

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе

Протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

И.В.ДАРМОВ

ГЕНЕТИКА

Модуль 1 дисциплины

«ГЕНЕТИКА И ТЕОРИЯ ЭВОЛЮЦИИ»

Курс лекций

Киров

2011

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки.

Рецензент

доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВПО «ВятГУ»,

кандидат биологических наук

О. Н. Шуплецова

Дармов, И. В.

Генетика. Курс лекций: учебно-методическое пособие / И.В.Дармов (составитель). – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 191 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки (уровень бакалавриата). В курсе лекций представлены теоретические материалы, необходимые для подготовки студентов по дисциплине «Генетика и теория эволюции»; модуль 1 «Генетика».

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение в курс генетики. Наследственная информация и её реализация в клетке	8
1. Предмет генетики	
2. Место генетики среди биологических наук	
3. Генетическая информация. Матричный принцип	
4. ДНК как носитель генетической информации	
5. Репликация ДНК	
2. Наследственная информация и её реализация в клетке (продолжение)	14
1. Генетический код	
2. Транскрипция	
3. Особенности строения и созревания и-РНК	
4. Биосинтез белка	
5. Регуляция транскрипции	
3. Хромосомный уровень организации генетического материала	21
1. Морфология хромосом эукариот	
2. Кариотип, идиограмма, дифференциальная окраска хромосом	
3. Химический состав хромосом	
4. Структурная организация хроматина	
5. Организация генетического материала в прокариотической клетке	
4. Менделизм	27
1. Генетические эксперименты Менделя. Гибридологический метод	
2. Моногибридное скрещивание. Первый и второй законы Менделя	
3. Возвратное и анализирующее скрещивания	
4. Взаимодействие аллельных генов	
5. Дигибридное скрещивание. Третий закон Менделя	
6. Источники случайности в генетических процессах	
7. Неслучайные отклонения от ожидаемого расщепления	
8. Типы межallelного взаимодействия генов	
9. Особенности наследования количественных признаков	

5. Морганизм	39
1. Сцепленное наследование генов	
2. Генетическое доказательство перекреста хромосом	
3. Цитологические доказательства перекреста хромосом	
4. Хромосомная теория наследственности	
5. Особенности протекания и варианты кроссинговера	
6. Факторы, влияющие на кроссинговер	
6. Генетика определения пола	47
1. Определение пола, первичные и вторичные половые признаки	
2. Хромосомная теория определения пола	
3. Балансовая теория определения пола	
4. Роль условий среды в половой детерминации	
5. Соотношение полов и его регуляция	
6. Молекулярно-генетические механизмы половой детерминации и компенсации дозы генов	
7. Нехромосомное (цитоплазматическое) наследование	57
1. Основные закономерности и примеры цитоплазматического наследования у эукариот	
2. Геном митохондрий	
3. Геном хлоропластов	
8. Основные закономерности изменчивости	64
1. Классификация типов изменчивости	
2. Мутационная теория де Фриза	
3. Множественный аллелизм	
4. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова	
5. Классификация мутаций	
6. Плейотропный эффект мутаций	
7. Экспрессивность и пенетрантность мутаций	
8. Условные мутации	
9. Методы учета мутаций	
10. Спонтанные и индуцированные мутации	
11. Генные мутации	
12. Модификации и их свойства	

9. Хромосомные перестройки и геномные мутации.....	83
1. Инверсии	
2. Транслокации	
3. Делеции	
4. Дупликации	
5. Механизмы возникновения перестроек и их значение	
6. Типы геномных мутаций и их причины. Полиплоидия	
7. Автополиплоидия	
8. Аллополиплоидия	
9. Анеуплоидия	
10. Гаплоидия	
10. Молекулярные механизмы мутагенеза и репарации ДНК.....	97
1. Механизмы точковых мутаций	
2. Экспансия тринуклеотидных повторов	
3. Прямая коррекция мутационных повреждений	
3.1. Репарация ДНК-полимеразой	
3.2. Световая репарация	
3.3. Репарация алкилирующих повреждений	
3.4. Репарация лигазой	
4. Эксцизионная репарация	
4.1. Темновая репарация	
4.2. Репарация неспаренных оснований	
4.3. Пострепликативная репарация	
4.4. SOS – репарация	
11. Природа гена.....	106
1. Развитие представлений о гене	
2. Аллелизм и критерии аллелизма	
3. Тонкая структура гена. Ступенчатый аллелизм, псевдоаллелизм.	
4. Современное определение гена	
5. Оперонный принцип организации генов у прокариот	
12. Строение гена на молекулярном уровне.....	114
1. Регуляторная часть гена	
1.1. Промоторы	
1.2. Эnhансеры	
1.3. Инсуляторы	

2. Структурная часть гена	
2.1. Интроны и экзоны	
2.2. Альтернативный сплайсинг	
3. Терминаторы транскрипции	
4. Псевдогены	
5. Кластерная организация генов в хромосомах эукариот	
13. Организация генома. Геномика	124
1. Геномика	
2. Уникальные и повторяющиеся последовательности эукариот	
3. Мобильные элементы генома	
3.1. Открытие и классификация мобильных элементов	
3.2. Мобильные элементы дрозофилы	
3.3. Ту-элементы дрожжей	
3.4. Транспозоны млекопитающих	
3.5. Значение мобильных элементов	
14. Генетика развития	133
1. Роль клеточного ядра в развитии	
2. Доказательства тотипотентности генома	
3. Детерминация	
4. Генетика раннего эмбрионального развития дрозофилы	
15. Методы изучения генетики человека	141
1. Человек как объект генетических исследований	
2. Генеалогический метод	
3. Близнецовый метод	
4. Популяционно – статистический метод	
5. Цитогенетический метод. Классификации хромосом	
6. Биохимический метод	
7. Биологическое и математическое моделирование	
8. Дерматоглифика и пальмаскопия	
16. Наследственные болезни человека	150
1. Роль наследственности и среды в развитии патологии	
2. Хромосомные болезни	
3. Генные, или менделевские болезни	

- 3.1 Энзимопатии
 - 3.1.1 Нарушения аминокислотного обмена
 - 3.1.2 Нарушения обмена углеводов
 - 3.1.3 Нарушения липидного обмена
 - 3.1.4 Нарушения свертывающей системы крови
- 3.2 Гемоглобинопатии
- 3.3 Коллагеновые болезни
- 3.4 Системные нарушения развития органов и тканей
- 4. Мультифакториальные заболевания
- 5. Болезни с нетрадиционным типом наследования

17. Генетика рака. Диагностика, профилактика и лечение наследственных болезней.....165

- 1. Генетика рака
 - 2.1 Признаки злокачественных опухолей
 - 2.2 Причины возникновения опухолей
 - 2.3 Онкогены
 - 2.4 Онкосупрессоры
- 2. Диагностика наследственных болезней
- 3. Медико-генетическое консультирование
- 4. Принципы лечения наследственных заболеваний
- 5. Генотерапия

18. Генетические основы селекции.....178

- 1. Селекция как процесс и как наука
- 2. Центры происхождения культурных растений и одомашнивания животных
- 3. Классификация типов скрещивания
- 4. Родственное скрещивание (инбридинг)
- 5. Неродственное скрещивание (аутбридинг)
- 6. Отдаленная гибридизация
- 7. Гетерозис
- 8. Искусственный отбор
 - 8.1 Массовый отбор
 - 8.2 Индивидуальный отбор
 - 8.3 Комбинаторная селекция
- 9. Современные методы селекции

Список использованных источников.....191

Лекция № 1

Тема лекции: Введение в курс генетики. Наследственная информация и её реализация в клетке

План лекции:

1. Предмет генетики
2. Место генетики среди биологических наук
3. Генетическая информация. Матричный принцип
4. ДНК как носитель генетической информации
5. Репликация ДНК

1. Предмет генетики

Генетика – наука о наследственности и изменчивости (англ. *genetics*; автор термина – Уильям Бэтсон, 1906).

Наследственность – способность организмов передавать свои признаки неизменными от поколения к поколению. Проявляется *на всех уровнях организации живой материи* (молекулярном, клеточном, популяционном и т. д.).

