

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКЕ

Указания обобщают современные данные в области молекулярной генетики, включая достижения науки последних лет, которые закладывают фундамент знаний, необходимых для дальнейшего обучения.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Функция ДНК как наследственного материала.

Запись и хранение наследственного материала. Биологический код и его характеристика. Разнообразие белковых молекул определяется набором и порядком расположения аминокислот в полипептидных цепях. Именно эта последовательность аминокислот в пептидных цепях, определяя свойства белка, зашифрована в молекуле ДНК с помощью биологического кода. Уникальность молекул ДНК достигается различной последовательностью четырех нуклеотидов на нити ДНК.

Как было установлено в эксперименте, кодирование отдельной аминокислоты осуществляется с помощью трех рядом стоящих нуклеотидов (триплетов) в полинуклеотидной цепи ДНК. Число возможных триплетов, которые образуются четырьмя нуклеотидами, соответствует $4^3 = 64$. Такого количества триплетов вполне достаточно, чтобы зашифровать 20 наиболее распространенных в природе аминокислот, входящих в состав белка. В работах Ниренберга и Очао (1961 -1964 гг.), посвященных расшифровке биологического кода, было установлено, что из 64 триплетов 61 кодирует аминокислоты, три триплета, не кодирующие никаких аминокислот, были названы НОНСЕНС - триплетами: UAA, UAG, UGA. Избыток кодирующих триплетов объясняется тем, что большинство аминокислот шифруется более чем одним (от 2 до 6) триплетом. Таким образом, расшифровка биологического кода показала, что он:

1. триплетен (одна аминокислота кодируется тремя рядом стоящими нуклеотидами);
2. специфичен (один и тот же триплет кодирует только одну определенную аминокислоту).
3. универсален (он применим для всех живых организмов);
4. вырожден (то есть одна и та же аминокислота может кодироваться несколькими различными триплетами);

5. однонаправлен (считывание информации происходит только в одном направлении);
6. не перекрываем (то есть каждый нуклеотид входит в состав только одного триплета и занимает в нем строго определенное место). Неперекрываемость кода была доказана экспериментально. У человека известно несколько форм гемоглобина, отличающихся только одной аминокислотой. Они возникли путем изменения только одного нуклеотида, кислота входит в состав нормального гемоглобина А, валин - в состав патологического гемоглобина S. В условиях гипоксемии такие эритроциты приобретают серповидную форму.

Редупликация (репликация) наследственного материала.

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

1. Разрыв водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями двух полинуклеотидных цепей осуществляет фермент ДНК-геликаза, расплетая двойную спираль ДНК.
2. ДНК-топоизомераза разрывает фосфодиэфирную связь в одной из полинуклеотидных цепей ДНК, снимая напряжение, вызываемое расплетением спирали и расхождение цепей в репликационной вилке.
3. Дестабилизирующие белки выпрямляют участок ДНК, растягивают одиночные цепи ДНК, не позволяя им сомкнуться, и делают азотистые основания свободными для связывания с комплементарными нуклеотидами.
4. В области репликационной вилки действуют ферменты ДНК-полимеразы: на ведущей (лидирующей) и отстающей (запаздывающей) цепях. На ведущей цепи ДНК-полимераза работает непрерывно, а на отстающей фермент время от времени прерывает и вновь возобновляет свою работу, используя короткие молекулы РНК-затравки, синтезируемые ферментом ДНК-праймазой.
5. ДНК-праймаза синтезирует одну РНК-затравку ("праймер") для лидирующей цепи и для каждого фрагмента ДНК (фрагмента Оказаки) в запаздывающей, У прокариот фрагменты Оказаки содержат от 1000-2000 нуклеотидов. У эукариот значительно короче- 100-200 нуклеотидов. Молекула ДНК-праймазы непосредственно связана с ДНК-геликазой, образуя структуру, называемую ПРАИМОСОМОЙ, которая движется в направлении

раскрывания репликационной вилки и по ходу движения синтезирует РНК-затравку для фрагментов Оказаки. В этом же направлении движется ДНК-полимераза ведущей цепи и ДНК-полимераза отстающей цепи. Для этого, как полагают, последняя накладывает цепь ДНК, которая служит ей матрицей, саму на себя, что и обеспечивает разворот ДНК-полимеразы отстающей цепи на 180° . Согласованное движение двух ДНК-полимераз обеспечивает координированную репликацию обеих нитей.

Репликация происходит путем непрерывного роста обеих новых цепей по мере перемещения репликационной вилки, при этом, так как две цепи в спирали ДНК антипараллельны, одна из дочерних цепей должна была бы расти в направлении $5' \rightarrow 3'$ концу, а другая - от $3' \rightarrow 5'$. В действительности, оказалось, что дочерние цепи растут только в направлении $5' \rightarrow 3'$, то есть всегда удлиняется $3'$ - конец затравки, а матрица считывается ДНК-полимеразой в направлении $3' \rightarrow 5'$.

6. РНК-затравка, не обладающая корректирующей активностью, отличается от новосинтезированной цепи ДНК, поскольку состоит из рибонуклеотидов и в дальнейшем удаляется с помощью специфической рибонуклеазы. Образовавшиеся бреши достраиваются комплементарными участками ДНК.

7. Соединение синтезированных фрагментов ДНК (фрагментов Оказаки) происходит с помощью фермента ДНК-лигазы в запаздывающей нити ДНК.

