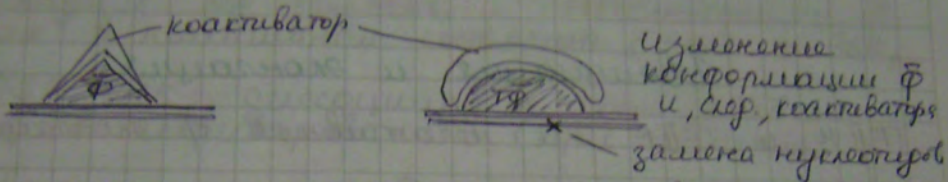


Транскрипционная фабрика

Аллостерические эффекты при активации транскрипции

Коактиваторы $\bar{\Phi}$ транскрипции

Узнаются особым путем ДНК (пр.: NFIB)



Узнается уже другим коактиватором.

Слопная регуляция осуществляется посттранскрипционной модификацией $\bar{\Phi}$ транскрипции:

- фосфорилирование ;
- каскады ; переходы эро-цитоплазма (напр., РНКс приводит к направлению белка в эдро) ;
- ацетилирование ;
- * М. даже энхансер становится сайленсером при взаимодействии с измененной $\bar{\Phi}$ *
- метилирование ;
- гликозилирование ;
- убиквитинилирование : обычно монок- (иногда пойдет разрушение) активирование. Пр.: если этот $\bar{\Phi}$ еще убиквитинилировать — в протеасоме и делать временные модификации ;

- суммирование (SUMO - small ubiquitin-like modifier) ковалентное присоединение; часто опер. то, что модифицированной белок уходит в цитоплазму, где стал неактивным.

Инициация и элонгация

TFIIK и TFIIIF и негативная $\bar{\Phi}$ элонгации

осуществл. плавление ДНК и участвует также CDK7 и CYSK (cyclin H), p52, хеликазы (2 белка: вхомящие в комплексе задегиивания повреждении ДНК - XPB 5'3' и XPD3'5').

Чем хорошо? Если хеликазы натыхаются на повреждение - Pol и весь комплекс перестраивается.

Ее Самая долгая субъединица полимераза на С-конце имеет STD должен представл. п. числом 7-АК повторов: γ S P T S P S

$\frac{1}{2} \frac{1}{5} \frac{1}{7}$

По серинам происходит Р-ние. Только Рная Pol продуктивно синтезирует РНК.

$\bar{\Phi}$ негативной регуляции: их надо удалить, иначе Pol делает дублирную пару

S5-P (STD, Рная по 5 Ser): с этим. доменом связывается масса белков. Этот хвост - некая "платформа" белков, делающих процессинг получаемой РНК.

pTEF - positive transcription elongation factor;
осущ. дальнейшее РНК хвоста (по 250)
СВК.

Продуктивная элонгация: pTEF с/ней
необходим. Он борется с негативными ф.
Нах. в неактивной состоянии (РНК с 7SK)

7SK-РНК: диссоциирует от pTEF и
происх. активирование (при РНК)

Транскрипция и сплайсинг сопряжены.
Идут котрансляционно.

Как и происходит узнавание
ДНК белками?

Sp1 - specific protein. Мутации у мышей
летальны. Семейство белков.
В основе узнавания ДНК - спик или
несколько Zn-пальцев (даже 4 пальцев!)

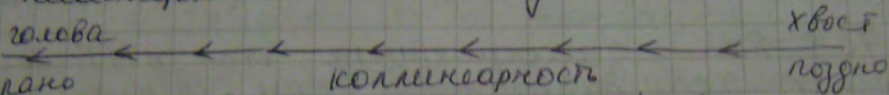


Гомодомин

Гомодомин : на месте одного органа
возникает другой (как у животных,
так и у растений (двывает)).
Явление обусловлено тем, что мутацией
затрагиваются белки трансф.

Гомеостаз (60 АК) - гомеостаз (НОХ-генов) - их гено-линии - группа Ф транскрипции, сигнальные белки (секретизируемые и дифференцируемые в тканях) Многие эти белки отвечают за план тела.