Изменчивость – способность организмов приобретать изменения в ходе индивидуального развития, а также существовать в различных формах (вариантах). Также проявляется на всех уровнях организации живой материи.

2. Место генетики среди биологических наук

Генетика является **теоретической основой** современной биологии. Она объединяет разрозненные области биологической науки, дает ключ к пониманию сущности жизненных форм и явлений.

Вместе с тем, генетика с ее отраслью **селекцией** давно уже стала **производительной силой**. Она позволяет с использованием чисто научных (наукоемких) методов (приемов) создавать новые ценные сорта, породы, штаммы, а в последнее время, с появлением генной инженерии и геномики, генетика придала человеку поистине неограниченные возможности в создании организмов с *заданными свойствами*.

3. Генетическая информация. Матричный принцип

Белки являются *основой видовой и индивидуальной специфичности*.

В клетке – огромное количество белков, выполняющих различные функции. От *структуры белков* зависят практически все признаки клеток и организмов, даже те, которые непосредственно **не связаны** с белками.

Пример: Цвет глаз зависит от наличия белка – фермента, который синтезирует пигмент радужной оболочки.

Матричный принцип образования биомолекул

Каждый белок в организме синтезируется (тиражируется) с одного и того же *шаблона (матрицы)*. Роль такой матрицы играет молекула *и* – **РНК**, а для неё матрица – **ДНК**. В данном случае уместна аналогия с типографией или фотографией (оригинал – негатив – позитив).

В ДНК заключена вся информация о структуре и функции всех белков, а значит, обо всех признаках каждой клетки и организма в целом. Эта информация, заключенная в ДНК, называется *генетической*, или наследственной (т. к. она передаётся по наследству).

Матричный принцип впервые сформулировал и обосновал **Николай Константинович Кольцов** в 1928...1935 гг.

4. ДНК как носитель генетической информации

Нуклеиновые кислоты открыл в 1869 г. швейцарский врач **Фридрих Мишер** (1844 – 1895 гг.). Из распавшихся клеток *гноя* путем экстракции соляной кислотой он выделил вещество, содержащее фосфор и азот, которое назвал *нуклеином* (лат. *nucleus* – ядро), т. к. считал, что оно содержится только в ядре клетки. Он выделил нуклеин также из другого, ещё более удобного объекта – *молока лосося*.

Затем было установлено, что нуклеиновые кислоты бывают 2^х видов: «животная» и «растительная». Позднее первая из них была названа **ДНК**, а вторая – **РНК**, и было показано, что оба эти вещества содержатся как в животных, так и в растительных клетках. ДНК чаще всего выделяли из *тимуса (зобная железа) телёнка*, РНК – из *дрожжей* или *зародышей пшеницы*.

Краткие сведения о структуре ДНК

1. Мономером является **нуклеотид**, который состоит из **нуклеозида** и **остатка фосфорной кислоты**. Нуклеозид, в свою очередь, состоит из **азотистого основания** и сахара (**дезоксирибозы**, которая относится к пентозам).

Азотистые основания:

Пурины: аденин и гуанин (в молекуле 2 гетероцикла: 6- и 5- членные).

Пиримидины: тимин, цитозин и урацил (в молекуле одно 6 – членное кольцо).

В 1949 – 1951 гг. группа американских ученых под руководством **Эдвина Чаргаффа** установила важные закономерности химического состава ДНК, которые были названы **правилами Чаргаффа**:

- 1) Содержание пуринов (А+Г) = содержанию пиримидинов (Т+Ц).
- 2) Содержание А = содержанию Т.
- 3) Содержание Г = содержанию Ц.

2. Нуклеотиды образуют **полинуклеотидные цепи**: углеродный атом в 5' – положении дезоксирибозы одного нуклеотида через остаток ортофосфорной кислоты соединяется с углеродным атомом в 3' – положении соседнего нуклеотида. Число полинуклеотидных цепей равно двум. **Антипараллельность** – противоположная ориентация двух цепей.

3. Каждая цепь образует **спираль** по 10 пар оснований в каждом витке; длина одного витка – 3,4 нм. Диаметр спирали – 1,7 нм.

4. Цепи закручены одна вокруг другой, и обе вместе - вокруг общей оси. Такая спираль называется **плектономически закрученной**, т. е. её компоненты нельзя разделить без раскручивания. Спираль имеет одну **мелкую бороздку** (шириной 12 А) и одну **глубокую** (шириной 22 А).

5. Молекулы сахара и фосфатные группировки находятся снаружи спирали (это – **сахаро – фосфатный остов**), а основания – внутри, где они расположены с интервалом 0,34 нм под прямым углом к оси молекулы.

6. Цепи удерживаются вместе водородными связями между основаниями (2 связи между А и Т, 3 – между Г и Ц).

7. Пары, образуемые основаниями, всегда специфичны (А соответствует Т, а Т – А и Г соответствует Ц, а Ц – Г); т. е. основания и цепи **комплементарны** друг другу (принцип дополнения: если известна последовательность одной цепи, то легко предсказать последовательность другой).

8. Последовательности нуклеотидов – это и есть та информация, которая определяет структуру белков и их уникальность.

9. Существуют **5 форм ДНК**:

- **В – форма**, правозакрученная (при движении вдоль оси вверх спирали поворачиваются вправо); основное состояние ДНК в кристаллах и растворе;

- **А – форма**, правозакрученная, более плотно упакованная, чем В – форма; ДНК переходит в эту форму при транскрипции, в месте контакта с РНК-полимеразой;

- **Z – форма** – левозакрученная; образуется в плаزمиде при суперспирализации и в междисках политенных хромосом дрозофилы;

- **C – форма** – правозакрученная, по степени растянутости промежуточная между А и В; существует при пониженной концентрации Na и влажности 44-66 %;

- **D – форма** – правозакрученная, закручена сильнее, чем В-ДНК и имеет глубокий малый желоб (удобную полость для воды и ионов); встречается только в АТ-богатых участках фага Т2.

Пространственную структуру ДНК расшифровали в 1953 г.:

Джеймс **Уотсон** (р. 1928 г.) – американский биохимик,

Френсис **Крик** (р. 1916 г.) – английский физик,

Морис **Уилкинс** (р. 1916 г.) – английский физик (рентгеноструктурный анализ ДНК).

Они предложили пространственную модель ДНК в виде **двойной спирали**, за что в 1962 г. стали лауреатами Нобелевской премии.

5. Репликация ДНК

Репликация – процесс удвоения молекул ДНК. Он основан на следующих принципах:

1. **Комплементарность** – каждая дочерняя нить образуется по матрице, которой служит материнская нить.

2. **Полуконсервативность** – в каждой дочерней двойной спирали одна нить старая, т. е. половина материнской молекулы «**законсервирована**» в дочерней. Возможными моделями были также **консервативная** и **дисперсионная** (из фрагментов). В 1958 г. М. Мезелсон, Ф. Сталь и Д. Виноград доказали существование **полуконсервативного** механизма на основании опытов центрифугирования ДНК *E. coli*, меченной изотопами ^{15}N и ^{14}N , в градиенте концентрации Cs Cl.

3. **Антипараллельность**. Две комплементарные нити синтезируются в противоположных направлениях. **ДНК – полимеразы III**, которая осуществляет синтез новой цепи, движется по материнской нити только от 3' – конца к 5' – концу, т. е. синтез двух новых цепей идет в **противоположных направлениях**. Новая же нить наращивается всегда от 5' – к 3' – концу.

4. **Прерывистость**. Двойная спираль должна быть раскручена, чтобы сработала ДНК – полимеразы, но вся огромная хромосома не может быть раскручена из одной точки, т.к. временные и энергетические затраты были бы слишком велики. Поэтому раскручивание и репликация начинается одновременно в нескольких местах, которые называются **точками начала репликации (origin)**. На самом деле это не точки, а участки ДНК протяженностью 300 п. н., узнаваемые специфическими белками. Двойная цепь ДНК, начиная от локуса **ori**, разделяется на 2 цепи под действием фермента **ДНК – геликазы** (рвёт водородные связи). Процесс идет в двух противоположных направлениях с образованием двух **репликационных вилок** (между ними – **репликационный глазок**).