В процессе репликации синтез новых полинуклеотидных цепей осуществляется в соответствии с принципами комплементарности и антипараллельности. На каждой из двух ранее существовавших материнских полинуклеотидных цепей синтезируется комплементарная ей полинуклеотидная цепь. В результате репликации в дочерних молекулах ДНК одна полинуклеотидная цепь является вновь синтезированной, а другая - ранее входила в состав материнской молекулы ДНК. Такой способ синтеза называется полу консервативным. Благодаря ему обеспечивается точное воспроизведение в дочерних молекулах ДНК той информации, которая была записана в материнской молекуле.

Репликация осуществляется в синтетический период жизненного цикла клетки перед митозом и мейозом.

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

Генетический материал живых организмов имеет огромные размеры и реплицируется с высокой точностью. В среднем в процессе воспроизведения генома млекопитающего, состоящего из ДНК длиной 3 млрд. пар нуклеотидов, возникает не более трех ошибок. При этом ДНК синтезируется очень быстро (скорость ее полимеризации колеблется в пределах от 500 нуклеотидов /с. у бактерий до 50 нуклеотидов/ с. у млекопитающих). Высокая точность репликации, наряду с ее высокой скоростью, обеспечивается наличием специальных механизмов, осуществляющих коррекцию, т.е. устраняющих ошибки. Суть механизма коррекции заключается в том, что ДНК-полимеразы дважды проверяют соответствие каждого нуклеотида матрице: один раз перед включением его в состав растущей цепи и второй раз перед тем, как включить следующий нуклеотид. Очередная фосфодиэфирная связь синтезируется лишь в том случае, если последний (3'-концевой) нуклеотид растущей цепи ДНК образовал правильную уотсон-криковскую пару с соответствующим нуклеотидом матрицы. Если же на предыдущей стадии реакции произошло ошибочное спаривание оснований, то дальнейшая полимеризация останавливается до тех пор, пока ошибка не будет исправлена. Для этого фермент перемещается в обратном направлении и вырезает последнее добавленное звено, после чего его место может занять правильный нуклеотид - предшественник.

Репаративный синтез ДНК.

В процессе жизнедеятельности под действием различных факторов в ДНК возникают повреждения, некоторые из них могут ликвидироваться благодаря репарации ДНК. Механизм репарации ДНК изучен на кишечной палочке. При воздействии на культуру кишечной палочки ультрафиолетовыми лучами на нити ДНК возникают повреждения - димеры (цитозин-цитозин, цитозин-тимин, чаще всего возникают димеры тимина, соединенные через атомы углерода и представляющие собой наиболее стойкие соединения). Димеры тимина приводят культуру кишечной палочки к гибели, если ее поместить в темноту. На свету димеры тимина расщепляются под действием фермента на два тимина, тем самым восстанавливая структуру ДНК, это явление называется световая фотореактивация. Исправляются повреждения, возникшие под действием ультрафиолетовых лучей. Повреждения, возникшие под влиянием других факторов (ионизирующая радиация, химические вещества и др.) исправляется в результате темновой фазы репарации. Она осуществляется в 5 этапов:

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

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

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

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

Атаксия - телеангиоэктазия (синдром Луи Бара) - прогрессирующая атаксия мозжечка с нарушением координации движений, телеангиоэктазия склер. В этом случае сильно запаздывает второй этап репарации - удаление поврежденных оснований молекулы ДНК.

Панцитопения при гипо- и апластических анемиях. Поражены все ростки костного мозга. При этом заболевании нарушен третий этап темновой репарации - синтез экзонуклеазы, завершающей вырезание поврежденного участка ДНК.

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

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

1. Миссенс-мутация. Связаны с заменой одного нуклеотида на другой. В результате такой

мутации возникло заболевание серповидноклеточная анемия. У гомозиготных носителей этого гена в эритроцитах содержится гемоглобин S, отличающийся от нормального гемоглобина. А только одной аминокислотой, потерявшей способность легко связываться с кислородом.

2. Нонсенс-мутация. Связана с образованием бессмысленных кодонов (УАА, УАГ, УГА).

3. Мутация со "сдвигом рамки". Наблюдаются при вставке или выпадении одного нуклеотида.

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

1. триплетность и вырожденность генетического кода;

2. диплоидность (гетерозиготность) генотипа. Мутации чаще всего рецессивные и проявляются только в гомозиготном состоянии;

3. повторы генов на нити ДНК;

4. репаративные процессы;

5. метилирование ДНК (присоединение метильной группы СН₃ под действием фермента метилазы) предохраняет ДНК от действия рестриктаз (ферментов, расщепляющих ДНК).

С возрастом процесс метилирования усиливается.

Обеспечение реализации наследственной информации. Роль РНК.

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

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

Рибосомальная РНК (рРНК) входит в комплексе с белками в состав рибосом, функции которых непосредственно связаны с реализацией генетической информации при синтезе пептидных связей. Р-РНК образуется на матрице ДНК, в особых локусах - генах, отвечающих за ее синтез.