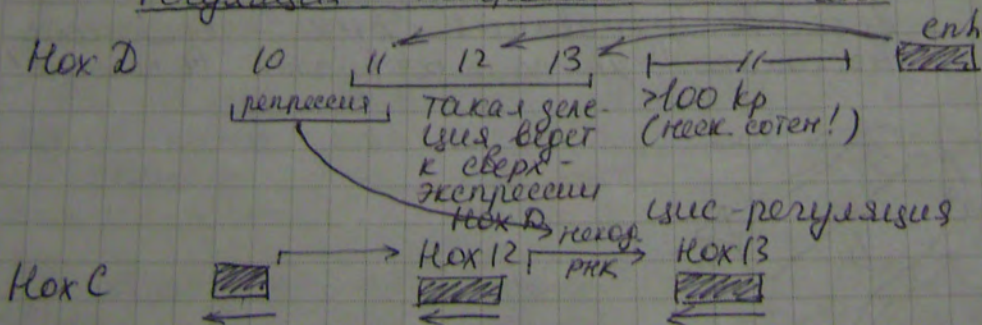
Кластеры НОХ-генов у мюши:



Еще неизвестно их Фние! Все объяснение, приводимое в литературе, неправильно. Здесь играют роль не транскрибируемые АК.

В зашмор. с малым количеством: 2-3 АК остатки. С большой зашмор не один давлен (гастро), а несколько НОХ.

Регуляция экспрессии НОХ-генов



Явно Физие некорректирующие РНК, синтезируемые с митохондриальных участков.

Принципы действия гормонов

Стероидные гормоны осущ. взаимодействие через ДНК (взаимодействуют на каскадах, у кот. есть поштвенное хромосома: появление стероидных гормонов вызов. дезорганизацию хроматин и образование пучков).

- Белок-рецептор взаимодействует в цитоплазме с лигандом - гормоном (эстроген, тиронидный и др.),
- Гормон-рецептор переходит в ядро и находится в промоторе-энхансере связываясь с специфичными сайтами связывания, выступая как репрессор или активатор.

Слайд : ЭР-зеленый белок: флуор-белок, с GFP, рецептор эстрогена

Как идет узнавание последовательности ДНК?

Палиндромные образующие посл.-ти (6 нп).
узнаваемые димером белка-рецептора.
Всего повторами - 3-4 нп. Различное палиндр.
посл.-ти в разных рецепторах

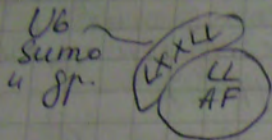
Рецептор стероидного гормона

Участки связывания:

- ДНК (с боками цинка)
- 11-13 д-спиралей: мизанда

Активные домены (AF1 и AF2): ганце не С-конце, но не обязательно. Связывание гормона изменяет конформацию д-спиралей и ганце.

AF взаимодействуют с ТФ и другими участниками комплексов активации / транскрипции.



Д/каждого рецептора \exists не один ко-активатор. Они и \uparrow и \downarrow действие рецептора.

Все это строится: действует в виде димера. В виде мономеров тоже играют роль (все это очень гибкая структура; разные формы медиаторов).

Рецепторы ретиноевых кислот (метаболизм витамина А)

В отличие от рецеп. стероидов, взаимодействуют с ДНК в форме гетеродимеров! с прямыми повторами.

За счёт комбинаций их на ДНК — правильная регуляция.

VDR + RAR \rightarrow активация.
(vit. D rec)

Сигнальные пути и транскрипция;
или "пусток" $\bar{\Phi}$ транскр.

DATE 04.12.2009

Уровни упаковки ДНК в ядре эукариотической клетки

Размер человеческой ДНК - ~1,8 м
Размер ядра - 10 мкм
Степень упаковки - 40 000x

Некоторые гены упакованы сильно (напр., овальбумина, кроме ♀ половых клеток).
Другие, наоборот, должны быть доступны.

ДНК → нуклеосома → домена → хромосома
11 нм
Фибрилла
↓
30 нм ф.

Нуклеосомы

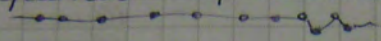
Основная масса ядерных белков — гистоны.
Удивительно консервативны. Основные
(H2A, H2B)

5 основных типов (4 из них короткие, коровые — H2A, H2B, H3, H4; H1 длиннее, 31 кДа + "скрепляет").

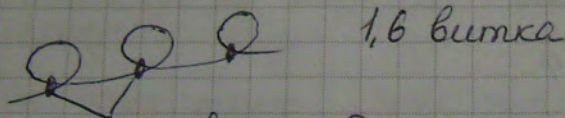
Обычно гистон — "шарик" с торганизим(и) положительно заряженным(и) хвостиком.
Гистоны взаимодействуют с ДНК уже электростатически.