Образующиеся одинарные цепи стабилизируются *SSB - белками*, связывающими однонитевую ДНК (от англ. single – strand DNA – binding proteins), которые «сажаются» на остовы цепей. Тетрамер этого белка связывается с участком ДНК протяженностью 32 нуклеотида. Более 200 молекул белка присутствует в каждой репликационной вилке.

Расхождение спирально закрученных цепей родительской ДНК обуславливает образование *суперспиралей (супервитков)* перед репликационной вилкой, это вызывает *напряжение* в молекуле ДНК и должно было бы приводить к скорой остановке процесса. Однако этого не происходит благодаря действию фермента *ДНК – гиразы* (относится к классу ДНК – топоизомераз). Он разрывает одну из цепей родительской ДНК, связываясь с ней ковалентно; далее происходит вращение обрывка этой цепи вокруг неразорванной второй цепи и снятие напряжения. После этого происходит отсоединение ДНК – гиразы и восстановление фосфодиэфирной связи разорванной цепи.

Синтез дочерних цепей ДНК осуществляет фермент *ДНК – полимераза III*; мономерами являются *дезоксирибонуклеозидтрифосфаты* (дНТФ), которые связываются друг с другом ковалентно и отдаются в раствор (точнее, в кариоплазму) *пирофосфат*.

Однако ДНК – полимераза не может начинать синтез путем соединения двух первых нуклеотидов; она лишь может пришивать очередной дНТФ к 3' – ОН – концу уже имеющейся дочерней цепочки определенной длины, т. е. нужна некая *«затравка»*. Поэтому репликационная вилка является асимметричной: из двух синтезируемых цепей одна (*«лидирующая»*) строится непрерывно, ее синтез идет быстрее, затравкой служит 3' – конец другой материнской цепи в точке начала репликации.

Другая цепь называется *запаздывающей*, или *отстающей*, т. к. она растет путем сборки из отдельных фрагментов, которые называются *фрагментами Оказаки*; их длина:

1000...2000 нуклеотидов у прокариот и

100...200 нуклеотидов у эукариот.

Фрагменты Оказаки синтезируются в «разрешенном» направлении (от 5' – к 3' – концу), но с участием *РНК – затравок*, или *праймеров*. Роль затравок выполняют короткие последовательности РНК (около 10 рибонуклеотидов), образующиеся на матричной цепи ДНК с помощью *РНК – праймазы*. Праймаза связывается с ДНК – геликазой и ДНК, образуя некий комплекс – *праймому*, и синтезирует на отстающей цепи РНК – затравку. Эта затравка удлиняется за счет действия *ДНК – полимеразы I*, которая затем отделяется от ДНК.

После этого **ДНК – полимераза III** удаляет РНК – затравку и одновременно заполняет бреши ДНК - нуклеотидами. После замены всех нуклеотидов РНК на нуклеотиды ДНК остается разрыв между соседними фрагментами Оказаки, который «сшивается» **ДНК – лигазой**. Интересно, что отстающая цепь изгибается так, что ее ДНК – полимераза III образует комплекс с ДНК – полимеразой лидирующей цепи («**модель тромбона**»). Весь этот сложно организованный комплекс цепей нуклеиновых кислот и ферментов называют **репликационной машиной**, или **реплисомой**.

Скорость репликации:

~1000 нуклеотидов в секунду у прокариот,

~100 нуклеотидов в секунду у эукариот.

Участок ДНК между точкой начала репликации (**ori**) и точкой ее окончания (сайт терминации, **ter**) называется **репликоном**. Для терминации необходим специальный белок (продукт гена **tus**), который узнает последовательности **ter** и предотвращает дальнейшее продвижение вилки репликации.

У бактерий хромосома представляет собой один репликон, в эукариотической хромосоме имеются десятки репликонов.

В бактериальной клетке процесс синтеза ДНК ведут 15 разных ферментов, в эукариотической клетке их еще больше. Сложность и координированность процессов репликации ДНК обеспечивают точность воспроизведения генетической информации.

Исследовал механизмы репликации американский биохимик **Артур Корнберг** (р. 1918 г.), который в 1957 г. обнаружил у *E.coli* фермент ДНК–полимеразу I. Получил Нобелевскую премию в 1959 г. за открытие механизма биосинтеза ДНК.

Лекция № 2

Тема лекции: Наследственная информация и её реализация в клетке (продолжение)

План лекции:

1. Генетический код
2. Транскрипция
3. Особенности строения и созревания и-РНК
4. Биосинтез белка
5. Регуляция транскрипции и трансляции

1. Генетический код

В клетке передача генетической информации осуществляется в следующем направлении: *ДНК* → *и-РНК* → *белок* (это *центральная догма* молекулярной биологии, предложенная Френсисом Криком в 1958 г.)

Каким же образом происходит перевод информации с «языка» нуклеотидов (их 4) на «язык» аминокислот (их 20), из которых построены белки?

Для этого служит *генетический код* – система записи информации о последовательности аминокислот в белках с помощью последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах.

Свойства генетического кода:

1. *Код триплетен.* Каждая аминокислота из 20 зашифрована последовательностью из трёх нуклеотидов, которая называется *триплет*, или *кодон* (т. е. это слово из трех букв, а букв всего четыре).

Если бы слова состояли *из одной буквы*, то можно было бы зашифровать всего четыре аминокислоты (4^1);

если *из двух букв*, - то получается $4^2 = 16$ аминокислот, т. е. этого недостаточно.

Поэтому кодоны и состоят *из трех букв*, что обеспечивает возможность зашифровать $4^3 = 64$ аминокислоты, а их всего 20. Получается, теоретически, что 44 комбинации – лишние, однако в реальности им тоже нашлось применение. В начале 50-х гг. предположение о триплетности кода высказал математик **Георгий Гамов**.

2. *Код вырожден (избыточен).* Каждая аминокислота шифруется более чем одним кодоном (от двух до шести). Исключение составляют 2 аминокислоты: метионин (*АУГ*) и триптофан (*УГГ*), каждая из них кодируется только одним триплетом. В этом есть особый смысл.

3. *Код однозначен.* Каждый кодон шифрует только определенную аминокислоту. Этим обеспечивается строгая воспроизводимость генетической

информации, напротив – замена хотя бы одной буквы (мутация) может привести к тяжелому заболеванию.

4. **Непрерывность**: считывание происходит непрерывно, триплет за триплетом, без пропусков. Имеются особые сигналы окончания трансляции: **стоп – кодоны** (УАА, УАГ, УГА).

5. **Неперекрываемость**: соседние триплеты не перекрываются; каждый нуклеотид входит в состав только одного триплета.

6. **Код универсален** почти для всех живущих на Земле организмов!!!

Расшифровали генетический код в 1961 г. **Р. Холли, Х. Корана и М. Ниренберг** (Нобелевская премия в 1968 г.).

2. Транскрипция

ДНК находится в ядре. Сборка белков происходит на рибосомах, которые находятся в цитоплазме и на мембране шероховатой эндоплазматической сети (ЭПС).

Как передается информация от ДНК на рибосому? – Для этого в клетке существует специальный посредник, или посланник (от англ. *messenger*) – **информационная РНК (и – РНК)**. Информация переписывается с ДНК на и – РНК, которая затем проникает через поры ядерной мембраны и по каналам ЭПС достигает рибосом.

Процесс переписывания генетической информации с ДНК на и – РНК называется **транскрипцией** (от лат. *transcriptio* – переписывание). Осуществляет транскрипцию фермент **РНК – полимераза**. У прокариот это один фермент, включающий субъединицы 2α , β , β' и σ .

У эукариот имеются уже 3 фермента: **РНК – полимераза I**, которая осуществляет синтез крупных **рибосомальных РНК (рРНК)** в ядрышке; **РНК – полимераза II**, отвечающая за синтез **и-РНК**, а также **РНК – полимераза III**, которая находится в ядерном соке и отвечает за синтез малых **рРНК** и **транспортных РНК (тРНК)**.