Т-РНК - короткая (70-80 нуклеотидов) полинуклеотидная цепь, осуществляющая функцию транспорта аминокислот к месту сборки пептидной цепи - к рибосоме. Эти молекулы также синтезируются на матрице ДНК. Особенностью тРНК является пространственная конфигурация. Благодаря образованию водородных связей между комплементарными последовательностями нуклеотидов молекула образует три петли. Средняя петля несет три нуклеотида (антикодон) комплементарных определенному кодону в молекуле иРНК, шифрующему данную аминокислоту. Так как один из нуклеотидов антикодона содержит нетипичное основание, которое может комплементировать с любым основанием кодона, то одна и та же тРНК способна узнавать несколько кодонов, различающихся по одну (главным образом третьему) основанию. В связи с этим в цитоплазме встречается около 40 видов различных тРНК, способных переносить 20 аминокислот. К 3' концу молекулы тРНК прикрепляется определенная молекула аминокислоты. Все тРНК начинаются с фосфорилированного 5' -конца; первым основанием обычно является G. На 3' -конце всегда присутствуют три основания -ЦЦА и концевая гидроксильная группа (-ОН) - акцепторный конец. К этому концу присоединяется остаток аминокислоты. Прежде чем соединиться с тРНК, аминокислоты активируются. Активация аминокислот происходит при их взаимодействии с АТФ и образованием аминоациладенилата (активированная форма аминокислоты), который представляет собой смешанный ангидрид, образованный остатком фосфорной кислоты, АМФ и карбоксильной группой аминокислоты. С аминоациладенилата остаток аминокислоты переносится на тРНК, специфичную для каждой аминокислоты, и в виде аминоацил-тРНК поступает в рибосомы. Эти реакции катализируются ферментом аминоацил-тРНК-синтетазой, строго специфичным для каждой аминокислоты и каждой тРНК.

и-РНК- молекула, на которую переписывается по принципу комплементарности информация с определенного участка молекулы ДНК. Списанная информация поступает в виде иРНК в цитоплазму и является инструкцией для сборки пептидной цепи на рибосоме. Таким образом, молекула ДНК при участии различных видов РНК обеспечивает специфический синтез в клетке.

Реализация наследственной информации.

Реализация у прокариот.

В связи с тем, что у прокариот геном организован в виде кольцевидной молекулы ДНК,

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

Особенности реализации наследственной информации у эукариот.

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

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

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

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

1. Транскрипция - осуществляется с помощью РНК-полимераз. РНК-полимераза I синтезирует пре-рРНК. РНК-полимераза II синтезирует пре-иРНК. РНК-полимераза III - пре-тРНК. Раньше считали, что транскрипция происходит по 1 из 2-х расплетаемых нитей ДНК. Сейчас установлено, что транскрипция идет по обеим нитям в 2-х направлениях. Одна нить ДНК несет наследственную информацию (смысловая), другая, комплементарная ей - антисмысловая. В клетке антисмысловая иРНК играет роль в

управлении дифференцировкой и иногда - в регуляции синтеза белка. Если образуется комплекс (дуплекс иРНК + антисмысловая иРНК), тогда невозможен перенос иРНК из ядра в цитоплазму, следовательно, нет трансляции на рибосомах.

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

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

2. Посттранскрипционные процессы (процессинг).

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

Основные стадии процессинга:

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

В результате процессинга у эукариот зрелая иРНК характеризуется следующими

особенностями строения:

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

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

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

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

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

Трансляция - процесс сборки пептидной цепи, происходящей в цитоплазме на рибосомах на основании программы, содержащейся в иРНК. Основные фазы трансляции:

1) инициация; 2) элонгация; 3) терминация.

Инициация трансляция предполагает следующие события:

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

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

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

аминоацильном центре, при участии имеющихся здесь ферментов возникает пептидная связь:

После установления пептидной связи предыдущая тРНК отделяется от своей аминокислоты и своего кодона и уходит в цитоплазму, а последняя тРНК, нагруженная цепочкой аминокислот, переходит в ПЦ, заставляя иРНК перемещаться вдоль рибосомы и устанавливать новый кодон против аминоацильного центра.

После прохождения через рибосому всей кодирующей части иРНК на рибосоме собирается пептидная цепь с определенной последовательностью аминокислот.

Фаза терминации наступает, когда в контакт с рибосомой приходит концевой участок иРНК, который включает нонсенс-кодон, не кодирующий никакой аминокислоты. На этом сборка пептидной цепи заканчивается. По мере освобождения 5'/конца иРНК колпачок может находить новые малые субъединицы рибосом и процесс трансляции может повторно осуществляться на новых рибосомах. Комплекс рибосом, находящихся в контакте с одной молекулой иРНК и синтезирующих одинаковые пептидные цепи, называется полирибосомой (полисомой).

Посттрансляционные процессы.

В ходе предыдущих этапов реализации наследственной информации обеспечивается синтез пептидной цепи, которая в большинстве случаев начинается с аминокислоты формилметионин и соответствует первичной структуре белковой молекулы.

Последующие события заключаются в отщеплении формилметионина, в некоторых случаях осуществляется модифицирование пептида после трансляции, формируется вторичная и третичная структуры белка (иногда для некоторых белков, характеризующихся четвертичной структурой, осуществляется объединение одинаковых, либо различных пептидных цепей с образованием активно функционирующего белка).

В зависимости от того, каковы функции белка (ферменты, строительный материал, антитела и т.д), он принимает участие в обеспечении морфо-функциональных особенностей клетки (организма), т.е. в формировании определенных сложных признаков. Это является завершающим этапом процесса реализации генетической информация.