Негистоновые белки: менее известны; участвуют в упаковке в фибриллах.

2 группа экспериментов, кот. привели к открытию нуклеосом:

1. ЭМ препаратов хроматина в низкой I. Видно: 
2. Анализ продуктов расщепления хроматина стафилококковой нуклеазой.

ДНК защищена глобулами, рвется по участкам между ними. На ЭФ — не шпир, а полосы с кратностью длины ~ 200 вр.



Н1 связ. с ДНК, исходящей из нуклеосомы и входящей в нее. Стабилизирует глобулу.

Модульная организация: из тетрамера هستона H3 и H4, затем на него садятся 4 H2A и H2B \Rightarrow получается октамер.

2 витка ДНК в нуклеосоме лежат II, поэтому одинаково расположены бороздки. В бороздки заходят хвосты هستонов.

Контакты هستонов с фосфорилированными остатками протек. через каналы 10 вр. (когда малая бороздка направлена внутрь).

Торчащие (обычно N-концевые) участки هستонов — мишени модификации.

Нуклеосомные гистоны не совсем идентичны.
Модификаций очень много. Наиболее
важные и известные по Φ :

- ацетилирование
- метилирование
- фосфорилирование

Один и тот же гист. и др. подвергается
разным модификациям \Rightarrow разные сигналы

Если прочитать всё количество
вариантов нуклеосом, оно превратит
воббиде их число в клетке.

H5 - заменяет H1 в эритроцитах
целенка (ядра сохраняются).

Е несколько "вариантов" форм гистонов,
некоторые являются специальными Φ .

Напр.:

- H3 центромер (CENP-A, Cid; если их
добавить, можно добиться формирования
центромер без псевторов)

Многие варианты гистонов кодируются
генами с несколькими формами. Многие
варианты или лишь один ген.

Нуклеосома и. посадить на любые последовательности, но некоторые предпочтительнее — легче извлекаются.

2 хар-ки:

- спейсинг: расстояние м/у нуклеосомами у большинства видов ординаков;
- фэйзинг: хар-ка, описывающая, как именно сидят нуклеосома на ДНК; если бы не было предпочтений и белков, связанных с ДНК, фэйзинга бы не было.

Как проверяется наличие фэйзинга?

1. Рестриктазами режется (или нуклеазами?)
- ? 2. Смотрятся полученные участки:

∃ некоторые участки — участки гиперчувствительности с ДНКазе — не связывающиеся с нуклеосомами никогда. Эти сайты часто покрыты регуляторными белками, в них и. искать рег. участки.

ТФ ∃ 2^х типов:

общие
тканеспецифичное



также гиперчувствит. сайты бывают общие, а бывают тканеспецифичные.

Секвенирование ДНК, нагруженной на нуклеосома → карта, где нуклеосома сидит, а где нет.

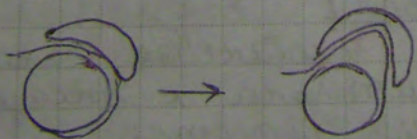
Д/ хорошего наматывания надо чередовать АТ и ВС участки (та часть, что ближе к белкам — лучше соед. АТ; та, что дальше — ВС).

Сейчас Э метод (селек), с пом. которого обнаружили поли-ти, очень высокоспецифичной к нуклеосомам. Они взаимодействуют крайне редко (их нельзя убрать с нуклеосома).

Э 3 основных группы комплексов реорганизации

Как они работают?

К. связывается с местом входа ДНК.
Происх. конформационный переход:



связь ДНК, как "гербачок"

Обычно 10 шагов.

30 нм фибрилла: 7 более вероятно, чем 11 нм. Видна в ЭМ. Термодинамически наиболее стабильна in vivo.

3 модели 30 нм ф.:

- спираль
- зигзаг (в природе именно так!)
- слоистой зигзаг со спирализацией

Атомный силовой микроскоп: анализ поверхности хроматина на подложке. Если убрать H1, нарушение зигзагообразной формы.

Видно, что есть агрегаты и более толстые фибриллы.

Динамика хроматина и транскрипция

Менее компактные — участки, где происходит транскрипция.