И-РНК – **однонитевая молекула**. Синтез и – РНК также подчиняется принципу **комплементарности**, как и в случае репликации ДНК, только вместо **тимина** в РНК входит **урацил**. Длина и – РНК в сотни раз меньше длины ДНК.

Транскрипция состоит из 3-х стадий:

1. **Инициация** (начало синтеза) – РНК-полимераза узнает **промотор** (участок ДНК, имеющий сродство к данному ферменту; это «посадочная площадка» для него). Матрицей для синтеза и – РНК может служить лишь одна из цепей ДНК, которая называется **матричной**, другая цепь называется **кодогенной**. РНК – полимераза «садится» на матричную цепь, раскручивает

ближайший виток спирали ДНК и «ползет» по ней в направлении от 3' – к 5' – концу. Образующаяся цепь РНК наращивается от 5' – к 3' – концу.

Первым нуклеотидом в и – РНК всегда является *пуриновый*: аденин или, редко, гуанин, т. к. *стартовыми кодонами* служат АУГ или ГУГ.

2. *Элонгация* (удлинение цепи). Скорость элонгации у прокариот – 14 кодонов в секунду (при температуре 37 °С). При этом скорость *трансляции* почти такая же, т. е. 15 аминокислот в секунду.

3. *Терминация* – обрыв цепи. *Терминатор транскрипции* – специфичная последовательность ДНК, которую узнает РНК - полимеразы и отделяется как от ДНК, так и от РНК. В *прокариотических клетках* терминаторы обязательно содержат *палиндромы* (инвертированные повторы). При синтезе комплементарной им последовательности рибонуклеотидов в и-РНК последняя образует *шпильку* за счет спаривания повторяющихся последовательностей. Шпилька служит для РНК – полимеразы сигналом терминации. Кроме того, за палиндромом располагаются области ДНК, богатые А – Т парами. Образующаяся поли –У– цепочка РНК слабо взаимодействует с такой матричной цепью и легко обрывается. У *эукариот* палиндромы в области терминации не выявлены, но А – Т – участки тоже есть.

3. Особенности строения и созревания и-РНК

И-РНК у эукариот *моноцистронная*, т. е. кодирует синтез одного полипептида (как правило), а у прокариот – *полицистронная*, т. е. определяет синтез сразу нескольких пептидов, например, это – каскад ферментов.

В молекуле и-РНК как прокариот, так и эукариот имеются *кодирующие участки* и *дополнительные* последовательности. Перед *стартовым кодоном* (АУГ или ГУГ) на 5' – конце это – *лидерный участок*. На 3' – конце после *стоп – кодона* расположен *трейлер*. Функция *лидерных* участков – связывание и-РНК с *рибосомой* (через комплементарное взаимодействие с рРНК), а функция *трейлеров* – повышение *стабильности* молекулы и-РНК.

В *полицистронной* РНК прокариот между кодирующими участками имеются небольшие *межцистронные* области. Эти и – РНК сразу после синтеза готовы к трансляции и находятся в цитоплазме.

В отличие от них, молекулы и – РНК *эукариот* прерывисты и содержат *экзоны* (кодирующие участки) и *интроны* (некодирующие).

Сразу после синтеза *первичные транскрипты* молекулы и – РНК крупные, незрелые, они образуют *гетерогенную ядерную РНК (гя РНК)*, которая долго ждет своего часа. Перед выходом из ядра она подвергается *созреванию*, или *процессингу*, в ходе которого происходит *модификация* кон-

цевых участков первичного транскрипта и *сплайсинг*. Удаление интронов с последующим соединением экзонов называется *сплайсингом*.

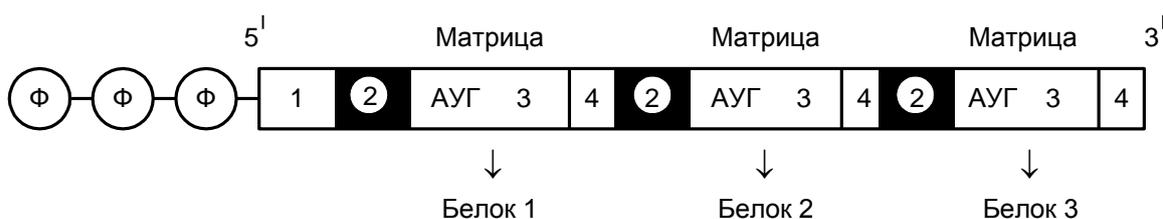


Рис. 1 – Полицистронная матричная РНК прокариот: 1 – лидерный участок, 2 – межцистронные области, 3 – кодирующие области, 4 – трейлер

Модифицирование первичного транскрипта эукариот включает образование *колпачка* – *кэпа*, который блокирует 5'-конец и-РНК путем присоединения к его первому нуклеотиду трифосфонуклеозида, содержащего гуанин, связью 5' – 5'. В результате образуется последовательность, в которой остаток гуанина находится в обратной ориентации по отношению к другим нуклеотидам и-РНК. Модификация 5'-конца и-РНК предполагает также *метилование* присоединенного гуанина и первых двух – трех оснований первичного транскрипта. Кэпы обеспечивают узнавание молекул и-РНК малыми субъединицами рибосом.

После завершения транскрипции происходит удаление части нуклеотидов на 3'-конце первичного транскрипта и присоединение к нему последовательности, состоящей из 100-200 остатков адениловой кислоты (*полиА*).

После выхода и-РНК в цитоплазму ее полиА-последовательность постепенно укорачивается под действием ферментов, отщепляющих нуклеотиды на 3'-конце. Возможно, добавление полиА-последовательности в ходе процессинга повышает стабильность и-РНК.

Кроме метилирования в области кэпа в молекуле и-РНК высших эукариот происходит метилирование небольшой части внутренних нуклеотидов с частотой приблизительно одно на тысячу оснований и-РНК.

Созревание и-РНК у эукариот предполагает также удаление из первичных транскриптов интронов, т. е. *сплайсинг*. Размер интронных участков варьирует от 100 до 10000 нуклеотидов. На долю интронов приходится около 80% всей гяРНК.

В настоящее время описано несколько *механизмов сплайсинга*. Точность этого процесса достигается действием ферментов, узнающих концевые участки интронов и катализирующих разрыв фосфодиэфирных связей на границе экзон – интрон, а затем образование связей между двумя экзонами.

Установлено активное участие в сплайсинге особых, *малых ядерных РНК (мяРНК)*, образующих *комплексы с протеинами (мяРПП)*. Очевидно,

мяРНК своими нуклеотидными последовательностями комплементарно взаимодействуют с концевыми участками интронов, которые образуют при этом *замкнутые петли*. Расщепление РНК в устье интронной петли приводит к удалению неинформативной последовательности и соединению (сплайсингу) сближенных концов экзонов.

Возможно также, что РНК-транскрипт обладает *автокаталитической* способностью к сплайсингу.

Благодаря преобразованиям в ходе процессинга, зрелые и-РНК эукариот характеризуются *большой стабильностью* по сравнению с прокариотическими и-РНК, что крайне необходимо для их сохранности в течение длительного времени.

По завершении процессинга в цитоплазму попадает всего 5% гяРНК. Остальная часть расщепляется, не покидая ядра.

4. Биосинтез белка (трансляция)

Трансляция (лат. *translatio* – перевод) – синтез полипептидов по матрице и – РНК, который осуществляется на рибосомах.

Аминокислоты доставляются к рибосомам с помощью **транспортных РНК** (**т – РНК**). Они состоят из 75 ÷ 95 нуклеотидов, напоминают из – за наличия шпилек *лист клевера*. На вершине листа – **антикодон** – последовательность из 3^х нуклеотидов, комплементарная кодону и – РНК.

Вторичная структура т – РНК:

Акцепторный стебель: на 3' – конце – последовательность ЦЦА, к которой присоединяется «своя» аминокислота.

Четыре петли (за счет неспаренных нуклеотидов): нижняя – **антикодоновая** и две **боковые**, последние содержат **модифицированные** основания:

дигидроуридин (Д) → Д – петля,

псевдоуридин (Ψ) → пси – петля.

Между антикодоновой и псевдоуридиновой имеется небольшая **дополнительная** петля; количество нуклеотидов в ней варьирует от 3 до 21. Спаренные участки т – РНК **консервативны**.