У эукариот образование РНК происходит и в цитоплазме: в митохондриях и хлоропластах (у растений), обладающих собственной системой синтеза белка и собственной генетической информацией в виде ДНК - цитоплазматическая наследственность, однако, система белкового синтеза в митохондриях и пластидах аналогична таковой у прокариот и существенно отличается от белкового синтеза в ядре высших животных. Гены,

расположенные в цитоплазме вне хромосом, называются плазмогенами. Ими объясняется особый тип наследования, при котором признак передается через цитоплазму яйцеклетки (по материнской линии). Уникальной остается родословная, по которой в семьях трех поколений родилось 72 девочки и ни одного мальчика. Предполагают, что мутацией митохондриальных генов объясняются некоторые пороки развития человека - Spina bifida (раздвоенный позвоночный столб), сращение нижних конечностей.

Регуляция генной активности.

Реализация наследственной информации в живых системах - это сложный процесс, требующий очень тонкой регуляции для того, чтобы обеспечить в определенных клетках в определенное время синтез определенных белков в необходимом количестве.

Все клетки организма, возникая путем митоза, получают полноценный набор генетической информации, образуемый при оплодотворении родительских гамет.

Несмотря на это, они отличаются по своим морфологическим, биохимическим и функциональным свойствам друг от друга. В основе этих различий лежит активное функционирование в разных клетках разных частей генома.

Большая часть генома в клетках организма находится в неактивном -репрессивном состоянии в только около 10% генов дерепрессированы, т.е. активно транскрибируются.

Спектр транскрибируемых генов зависит от тканевой принадлежности клетки, от периода ее жизнедеятельности и периода индивидуального развития организма

Регуляция активности генов может осуществляться на всех этапах реализации генетической информации, но наиболее экономически выгодной является регуляция на стадии транскрипции.

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

Генетическими факторами регуляции транскрипции являются гены-регуляторы и операторы. Гены-регуляторы определяют синтез белков-регуляторов, способных в активном состоянии соединиться с оператором, включающим или выключающим транскрипцию структурных генов. В зависимости от свойств белка-регулятора различают негативный и позитивный контроль транскрипции со стороны гена-регулятора. При негативном контроле белок-регулятор, соединяясь с оператором, прекращает (выключает) транскрипцию. Такой белок называется репрессором. При позитивном контроле белок-регулятор, соединяясь с оператором, включает транскрипцию. В таком случае продукт гена-регулятора называется апоиндуктором .

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

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

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

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

Регуляция транскрипции у прокариот.

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

Особенностью прокариот является транскрибирование иРНК со всех структурных генов оперона. Такая полицистронная иРНК в дальнейшем разрезается на фрагменты, соответствующие матрицам для синтеза отдельных ферментов. Цепи структурных генов оперона всегда предшествует промотор, узнаваемый РНК-полимеразой. У

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

При отсутствии в среде лактозы активный репрессор, взаимодействуя с оператором, репрессирует гены А, В, С - транскрипции нет. Появление в среде лактозы инактивирует репрессор, он не соединяется с оператором и осуществляется транскрипция генов А, В, С, отвечающих за синтез ферментов, которые расщепляют лактозу.

Уменьшение содержания лактозы в результате ее ферментативного расщепления приводит к соединению активного репрессора с оператором и выключению транскрипции генов А, В, С.

Регуляция экспрессии генов у эукариот.

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

В настоящее время механизмы регуляции активности эукариотических генов интенсивно изучаются. Установлено, что регуляция транскрипции у эукариот является комбинационной, т.е. активность каждого гена регулируется большим спектром генов-регуляторов. У многих эукариотических генов, кодирующих белки и транскрибируемых РНК-полимеразой II, в ДНК имеется несколько областей, которые узнаются разными белками-регуляторами. Одной из них является область, расположенная вблизи промотора. Она включает около 100 пар нуклеотидов, в том числе ТАТА-блок, располагающийся на расстоянии 25 пар нуклеотидов от точки начала транскрипции. Установлено, что для

успешного присоединения РНК-полимеразы II к промотору необходимо предварительное соединение с ТАТА-блоком особого белка - фактора транскрипции - с образованием стабильного транскрипционного комплекса. Именно этот комплекс ДНК с белком узнается РНК-полимеразой II.

Другая область, играющая важную роль в регуляции активности эукариотических генов, располагается на большом расстоянии от промотора (до нескольких тысяч пар нуклеотидов) и называется ЭНХАНСЕРОМ (от англ. enhance - усиливать).

И энхансер, и препромоторный элемент эукариотических генов - это короткие последовательности нуклеотидов, которые связываются с соответствующими регуляторными белками. В результате взаимодействия этих белков происходит включение или выключение генов.

Особенностью регуляции экспрессии эукариотических генов является также существование белков-регуляторов, которые способны контролировать транскрипцию многих генов, кодирующих, возможно, другие белки-регуляторы. В связи с этим некоторые (главные) белки-регуляторы обладают координирующим влиянием на активность многих генов и их действие характеризуется плейотропным эффектом.

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

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

генной активности. Непременным условием для осуществления транскрипции у эукариот является предварительная декомпактизация хроматина на соответствующем участке, где временно утрачивается связь с H1-гистонами и несколько ослабляется связь с нуклеосомными гистонами. Правда, нуклеосомная организация хроматина не утрачивается даже в ходе транскрипции, однако контакт ДНК и негистоновых белков становится возможным и происходит дерепрессия гена.