Опыт: резали ДНКазой I — в эритроцитах клетки шовиковые гены преимущественно чувствительны к ДНКазе I. Обвальбулин почти не режется.

В то же время ген обвальбулина чувствителен в эритроцитах.

Чувствительна к ДНКазе I не просто гены, но и их регуляторные участки.

Доменная гипотеза организации эукариотического генома:

Ацетилирование → разворачивание
 30кн фибрилла → активация

Деацетилирование → сворачивание →
 дезактивация и ↓ чувствительности к
 DNase.

Способ выделения активных участков
 генов:

Организация домена β-глобиновых генов человека

Одна из моделей изучения доменов.

Несколько генов. E - экспрессируется только
 у эмбрионов. Переключение транскрипции
 глобиновых генов.

Делизии при различных талассемиях.
 Есть даже те, что удаляют только
 регуляторные последовательности. Но
 тогда всё изменяется, даже структура
 самих глобиновых генов (изменение статуса
 всего домена). Даже промоторы не
 работают.

Как проверить? Искусственной конструкцией

Механизм геймбуса LK :

a) право транзитивные с приоритетом
ингибиторных линий;

б)

looping model : определение ритмы

Механизм геймбуса flip-flop : этактер
переполняет, что фиксируются этактер
предварит. Этактер. Он переключается
своей линией работаем только один раз.

DATE 11.12.2009

Динамика хроматиновой фибриллы контролируется прежде всего гистонацетилазами и гистондеацетилазами.

Это достаточно небольшие белки, входящие в большие белковые комплексы. Это нужно для привлечения в правильную область.

Наиб. распространённые HDAC1 и HDAC2
Sin3 - платформа, на кот. все собирается в одном из комплексов.
Mi2 - субъединица комплекса ремоделирования хроматина.

HDAC снимают ацетил и делают хроматин ? компактным.

Что привлекает эти белки?

Э модификации, мало изменяющие состояние хроматина, но важ. сигнальная (Ф) (напр., ацетилирование / метилирование H3 по позиции K9)
↓ ↓
привлечение белков, дезактивация
ацетилирующих хроматина
гистона и ↑
активность хроматина

Очень важна позиция! Напр., метилирование по K4 ведёт к активации хроматина.

Белки, сор. бромодомин, узнают H3, ацет по K9

Какими образом мы найдем модифицированные гистоны? Метод ChIP (иммунопреципитации хроматина)

1. Формальдегид
2. Разрушение УЗ до фрагментов;
3. Очистка
4. Освобождение с антителами к необходимому белку
5. PCR с фрагментов ДНК из комплексов.

Наиб. сильно ацетилирована гистоны в промоторных участках и работающих генах. Поэтому профиль ацетилир. совпадает с профилем уязвимости по отношению к DNase I.

Ацетилир. нуклеосом узнаются бромо-доменами.

Процесс активации хроматина — многоэтапный:

- разрушение 30nm фибриллы
- изъятие H1
- а) если больше нисем не закрыто, сарится преиниц. комплекс;
- б) если на нуклеом месте — нуклеосом, приходит комплекс ремоделирования хроматина и сдвигает, ослабляет, удаляет (или что-то другое) ее, преиниц. комплекс получает доступ.

Промоторные участки часто свободны от нуклеосом (пр. видно на SV40), тогда не мешают преиниц. комплексу.

Транскрипция "через" нуклеосома

РНК-Pol намного больше нуклеосома.
Но *in vitro* ДНК, покрытая нуклеосомами,
почти не транскрибируется.

Смер, д.б. спец. механизмы:

- нуклеосома частично разворачивается
- полное удаление нуклеосома (происходит в редких специальных случаях; напр., мРНК g1 белков теплового шока. Очень много синтезируется, полимеризация постоянно на нем)

Обычно же обходится частичным удалением нуклеосом (часто недопредставлены H2A¹¹⁰ и H2B)

Эксперимент:

собирается нуклеосома, дается полимеразе II.
Один димер оказался в растворе, а остается гексасома (без 1^{го} димера H2A-H2B).

FACT (facilitate)

Работает как шаперон, при работе Pol необходим в стехиометрическом количестве (на каждую нуклеосому)

Инактивация генов

Неактивные домены создаются специально, с пом. механизмов:

- метилирование;
- создание неактивных хроматиновых доменов.