Третичная структура т – РНК:

Две ветви располагаются перпендикулярно двум другим; антикодон и аминокислота максимально удалены друг от друга. Стабилизируется водородными связями.

В клетке должно быть 61 разных видов т – РНК, т. е. столько, сколько кодонов, кодирующих аминокислоты. На самом деле их не 61, а 40, т. к. в

первом положении антикодона имеется необычное основание **инозин**, которое образует водородные связи с любым из трех нуклеотидов (А, Ц, У), когда они находятся в третьем положении кодона. Т. е. одна т – РНК может узнавать несколько кодонов - «синонимов», поэтому их не 61, а меньше.

С другой стороны, есть также несколько т – РНК, которые соединяются с одним и тем же кодоном. Они идут в плюс.

Аминоацил – т – РНК – синтетазы (их около 20) – ферменты, узнающие т – РНК и присоединяющие к ней «свою» аминокислоту, на это тратится энергия одной молекулы АТФ. Образуется аминоацил – т – РНК.

Синтез полипептида на рибосоме идет в 3 стадии:

1. **Инициация:** Сначала информационная РНК «узнает» малую субъединицу рибосомы (в ее лидерной последовательности у 5' – конца есть сайт связывания с рибосомой). Происходит их связывание в специфичном участке р – РНК. Далее – доставка первой аминокислоты (формилметионина) в **пептидильный участок** малой субъединицы рибосомы. Происходит объединение большой и малой субъединиц.

2. **Элонгация:** вход в **аминоацильный участок** следующей аминоацил – т-РНК, образование пептидной связи, выход в цитоплазму свободной т-РНК, перемещение рибосомы по и-РНК на один кодон.

3. **Терминация** (обрыв цепи), когда в рибосому поступают терминирующие кодоны: УАА, УАГ, УГА. Вместо т-РНК в аминоацильный участок рибосомы должен войти белок – **фактор освобождения** (*releasing factor*). Происходит распад рибосомы.

Роль **заглавной буквы** в словах – полипептидах играет **формилметионин** – измененная форма метионина. Когда синтез пептидной цепочки заканчивается, формилметионин отщепляется от нее.

Для увеличения «производительности» синтеза белка по одной молекуле и – РНК могут «ползти» сразу несколько рибосом, такая структура называется **полисомой**. Многие белки рибосомы играют не только структурную роль, но и каталитическую: в первой стадии участвуют иницирующие белки, в последней – **рилизинг – фактор**; имеются белки, катализирующие образование пептидной связи.

5.Регуляция транскрипции

В каждой клетке реализуется не вся, а только часть генетической информации. Большая часть генов в каждый момент времени «молчит». Имеются сложные механизмы, регулирующие «включение» и «выключение» генов.

Разберем наиболее простой из них, который имеется у бактерий. Его открыли французские ученые: **Франсуа Жакоб, Жак Моно и Андре Львов**, которые были удостоены Нобелевской премии в 1965г. за открытие **оперона** – механизма генетической регуляции синтеза белка у бактерий.

Суть этого механизма: пока сахар (субстрат) не поступил в клетку, ферменты, расщепляющие его, не синтезируются.

Оперон включает: промотор, оператор, структурные гены.

Имеется также **ген – регулятор** (может находиться в другой области хромосомы). Он кодирует синтез белка – **репрессора**, который «садится» на операторный участок и мешает РНК – полимеразе осуществлять транскрипцию. Репрессор может быть активным сам по себе, а при соединении с низкомолекулярным веществом (например, субстратом) он становится неактивным. В этом случае, когда субстрат А (**индуктор**) попадает в клетку, он связывается с репрессором, изменяя его конформацию, и тот «сваливается» с операторного участка, «давая дорогу» РНК – полимеразе.

Перечисленный механизм относится к **негативной** регуляции транскрипции (**негативная репрессия**).

Может быть и обратная зависимость (**негативная индукция**): сам по себе репрессор неактивен, а при соединении с низкомолекулярным веществом, например, с конечным продуктом реакции, он активируется (триптофановый оперон).

У высших организмов регуляция транскрипции гораздо сложнее. Здесь действуют механизмы **позитивной** регуляции, когда транскрипция включается только при участии **активатора**, без него РНК – полимеразы не работает. В этом процессе участвуют особые белки – **специфические факторы транскрипции**, а также **гормоны**.

Каждый гормон через систему посредников активирует группу генов в своих клетках – мишенях и может действовать как на стадии транскрипции, так и на стадии трансляции.

У высших организмов, в отличие от бактерий, и – РНК образуются в ядре, подвергаются там действию различных ферментов, соединяются с различными белками и в виде таких комплексов (**«информосомы»**) выходят в цитоплазму. Трансляция у них поэтому может произойти не сразу (как у бактерий), а через некоторое время, например, когда поступит **гормональный сигнал** или белки, связанные с и-РНК, будут разрезаны пептидазами.

Познание сложных механизмов регуляции транскрипции и трансляции необходимо для освоения методов управления процессами реализации генетической информации.

Лекция № 3

Тема лекции: Хромосомный уровень организации генетического материала

План лекции:

1. Морфология хромосом эукариот
2. Кариотип, идиограмма, дифференциальная окраска хромосом
3. Химический состав хромосом
4. Структурная организация хроматина
5. Особенности генетического материала в прокариотической клетке

1. Морфология хромосом эукариот

Хромосомы – нуклеопротеиновые тела, в которых хранится, передается по наследству и реализуется наследственная информация.

История вопроса: профессор Санкт-Петербургского университета **И. Д. Чистяков** в 1874 г. описал ряд стадий митоза в спорах плаунов, т. е. впервые обнаружил хромосомы.

Э. Страсбургер, В. Флеминг - в 1875-1882 гг. описали митоз у растений и животных.

В. Вальдейер (W. Waldeyer) в 1888 г. предложил термин «хромосома» (окрашенное тело).

В. Ру (W. Roux) в 1883 г. описал продольное расщепление хромосом, т. е. образование **хроматид**.

В конце XIX в. **Август Вейсман** предположил, что вещество наследственности («зародышевая плазма») содержится в хромосомах.

1903 г. – **Теодор Бовери**, немецкий эмбриолог, и **У. Сэттон**, студент Колумбийского университета, работавший в лаборатории американского цитолога **Э. Уилсона**, на основании изучения поведения хромосом в половых клетках предположили, что гены должны располагаться в хромосомах.

1910 – 1930^е гг. – хромосомная теория **Т. Моргана** и его учеников.

Впервые индивидуальные различия хромосом выявил в 1910 – 1914 гг. русский ученый **Сергей Гаврилович Навашин** (1857 – 1930) в ходе изучения митоза в клетках растений.

В соответствии с его классификацией, выделяют 4 типа хромосом в зависимости от положения **центромеры** и относительной длины плеч:

- 1) **метацентрические** (равноплечие), или «U-образные»;
- 2) **субметацентрические** (умеренно неравноплечие);
- 3) **acroцентрические** (сильно неравноплечие);
- 4) **телоцентрические** (с одним плечом), или «палочковидные».

Хромосомы 2 и 3 типов С.Г. Навашин называл также «крючковидными».

Выделяют ещё **точковые** хромосомы, форму которых трудно определить из-за малого размера.

Центромера – первичная перетяжка – участок хромосомы, к которому прикрепляются нити веретена деления. С. Г. Навашин открыл также **спутники** – мельчайшие придатки, прикрепленные **вторичной перетяжкой** (это – ядрышковый организатор) к основному телу хромосомы (такие хромосомы называются **спутничными**).

По современным представлениям, идеально телоцентрических хромосом не бывает, центромера не может находиться на самом конце хромосомы. Обязательно должно быть хотя бы очень короткое плечо, содержащее **теломеру** (особая структура).

2. Кариотип, идиограмма, дифференциальная окраска хромосом

Понятие **кариотип** ввел Григорий Андреевич Левитский в 1924 г. Это диплоидный **набор хромосом** соматических клеток организмов данного вида, характеризующийся определенным числом, размерами, строением и генетическим составом.