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

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

Существуют механизмы, обеспечивающие регуляцию процессов синтеза пептидных цепей. Они менее экономичны, но отличаются быстротой реагирования на изменения потребностей клетки в данном белке. Регуляция трансляции осуществляется на стадии инициации, когда блокируется присоединение к малой субъединице рибосомы тРНК, несущей формилметионин. В результате при наличии в цитоплазме иРНК трансляции на ней не происходит. Такая ситуация наблюдается, например, при отсутствии в цитоплазме гена, что ведет к выключению трансляции глобиновых цепей гемоглобина.

Регуляция процесса реализации наследственной информации может осуществляться и на стадии посттрансляционных изменений, когда происходит задержка в формировании активных молекул белка при наличии пептидных цепей. Например, для формирования активной формы инсулина из проинсулина должны вырезаться две субъединицы.

Торможение этих процессов уменьшает выход конечного активного продукта.

Генетическая (генная) инженерия

Генетическая (генная) инженерия - область молекулярной биологии и генетики, ставящая своей задачей конструирование генетических структур по заранее намеченному плану, создание организмов с новой генетической программой. Возникновение генетической инженерии стало возможным благодаря синтезу идей и методов молекулярной биологии,

генетики, биохимии и микробиологии. Основные методы генной инженерии были разработаны в 60-70-х годах нашего века. Они включают три основных этапа:

- получение генетического материала (искусственный синтез гена или выделение природных генов);
- включение этих генов в автономно реплицирующуюся генетическую структуру (векторную молекулу) и создание рекомбинантной молекулы ДНК;
- введение векторной молекулы (с включенным в нее геном) в клетку-реципиент, где она встраивается в хромосомный аппарат. Экспериментальный перенос генов в другой геном называется ТРАНСГЕНЕЗОМ.

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

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

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

Гены для пересадки могут быть либо искусственно синтезированы, либо выделены из ДНК прокариот и хромосом эукариот. В настоящее время выделение высокомолекулярной ДНК проводят на ультрацентрифугах в градиенте плотности хлористого цезия.

Известно два пути искусственного синтеза гена: химический и ферментативный.

Для ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА необходимо иметь полностью расшифрованную последовательность нуклеотидов. Впервые в 1970 году индийским ученым Корана Г. (США) был осуществлен искусственный синтез гена. Он синтезировал последовательность нуклеотидов в ДНК, специфическую для структуры гена транспортной аланиновой РНК в клетках пекарских дрожжей. Более двух лет затратили на этот синтез гена. Последовательность нуклеотидов в нити ДНК определялась по информационной РНК. Но этот ген был не способен работать *in vitro*. Причиной являлся синтез только структурной части гена, в нем не было регуляторных участков. Для транскрипции необходимо, чтобы фермент РНК-полимераза "узнавала" место промотора, где локализована точка инициации синтеза, и в этом месте "садилась" на матрицу. В 1976 г, в той же лаборатории был синтезирован ген тирозиновой тРНК бактерии

кишечной палочки, состоящий не только из структурного участка (126 нуклеотидных пар), но и регуляторных частей - промотора и терминатора. Этот искусственно созданный по специальной программе ген был выведен в бактериальную клетку и функционировал как природный.

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

Кроме того, химический синтез очень трудоемкий и для генной инженерии в настоящее время практически не используется. Наиболее успешным оказался **ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ** гена.

Центральная догма молекулярной генетики утверждает, что считка информации происходит в направлении: ДНК→РНК→белок. Но ряд авторов, начиная с 1948 года, выступали с соображениями, что РНК может быть предшественником ДНК. Подобное наблюдается у онкогенных РНК - содержащих вирусов. С РНК-вируса, попавшего в клетку, синтезируется провирус (ДНК - копия РНК) с помощью фермента обратная транскриптаза (ревертаза), а сам процесс называется обратной транскрипцией. Этот фермент был открыт в 1970 году Теминым, Мазутани, Балтимором.

Клонирование (размножение) кДНК по известной иРНК было разработано Г.Бойером, С.Коэном и П.Бергом в 1973 году (рис. 1). На 1 этапе на основе иРНК по принципу комплементарности синтезируют односпиральную кДНК. На 2-3 этапах удаляют иРНК и достраивают вторую часть кДНК. Деполимеризацию исходной РНК-цепочки осуществляют путем щелочного гидролиза. Цепи ДНК устойчивы к обработке щелочью, а РНК полностью деполимеризуется. Двухцепочечную кДНК получают путем достраивания одноцепочечной кДНК под действием фермента ДНК-полимеразы. После такой обработки кДНК можно встраивать в вектор. Такая кДНК не имеет вставок - интронов, т.е. схема ее строения в этом смысле не отличается от бактериального гена.

Ген, полученный путем ферментативного синтеза, может функционировать в бактериальной клетке, на нем синтезируется иРНК, а затем белок, таким путем под руководством академика В.А.Энгельгардта был получен ген, определяющий синтез фермента галактозидазы, введенный в фаг. При размножении фага в клетке получили множество копий, что обеспечило синтез большого количества фермента. Это имеет не только теоретическое, но и практическое значение, так как галактозидаза применяется в

пищевой промышленности.

Следовательно, если иметь в пробирке выделенные молекулы иРНК, принадлежащие данному гену, то он может быть синтезирован с помощью фермента. Матрицей служит иРНК, ее выделяют, добавляют нуклеотиды, затравку, ферменты. На основе этих данных в 1972-1973 гг. во многих лабораториях мира были синтезированы гены глобина человека, кролика, голубя, мыши, утки, гены митохондрии печени крыс и другие. Гены, синтезированные с помощью ревертазы, не имеют регулярной части и промотора.