SK_3
 \downarrow
 CPG
 BRG
 \downarrow
 SK_3

метилирование по обеим сторонам Э фермент DNMT1, находящийся по метилир. цепи после репликации и восстанавливающие метилирование

Эти посл-ти часто узнаются репрессорами и белками, привлекающими дезацетилазы истонков (и как следствие, создание неактивных доменов).

У всех ваших организмов, имеющих метилирование, изменяется соотношение $CPG : BRG$ (у E. coli = 1, у человека = 0,2) Но! Рациона, где у этих организмов $CPG : BRG = 1$ — **CPG-островки**.

Большинство промоторов генов домашнего хозяйства не метилируется!

Неактивная хроматин

Тенетика: эффект положения. Ген, сидящий в одном регионе, у нек. организмов выключен, у некоторых включен. Возникает мозаичность.

Пр.: white у дрозофил — цвет глаз за

висит от положения. Расположен близко к центру:

- в ней → белый глаз
- далеко → красный
- рядом → мозаика

* Гистонметилаза и структурные белки гетерохроматина (HP1 у Σ -ка, Sir-у дрожжей)

PEV связан с упаковкой домена в конститутивной гетерохроматине. \exists целый ряд мутаций, подавляющих PEV. Изучение соотв. генов позволило идентифицировать ключевые белковые продукты, необходимые для поддержания компактной упаковки неактивных доменов (вапский - *)

Если гистон метилирован (H3K9) - сарится HP1, образует димер, привлекается Sir (var) 3-9 (HP1 - heterochromatin protein 1, или хромодомен (?))

Даже плотная структура подвержена флуктуациям

Репликация хроматина

Нуклеосома из гистонов на ДНК в спр. условиях можно собрать *in vitro* (добавить шаперон, \downarrow \oplus заряд гистонов или повысить ионную силу, чтобы сдвинуть взаим. электростатические, или доб. Φ ремоделирование хроматина). Иначе соберется просто ДНК-белковый комплекс за счет электростат. взаимод. действий.

Хистоны синтезируются в цитоплазме. Новосинтезированные ацетируются по полонезии, обычно не исп. при регуляции хроматина.

CAF : перетаскивает H3 и H4 в ядро.
PCNA : тоже участвует (привлекает CAF с H3 H4, CAF уходит, образуется тетрамер H3 H4 ацетилованный еще и сарится на новую цель) Пока тетрамер не слишком компактен, вкисается крест. изгибания. Затем дезацетилаза I.

H2A-H2B перекосятся шаперонами AP1 в ядро и затем взаимодействуют с центром из тетрамера H3 H4 (уже сбитым на новую цель).

Это все репликативная сборка. Затем м. вкредется новая хистон с пол. спец. шаперонов и вкисается друше изгибания.

Компартментализация ядра

Наиболее хорошо различимый компартмент - дрышка. Его м. легко окрасить. Его форма разная, размеры и количество варьируются.

В дрышке нах. что-то, влияющее на регуляцию клеточного цикла, апоптоза и многих других процессов.

Есть и многие другие компартменты, выявляемые иммунофлуоресцентной окраской:

- где как ф-сплайсинга ("speckles" - пятнышки) белок SC35; здесь происходит созревание РНК;
- ламина и многие другие.

М. красить АТ к самым различным белкам и видеть, что они локализируются в опр. участках дискретных (даже по мере зрелости РНК).

По-видимому, в ядре как активное и пассивное зоны. М. из них друг в друга перетаскивать хроматин.

Распределение хромосом в интерфазном ядре

Крайер: если осветить ядро потоком лазера и сделать репарацию с включением метки. Метка оказывается в нескольких хромосомах после митоза (\Rightarrow в одной точке рядом расп. не одна хромосома).

Изобретен конфокальный микроскоп. Можно создавать 3^х мерное расположение хромосом.

Пр. результатов: Chr 19 - и она сформирована много генов; а Chr 1

Хромосомные территории: хромосома или свои непрерывающиеся "места обитания"

В округе наше село население.

Большее число — башкиры и татары ;
наряду с / округом с дерев. и т. д.
населенными как и другими мах и не
первыми в нем перемерши.

Корреспондент хронический перемерши ;
сн. вступил в % сн. разведка.

Учен. работы ссодбемандис и т. д.
вместе с рассм. в сфере.