Кариотип определяют с помощью световой микроскопии. Это понятие применимо по отношению к **диплоидным** клеткам, у которых имеются пары **гомологичных**, т.е. имеющих одинаковое строение хромосом. **Гаплоидные** клетки содержат лишь один набор хромосом. Латинской буквой **n** обозначают количество наборов хромосом в клетке (**плоидность**).

Генотип – это **генетическая конституция** организма, представляющая собой совокупность наследственной информации (генов!), заключенной в хромосомном наборе диплоидных клеток.

Диплоидное число хромосом (**2n**) у различных организмов варьирует в широких пределах:

Аскарида, малярийный плазмодий	-	2
Дрозофила	-	8
Рожь	-	14
Лук, крыжовник	-	16
Человек	-	46
Горилла, шимпанзе	-	48
Речной рак	-	196
Радиолярия	-	1600

Идиограмма – изображение (рисунок, фото) кариотипа, на котором хромосомы расположены попарно в порядке уменьшения их длины.

Существует некая «*критическая масса*» хромосом эукариот, меньше которой не бывает (все они, по крайней мере, должны быть видны в световой микроскоп!). Она необходима для нормального прохождения митоза и мейоза.

Дифференциальная окраска хромосом

Q – окраска (1968 г.) – флуоресцентный краситель *quinacrin* (акрихин – иприт), видны флуоресцирующие полосы.

G – окраска (1971 г.) – краситель *Романовского – Гимза*, видны темные полосы.

Есть еще **H -, R -, T -, C – окраска** и окраска по **Фёлгену**. С их помощью выявляются полосы на хромосомах, по которым их можно идентифицировать. Механизмы окраски разные, например, при Q - и H – окраске (краситель *Hoechst*) красители связываются с ДНК, богатой АТ – парами; при C – окраске (*constitutive* гетерохроматин) окрашиваются белки, специфичные для гетерохроматина.

В 1971 г. на генетической конференции в Париже была предложена **Парижская номенклатура** хромосом человека по результатам окраски G – способом. В соответствии с ней, плечи обозначаются: **p** – короткое, **q** – длинное; **G – сегменты** (полосы) хромосом обозначаются числом, где первая цифра обозначает район хромосомы (по направлению от центромеры – к теломере), а вторая – номер полосы (в том же направлении), например, **5p12**.

3. Химический состав хромосом

Белки составляют 65% массы хромосом. Известны две группы хромосомных белков: **гистоны** и **негистоновые** белки.

К **гистонам** относятся пять белков: H1, H2A, H2B, H3, H4. Являясь положительно заряженными основными белками, они достаточно прочно соединяются с молекулами ДНК, чем препятствуют считыванию заключенной в ней биологической информации. В этом состоит их **регуляторная роль**. Кроме того, эти белки выполняют **структурную функцию**, обеспечивая пространственную организацию ДНК в хромосомах.

Количество **негистоновых** белков – более 100. Среди них – ферменты репликации ДНК, синтеза и процессинга РНК. **Кислые белки** хромосом выполняют также структурную и регуляторную роль. Помимо ДНК и белков в составе хромосом обнаруживаются также РНК, липиды, полисахариды, ионы металлов (кальций).

РНК хромосом представляет собой в основном продукты транскрипции, еще не покинувшие место синтеза.

Массовые соотношения в хромосоме таковы:

ДНК: гистоны: негистоновые белки: РНК: липиды
относятся друг к другу по массе как:

1 : 1 : 0,2 : 0,1 : 0,01

Другие компоненты встречаются в незначительном количестве.

4. Структурная организация хроматина

Хромосомы в виде отдельных тел хорошо видны лишь во время митоза или мейоза. В промежутке между клеточными делениями, т. е. в *интерфазе*, наследственный материал клетки выявляется в виде *глыбок*, разбросанных по ядру. И глыбки, и хромосомы имеют общее название – *хроматин* – это окрашенное с помощью специальных красителей наследственное вещество ядра.

Хромосома представляет собой спирализованную нить. В вытянутом виде длина 1 хромосомы около 1 см, а длина компактной (метафазной) хромосомы ~ 1 мкм, т. е. общий коэффициент компактизации составляет 10^4 . Выделяют несколько уровней спирализации (компактизации) хроматина (см. табл.)

Таблица - Последовательные уровни компактизации хроматина

Уровень компактизации	Название структуры	Степень укорочения		Диаметр, нм
		по сравнению с предшествующей структурой	по сравнению с молекулой ДНК	
—	1. <i>ДНК</i>	1	1	1,7
Нуклеосомный	2. <i>Нуклеосомная нить</i>	7	7	11
Нуклеомерный	3. <i>Хроматиновая фибрилла</i> (соленоид, "супербусины", нуклеомеры)	6	42	30
Хромомерный	4. <i>Петлевой домен</i> (хромомеры, розетки)	15	600	100...400
Хромонемный	5. <i>Хромонема</i>	2...3	1600	700
Хроматидный	6. <i>Метафазная хромосома</i>	5	8000	500...600

Уровни компактизации хроматина:

1. **ДНК** – двуспиральная молекула ДНК диаметром 1,7 нм.

2. **Нуклеосомная нить**. Она формируется с помощью четырех видов гистонов: H2A, H2B, H3, H4, которые образуют белковые тела – **коры**, состоящие из восьми молекул (по две молекулы каждого вида гистонов). Кору напоминают по форме шайбу.

Молекула ДНК образует комплекс с белковыми корами, спирально накручиваясь на них. При этом в контакте с каждым кором оказывается участок ДНК, состоящий из 146 п. н. (два витка). Свободные от контакта с белковыми телами участки ДНК называют **связующими**, или **линкерными**. Они включают от 15 до 100 п. н. (в среднем 60 п. н.), в зависимости от типа клетки.

Отрезок молекулы ДНК длиной около 200 п. н. вместе с белковым кором составляет **нуклеосому**. Хромосома представляет собой цепочку таких повторяющихся единиц – нуклеосом. Как известно, геном человека состоит из $3 \cdot 10^9$ п. н.; нетрудно подсчитать, что это соответствует 15 миллионам нуклеосом. Нуклеосомная нить напоминает **цепочку бус**.

В результате такой укладки двойной спирали ДНК в нуклеосомную нить она приобретает диаметр 10...11 нм.

3. **Хроматиновая фибрилла**. На следующем уровне упаковки происходит ещё большее уплотнение нуклеосомной нити. **Гистон H1** соединяется с линкерной ДНК и двумя соседними белковыми телами и сближает их друг с другом. В результате образуется структура, которая похожа на **соленоид**.

Такая хроматиновая фибрилла имеет диаметр 20...30 нм.

4. **Петлевой домен**. Далее происходит укладка хроматиновой фибриллы в **петли** с участием **негистоновых белков**, которые узнают специфические последовательности ДНК, отдаленные друг от друга на расстояние в несколько десятков тысяч пар ($X = 60 \times 10^3$) нуклеотидов. Эти **негистоновые белки** сближают указанные участки, при этом образуется **петлевидная розетка**, где отдельные петли отходят от центрального плотного участка. Количество петель в розетке 15...80, диаметр структуры – до 400 т. п. н. Расположение петлевых доменов (хромомер) может быть неравномерным: участки тела митотической хромосомы, обогащенные ими, могут соответствовать полосам при дифференциальной окраске хромосомы.

5. **Хромонема**. Затем происходит еще большая конденсация ДНК, в результате чего хроматиновая фибрилла диаметром 20...30 нм преобразуется в толстую нить диаметром 100...200 нм, которая называется **хромонемой** и уже видна в световой микроскоп. Отдельные участки интерфазной хромонемы подвергается дальнейшей компактизации с образованием так называемых

структурных блоков. Они видны в интерфазном ядре в виде *глыбок хроматина*. Так формируется окончательная структура *интерфазной хромосомы*.

6. **Метафазная хромосома**. Когда клетка переходит из интерфазы в митоз, наблюдается *суперкомпактизация* хроматина. В профазе митоза становятся видны нити, а в метафазе и анафазе хорошо различимы отдельные хромосомы, состоящие из двух *хроматид*. Затем происходит *декомпактизация* вещества хромосом, и в телофазе они уже не видны. Биологический смысл суперкомпактизации заключается в обеспечении возможности точного распределения дочерних хромосом как компактных телец к полюсам клетки при митозе или мейозе.