Отсутствие регуляторных участков препятствует функционированию этих искусственных генов в животных клетках. При переносе в микробную клетку к структурным генам присоединяют промотор, извлеченный из микробной клетки. Были синтезированы два гена, отвечающие за синтез цепей инсулина, введены в геном кишечной палочки, которая стала продуцировать инсулин. Важным достижением генной инженерии является синтез гена соматостатина, этот ген функционирует в микробной клетке. Таким же методом под руководством академика Ю.А.Овчинникова и Н.П.Дубинина осуществлен синтез генов, кодирующих нитрогормоны человека (лейцин-энкефалин и брадикинин).

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

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

Операции по получению рекомбинативных молекул состоят из нескольких этапов:

1 этап - выделение чужеродной ДНК для переноса в другую клетку. Это делают с помощью ферментов - РЕСТРИКТИРУЮЩИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ (РЕСТРИКТАЗ). Эти ферменты являются обычной принадлежностью бактериальной клетки, образуя как бы естественную систему защиты от чужеродной генетической информации. Рестриктазы опознают чужеродные последовательности нуклеотидов, подвергают разрушению чужеродную ДНК, разрезая ее словно скальпелем на отдельные участки. Причем каждая рестриктаза может действовать только на определенную последовательность нуклеотидов, так называемые САЙТЫ-УЧАСТКИ ОПОЗНАНИЯ.

В настоящее время известно более 200 рестриктаз, но наибольшее применение нашла

рестриктаза кишечной палочки (EcoR-1). Она разрезает в строго определенном месте: на равных расстояниях от центра сайта узнавания. Действие каждой рестриктазы специфично, т.е. фермент атакует определенные участки (сайты) в последовательностях нуклеотидов молекул ДНК. При разрыве ДНК образуются фрагменты с односторонними участками на концах: один с последовательностью ААТТЦ, другой- ЦГГАА. Такие концы называют "липкими". Действительно, если оставить на время раствор фрагментов, полученных с помощью рестриктаз, эти фрагменты сливаются, восстанавливая прежнюю структуру. Между комплементарными основаниями образуются водородные связи, соединяющие А с Т, Т с А.

2 этап - сшивание (лигирование) чужеродной ДНК с векторной (направляющей) молекулой ДНК. ВЕКТОР - это нечто вроде молекулярного "такси", способного переносить чужую ДНК внутрь бактериальной клетки таким образом, чтобы она там могла реплицироваться. Существуют разные типы векторов: ПЛАЗМИДЫ, БАКТЕРИОФАГИ (фаг лямбда), ВИРУСЫ (обезьяний вирус SV40), способные переносить и постоянно поддерживать в реципиентах чужеродную генетическую информацию.

ПЛАЗМИДЫ - это встречающиеся в клетках внехромосомные элементы, представляющие собой замкнутые кольцевые молекулы двуцепочечной ДНК. Они способны реплицироваться независимо от геномной ДНК бактерий. Крупные плазмиды могут содержать до 100 генов. Такие плазмиды часто несут генетическую информацию, которая позволяет им переходить из одной клетки в другую во время процесса конъюгации. В мелких плазидах число генов может составлять всего около 10, и они неспособны переходить из клетки в клетку при конъюгации- Число генов в плазмиде непостоянно. Обмен генетической информацией с геномом клетки или с другими плазидами происходит путем переноса определенных участков плазмидной ДНК, способных к перемещению (транспозиции), с одной молекулы ДНК на другую и называемых поэтому транспозонами. Часто плазмиды содержат гены, белковые продукты которых обеспечивают нечувствительность к тем или иным антибиотикам. Разные плазмиды содержат разные гены резистентности к антибактериальным препаратам. Большая часть таких препаратов - антибиотиков используется в качестве лекарств при лечении ряда заболеваний человека. Бактерия, имеющая разные плазмиды, приобретает устойчивость к различным антибиотикам, к солям тяжелых металлов. При действии определенного антибиотика на бактериальные клетки плазмиды, придающие устойчивость к нему, быстро распространяются среди бактерий, сохраняя им жизнь. Чтобы включить кДНК в плазмиду, замкнутое кольцо плазмиды надо "разомкнуть". Для этого плазмиды

подвергают воздействию рестриктаз.

Самым простым вектором можно считать плазмиду кишечной палочки, относящуюся к группе колициногенных факторов, детерминирующих у кишечной палочки синтез антибиотика колимицина. Из кольцевой плазмиды превращается в линейную структуру, в которой имеются "липкие" концы по отношению к фрагментам чужеродной ДНК. Липкие концы должны иметь комплементарные основания, они соединяются водородными связями независимо от структуры и происхождения ДНК. Затем с помощью ферментов - лигаз образуется плазмиды, которая называется рекомбинантной (с включенным участком чужеродной ДНК). Описанная процедура, в ходе которой чужеродная ДНК встраивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента, называемого ДНК-лигазой, достигается методом ГОМОПОЛИМЕРНЫХ КОНЦОВ (рис. 3).