Эухроматин и гетерохроматин

В зависимости от состояния хроматина выделяют *эухроматиновые* участки хромосом, отличающиеся меньшей плотностью упаковки и генетически активные, т. е. транскрибируемые, и *гетерохроматиновые* участки, - более компактные и генетически неактивные.

Различают *конститутивный* и *факультативный* гетерохроматин.

Конститутивный гетерохроматин содержится в околоцентромерных и теломерных участках всех хромосом, а также на протяжении некоторых внутренних фрагментов отдельных хромосом. Он образован только нетранскрибируемой ДНК. Его роль заключается в поддержании общей структуры ядра, прикреплении хроматина к ядерной оболочке, взаимном узнавании гомологичных хромосом в мейозе, разделении соседних структурных генов и др.

Пример *факультативного* гетерохроматина – половой хроматин, или *тельце Барра*, которое образуется в ядрах клеток здоровой женщины и представляет собой одну из двух X – хромосом в *суперкомпактном* состоянии. Гены этой хромосомы не транскрибируются. Другой пример – ядра зрелых эритроцитов птиц, где большая часть генетического материала находится в неактивном состоянии.

5. Организация генетического материала в прокариотической клетке

У прокариот основная часть генетического материала заключена в единственной кольцевой молекуле ДНК длиной около 1 мм (*E. coli*), причем у них не обнаружено гистонов, которые обеспечивают нуклеосомную организацию хроматина у эукариот. Но кольцевая молекула ДНК прокариот также уложена в виде *петель* за счет образования комплексов с некоторыми *негистоновыми основными белками*. Средняя длина одной петли около 40 тыс. п. н. Весь наследственный материал бактериальной клетки в виде компактной массы расположен в её центре и называется *нуклеоидом*.

Лекция № 4

Тема лекции: Менделизм

План лекции:

1. Генетические эксперименты Г. Менделя. Гибридологический метод
2. Моногибридное скрещивание. Первый и второй законы Менделя
3. Возвратное и анализирующее скрещивания
4. Взаимодействие аллельных генов
5. Дигибридное скрещивание. Третий закон Менделя
6. Источники случайности в генетических процессах
7. Неслучайные отклонения от ожидаемого расщепления
8. Типы межаллельного взаимодействия генов
9. Особенности наследования количественных признаков

1. Генетические эксперименты Г. Менделя. Гибридологический метод

Грегор Иоганн Мендель проводил свои опыты по скрещиванию растений в 1856...1865 гг. в монастыре г. Брюнна (ныне – г. Брно, Чехия). Несколько лет он потратил, чтобы выбрать экспериментальный объект; остановился на горохе – *Pisum sativum*. Его достоинства:

- размножается половым способом (в отличие от ястребинки и одуванчика, у которых семена могут завязываться без опыления; это – так называемый **бесполосеменной** способ размножения), поэтому Мендель избежал связанной с этим западни;

- имеются сорта с **контрастными** (альтернативными, взаимоисключающими) признаками;

- имеются «**чистые линии**» (сорта), которые сохраняют определенный признак на протяжении многих поколений, не давая расщепления при скрещивании с себе подобными (такие линии У. Бэтсон в 1902 г. назвал **гомозиготными**, а дающие расщепление – **гетерозиготными**);

- **особое строение цветков**, благодаря которому скрещивание легко контролировать (цветки обоеполые; тычинки и пестики закрыты лепестками (парус, лодочка, крыло), что препятствует перекрестному опылению).

После выбора этого объекта Мендель еще 2 года потратил на предварительные скрещивания различных сортов, чтобы убедиться, что – это действительно «чистые» линии. Остановился на **7 парах признаков**:

- красные и белые, верхушечные и пазушные **цветки**;

- гладкие и морщинистые, желтые и зеленые **семена**;

- длинные и короткие **стебли**;

- простые и фрагментированные, зеленые и желтые **стручки**.

Сама **техника скрещивания** заключалась в том, что у цветка гороха одного сорта удалялись тычинки до созревания его пыльцы, затем на пестик этого цветка наносилась пыльца с тычинки, взятой из цветка другого родителя.

Для повышения достоверности таким образом опылялись многие десятки цветков. Затем Мендель собирал семена (сотни и тысячи), образовавшиеся после перекрестного опыления, высевал их и изучал признаки у растений – **гибридов первого поколения** (от лат. *hybridus* – помесь). При необходимости можно было провести перекрестное опыление между этими гибридами или дождаться, когда произойдет самоопыление, и собрать семена **гибридов второго поколения**.

В результате Менделем был создан **гибридологический метод** анализа наследования признаков, который успешно применяется и сейчас.

Особенности гибридологического метода:

- 1) использование только гомозиготных особей («чистых линий»);
- 2) анализируются пары альтернативных признаков;
- 3) проводится точный количественный учет потомков с различными комбинациями признаков (используются математические методы);
- 4) наследование признаков прослеживается в ряду поколений.

Гибридологический – значит основанный на скрещивании; а **гибрид** – это потомок от скрещивания двух особей.

В 1909 г. датчанин **Вильгельм Иогансен** предложил термины **ген, фен, генотип, фенотип**.

Ген – элементарная единица наследственности, наследственный **задаток** (как называл его Мендель), определяющий развитие одного признака;

фен – отдельный признак, определяемый одним геном; **признак** – свойство, отличительная особенность организма;

генотип – совокупность всех генов организма;

фенотип – совокупность всех внешних и внутренних признаков организма, которые развиваются на основе генотипа под влиянием условий окружающей среды.

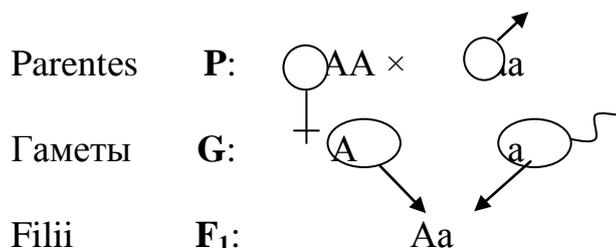
2. Моногибридное скрещивание. Первый и второй законы Менделя

При скрещивании двух чистых линий гороха, различающихся по *одной паре* альтернативных признаков, например, красные и белые цветки (это **моногибридное** скрещивание), Мендель получил семена гибридов.

После их посева в почву выросли растения только с красными цветками, т. е. один из признаков (красная окраска) подавлял развитие другого (белая окраска).

Первый из них, преобладающий, Мендель назвал **доминантным** (от лат. *dominus* – господин), а второй, подавляемый – **рецессивным** (от лат. *recession* – отступление).

Мендель нашел очень удачную, алгебраическую форму записи схем скрещивания. Единицы наследственности он называл **затками**, или **элементами** и обозначал их латинскими буквами: маленькими – рецессивные, заглавными – доминантные:

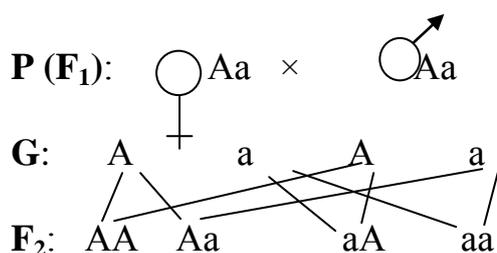


Формулировка первого закона (единообразия гибридов I поколения):

При моногибридном скрещивании гомозиготных организмов наблюдается единообразие гибридов I поколения как по фенотипу, так и по генотипу.

В последующих опытах Мендель дождался самоопыления гибридов I поколения, собрал несколько сотен семян, высеял их и изучил фенотип гибридов II поколения. Оказалось, что соотношение растений с доминантным и рецессивным признаками составляет примерно 3 : 1. При этом анализу подвергалось от нескольких сотен до 1,5 тысяч растений в каждом случае. Такой же результат получается и при *перекрестном опылении* гибридов I поколения.