Метод гомополимерных концов основан на присоединении к 3' - концам цепей, образующих двуцепочечную ДНК, коротких отрезков одноцепочечной ДНК с регулярной последовательностью (гомополимерных). Если каждый подобный гомополимер состоит из нуклеотидов одного вида и если два таких гомополимера с взаимно комплементарными основаниями присоединены соответственно к плазмиде и к ДНК, то последние, оказавшись рядом, замкнутся друг на друга с образованием рекомбинантной плазмиды. Как происходит внедрение гибридной молекулы в бактериальную или животную клетку? Способ введения зависит от вектора. Для бактерий - это ТРАНСФОРМАЦИЯ. В случае использования фагов и вирусов перенос генетического материала осуществляется посредством ТРАНСДУКЦИИ.

ТРАНСФОРМАЦИЯ - введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки, обработанные специальным образом, так, чтобы они на короткое время стали проницаемыми для макромолекул. Однако плазмиды проникают лишь в часть обработанных бактерий. Трансформированные бактерии вместе с плазмидой приобретают устойчивость к определенному антибиотику. Это позволяет их отделить от нетрансформированных бактерий, погибающих на среде, содержащей этот антибиотик. Для этого бактерии высевают на студнеобразную питательную среду, предварительно разведя их так, чтобы при рассеивании клетки находились на значительном расстоянии друг от друга. Каждая из трансформированных бактерий размножается и образует колонию из многих тысяч потомков - клон.

СКРИНИНГ - отбор среди клонов трансформированных бактерий тех которые содержат плазмиды, несущие нужный ген человека. Для этого все бактериальные колонии накрывают специальным фильтром. Когда его снимают, на нем остается отпечаток колоний, так как часть клеток из каждого клона прилипает к фильтру. Затем проводят

молекулярную гибридизацию. Фильтры погружают раствор с радиоактивно меченным зондом. Зонд - это полинуклеотид, комплементарный части искомого гена. Он гибридизуется лишь с теми рекомбинантными плазмидами, которые содержат нужный ген. После гибридизации на фильтр в темноте накладывают рентгеновскую фотопленку через несколько часов ее проявляют. Положение засвеченных участков на пленке, образовавшихся из-за радиоактивной метки зонда, позволяет найти среди множества клонов трансформированных бактерий те, которые имеют плазмиды с нужным геном. С помощью клонирования можно получить более миллиона копий любого фрагмента ДНК человека или другого высшего организма. Это позволяет изучить первичную структуру клонированного фрагмента, что приближает нас к пониманию организации структуры хромосомы. Если клонированный фрагмент кодирует белок, то экспериментально можно изучить механизм, регулирующий транскрипцию этого гена, а также наработать нужный белок в том количестве, которое требуется для медицинских или исследовательских целей. Кроме того, фрагмент ДНК одного организма можно ввести в клетки другого организма. Уже предпринимаются попытки вводить в те или иные культурные растения гены, обеспечивающие устойчивость к ряду болезней. Сегодня накапливаются клонированные фрагменты ДНК человека, ряда сельскохозяйственных животных и растений. Коллекцию разных клонов называют **КЛОНОТЕКОЙ**, **ГЕНОМНОЙ БИБЛИОТЕКОЙ** или **БАНКОМ ГЕНОВ**. Для полной библиотеки генома человека требуется получить около 800 тыс. разных клонов. Установлено, что чужеродная ДНК, будучи введена в состав ДНК плазмиды или вируса, может сохраняться там, не претерпевая серьезных изменений нуклеотидной последовательности на протяжении нескольких сот генераций. Доказано, что бактериальные гены в составе гибридных молекул функционируют нормально. Гены, выделенные из ДНК эукариот (грибы, растения, животные) в плазмиды встраиваются хорошо и размножаются в неограниченном количестве. Матричная иРНК на них образуется, так что процесс транскрипции идет нормально. Осложнение возникло с процессом трансляции - синтезом белковых молекул. Эукариотный белок в бактериальных клетках синтезировался. Так была открыта сложная структура гена эукариот, состоящая из экзонов и интронов. Нахождение условий функционирования генов эукариот в бактерии позволяло бы решить проблему получения многих биологически активных веществ (гормонов). Одним из достижений генной инженерии является синтез гормона соматостатина, полученный в результате введения этого гена в кишечную палочку. Соматостатин регулирует поступление в кровь гормона роста, образуется он в гипоталамической области.

Плазмиды, содержащие этот ген, были введены в бактерию и состыкованы с имеющимся в ее геноме регуляторным геном бетагалактозидазы. Наличие регуляторного участка обеспечило процесс транскрипции и трансляции.

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

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

Успехи генной инженерии должны быть использованы на благо человека: в борьбе против наследственных болезней, для создания новых микроорганизмов - продуцентов биологически активных веществ, синтеза растительных и животных белков и др.

Генетическая инженерия развивается стремительно и уже располагает достаточными средствами и методами воздействия на наследственные заболевания. Генетики США пытаются заставить расти и размножаться клетки, синтезирующие молекулы фактора роста некроза опухолей (TNF). В эксперименте мышам со злокачественной меланомой удалось пересадить клетки, продуцирующие избыток TNF. Большинство их затем выводится из организма вместе с разрушенными клетками опухоли. Это дало основание провести цикл генотерапии раковым больным.

Одновременно биотехнологическая компания из Калифорнии начала разработку фармацевтических препаратов, содержащих клетки, в которых дефектные гены замещены здоровыми. Такие универсальные донорские клетки готовы к пересадке больному. Другой биотехнологический препарат - сидераза разработан в Кембридже для терапии наследственной болезни Гоше, вызванной недостаточностью фермента глюкоцереброзидазы и сопровождающейся тяжелой анемией, артритом, ревматическими симптомами, увеличением печени и селезенки, постоянными отеками.

Ученым удалось вплотную приблизиться к генотерапии наследственной эмфиземы и муковисцидоза. Нормально работающий ген фермента альфа-1-антитрипсина,

блокирующего работу легочной протеазы, был встроен в аденовирус, которым инфицировали больных животных. Спустя неделю после имплантации существенно уменьшились отеки слизистой и легких. Поскольку модифицированный аденовирус, использованный для переноса нормальных генов, безопасен, появилась возможность применить его и для лечения людей.

Ощутимые результаты получены в генотерапии инсулинзависимого сахарного диабета - одного из самых распространенных наследственных заболеваний.

Большой интерес представляют два недавних открытия. Исследователи в Филадельфии обнаружили поломку гена, которая приводит к изменению структуры стенок аорты и ее аневризме. Этот дефект, вызванный заменой всего одной аминокислоты в молекуле коллагена, чреват катастрофическими последствиями. Только в США от аневризмы аорты умирает более 15 тысяч человек. Теперь, исследуя ДНК пациента, удастся обнаружить в ней неисправные гены и определить степень риска заболевания. Предполагается воссоздание ДНК с нормальными коллагеновыми генами и трансплатация их больному.

Второе открытие касается расшифровки механизмов, благодаря которым бактерии «узнают» антибиотики, вырабатывая устойчивость к лекарственным препаратам.

Например, в 80% случаев стафилококковая инфекция не поддается лечению пенициллином, благодаря тому, что бактерии умеют «присваивать» себе чужие гены устойчивости, создавая на поверхности клетки специальные рецепторы. Они - то и служат «замком» для лекарств. К таким бактериям со старым ключом - антибиотиком уже не подберешься. Дальнейшие исследования, связанные с расшифровкой этого механизма, позволят изменить молекулы антибиотиков согласно новым бактериальным рецепторам. С помощью молекулярной биологии и биотехнологии появилась возможность лечить наследственное заболевание - кистозный фиброз (частота 1 на 2-3 тысячи родившихся детей). Происходит это в результате мутации гена, кодирующего так называемый ХЛОРНЫЙ КАНАЛ - белок клеточной оболочки, регулирующий выведение ионов хлора из клетки слизистой легких, дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Мутация, приводящая к развитию кистозного фиброза - рецессивная. Если же ребенок гетерозиготен по гену кистозного фиброза, то такая комбинация генов защищает людей от холеры. Рецессивные гомозиготы погибают от этого заболевания.

Человеку, страдающему этим заболеванием, введен генетически сконструированный аденовирус (вызывает состояние гриппа), в геном которого добавлен нормальный ген белка хлорного канала. У трех больных, которым была проведена такая генетическая терапия, слизистой носоглотки, удалось добиться реверсии мутантного фенотипа, т.е. клетки «выздоровели». Однако, для полного извлечения необходимо вводить большие

дозы аденовируса, что вызывает воспаление по типу гриппа.

Врачи используют для введения генетического материала не в вирус, а в безобидные липосферы, состоящие из жировых капель, которые легко проникают сквозь клеточную оболочку.

Пытаются лечить больных кистозным фиброзом, «впрыскивая» аденовирусы в виде ингаляций, доставляя нормальный ген непосредственно в легкие,

При помощи разрабатываемых сейчас «антисмысловых» веществ, возможно, удастся заблокировать экспрессию определенных генов, поскольку многие заболевания обусловлены именно неправильной генной экспрессией (рак, врожденные и некоторые инфекционные болезни).

Антисмысловые соединения - это короткие одноцепочечные молекулы ДНК, которые могут связываться с клеточными нуклеиновыми комплексами за счет того же механизма попарного взаимодействия комплементарных азотистых оснований (по типу застёжки «молнии»), что и две цепи природной ДНК. Мишенью антисмысловых молекул обычно является матричная РНК (мРНК), переносящая информацию от генов к аппарату синтеза белков.

Хотя в качестве антисмыслового агента можно использовать природную ДНК, коммерческий интерес привлекают ее синтетические аналоги, в которых сахарофосфатный «скелет» молекулы замещен структурой, более устойчивой к действию агрессивных ферментов, которые могли бы разрушить лекарство. При изучении таких структур наиболее перспективными оказались два типа -метилфосфонатный и фосфортионатный.

Метилфосфонатный препарат против ХМЛ уже испытывается на клетках людей, страдающих этим заболеванием. На первых порах препарат будет использоваться в сочетании с аутотрансплантатами костного мозга. Костномозговые клетки, взятые у специально отобранных больных ХМЛ, пройдут обработку антисмысловым агентом, чтобы исключить лейкозные клетки. Тем временем больного подвергнут химио- и лучевой терапии, чтобы уничтожить в организме все злокачественные клетки (при этом костный мозг выходит из строя). Затем ему пересадят его собственные здоровые клетки, размноженные в культуре.

Новые методы позволяют следить за числом здоровых и лейкозных клеток в культуре во время обработки.

Прежде чем антисмысловые соединения станут эффективными лекарственными препаратами, придется преодолеть трудности, в частности, иммунные реакции организма. Иммунный ответ чреват заболеванием красной волчанкой.

Многие фирмы сейчас работают над совершенно новыми классами антисмысловых соединений, в которых модифицирован не только «скелет», но и углеводные компоненты ДНК.