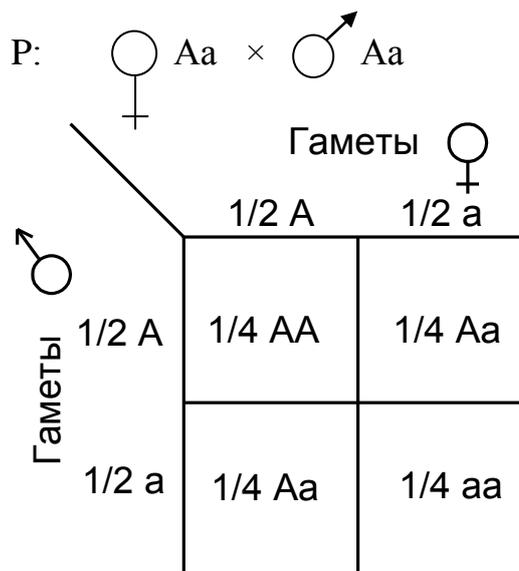
Схема скрещивания в этом случае такая:



Формулировка второго закона (расщепления):

При моногибридном скрещивании гетерозиготных организмов у потомков наблюдается расщепление в соотношении примерно 3 : 1 по фенотипу и 1 : 2 : 1 по генотипу.

Более удобный способ записи опытов по скрещиванию предложил в начале XX века британский генетик Реджинальд Грундалл **Пеннет** (*Punnett*). Это так называемая **решетка Пеннета**.



Дробями записаны частоты гамет, при их перемножении получаются частоты генотипов.

Цитологический смысл законов Менделя очевиден: при мейозе в каждую гамету попадает только одна хроматида из пары гомологичных хромосом и, соответственно, один из пары генов, определяющих альтернативные признаки.

Гены A и a, определяющие развитие альтернативных признаков, называются **аллелями** (В. Иогансен, 1926). По сути дела, аллели – это *варианты, мутантные формы* некоего исходного гена («дикого типа»). Они находятся в идентичных участках гомологичных хромосом.

Причины доминирования многообразны и не до конца изучены, одна из них: доминантный аллель определяет синтез полноценного фермента, а рецессивный – дефектного: вследствие мутации в гене фермент либо не синтезируется вовсе, либо дефектен (имеет меньшее сродство к субстрату, дает меньшую скорость реакции и т. д.).

3. Возвратное и анализирующее скрещивания

Скрещивание гибрида с одним из родителей называется **возвратным** (*back*).

Мендель предложил один из вариантов возвратного скрещивания – с гомозиготным по рецессивному признаку родителем – использовать для проверки того, является ли данный организм гомо– или гетерозиготным. Такой вид скрещивания называется **анализирующим**:

1 вариант:
P: Aa × aa
F_a: 1 Aa : 1 aa

2 вариант:
P: AA × aa
F_a: Aa

Если особь является гетерозиготной (как в первом варианте), то у гибридов наблюдается расщепление примерно 1:1 по фенотипу. Если изучаемая особь гомозиготна (как во втором варианте), все ее потомки будут одинаковыми по фенотипу.

4. Взаимодействие аллельных генов

Взаимодействие аллельных генов называют также *внутриаллельным*.

Выделяют следующие его виды:

- *полное доминирование*,
- *неполное доминирование*,
- *сверхдоминирование*,
- *кодоминирование*,
- *межаллельная комплементация*,
- *аллельное исключение*.

Ранее мы рассмотрели *полное доминирование*, описанное Менделем. Известно также *неполное доминирование*.

При *неполном доминировании* гетерозигота имеет фенотип, *промежуточный* между фенотипами гомозигот. Например, у растения *ночная красавица* (*Mirabilis jalapa*) имеются гомозиготные линии с красными (AA) и белыми (aa) цветками. Гибриды F1 являются гетерозиготами Aa и имеют цветки *розовой окраски*. Во втором поколении наблюдается расщепление **1:2:1** как по фенотипу, так и по генотипу. В целом, 1 и 2 законы Менделя соблюдаются с поправкой на промежуточный фенотип у гетерозигот.

Другие примеры неполного доминирования: окраска цветков у львиного зева, окраска оперения у андалузских кур, шерсти у коров (красная и белая; промежуточная – чалая масть).

Причина промежуточного проявления признака у гетерозигот: аллель A находится в генотипе гетерозиготы в единственном числе, поэтому проявляется слабее, чем в геноме гомозиготы AA (двойная доза генов, а значит, и продуктов генов!). Для неполного доминирования важным показателем является *экспрессивность* – степень выраженности признака, зависящая от *дозы генов (аллелей)* и от условий окружающей среды (влияние УФ – света на окраску кожи).

Экспрессивность снижается в ряду: AA > Aa > aa.

Примеры неполного доминирования генов у *людей*: гомозиготы по аллелю *серповидноклеточности эритроцитов (HbS)* не переживают детский возраст из-за анемии и сопутствующих расстройств, *гетерозиготы* почти здоровые люди, но при подъеме на высоту они испытывают кислородное голодание. Т. е. в данном случае речь идет о неполном доминировании гена

нормального гемоглобина (HbA). Подобное соотношение наблюдается и при других наследственных заболеваниях человека, вызванных мутантными рецессивными аллелями.

При **сверхдоминировании** доминантный ген в *гетерозиготном* состоянии проявляет себя сильнее, чем в *гомозиготном*. У дрозофилы, например, имеется летальный рецессивный **ген плодовитости (a)**. Мухи, гомозиготные (AA) по доминантному гену плодовитости A имеют нормальную жизнеспособность, а гетерозиготы (Aa) живут дольше и более плодовиты, чем доминантные гомозиготы.

Кодоминирование – это одновременное проявление в фенотипе обоих аллелей.

Примеры: поверхностные белки эритроцитов, определяющие группы крови системы АВО у людей; различные формы ферментов с неодинаковой электрофоретической подвижностью.

Группы крови: 3 аллеля: I^0 , I^A и I^B

1^я: $I^0 I^0$

2^я: $I^A I^A$ или $I^A I^0$

3^я: $I^B I^B$ или $I^B I^0$

4^я: $I^A I^B$

В гетерозиготах $I^A I^0$ и $I^B I^0$ наблюдается полное доминирование аллелей I^A и I^B над I^0 , а в гетерозиготе $I^A I^B$ проявляются оба аллеля, вызывая образование антител против обоих антигенов.

Другой пример: образование в гетерозиготном организме двух форм одного и того же белка с различной электрофоретической подвижностью.

Межаллельная (внутриаллельная) комплементация относится к достаточно редко встречаемым способам взаимодействия аллельных генов. В этом случае возможно формирование нормального признака D у организма, гетерозиготного по двум мутантным аллелям гена D(D'D''). Допустим, что ген D отвечает за синтез какого-то белка, который имеет **четвертичную** структуру, состоящую из **нескольких одинаковых пептидных цепей**. Мутантный аллель D' определяет синтез измененного пептида D', а мутантный аллель D'' приводит к синтезу другой, но тоже измененной структуры пептида D''. Можно представить ситуацию, когда *взаимодействие таких измененных пептидов (D' и D'')* при формировании четвертичной структуры, как бы взаимно **компенсируя** эти изменения, обеспечивает образование белка с **нормальными свойствами**. В то же время отдельно взаимодействующие пептиды D' или D'' формируют аномальные белки. Таким образом, с определенной вероятностью у гетерозигот D'D'' в результате межаллельной комплементации

может формироваться нормальный признак за счет белка с нормальными свойствами.

Аллельное исключение – такой вид взаимодействия аллельных генов, который связан с невозможностью присутствия в одной клетке двух активно работающих аллелей одного гена.

Пример: в клетках организма женщины случайным образом происходит инактивация одной из X – хромосом (**тельце Барра**).

Т. е. организм женщины **мозаичен** по функционирующей X - хромосоме со всеми ее аллелями. Поэтому любой мутантный рецессивный аллель, если он присутствует в X – хромосоме, будет проявляться в отдельных участках тела женщины, например, отсутствие потовых желез и др.

Таким образом, даже процесс формирования **элементарного признака** – синтез полипептида - зависит от взаимодействия, по меньшей мере, двух аллельных генов, и конкретный результат определяется конкретным сочетанием их в генотипе.

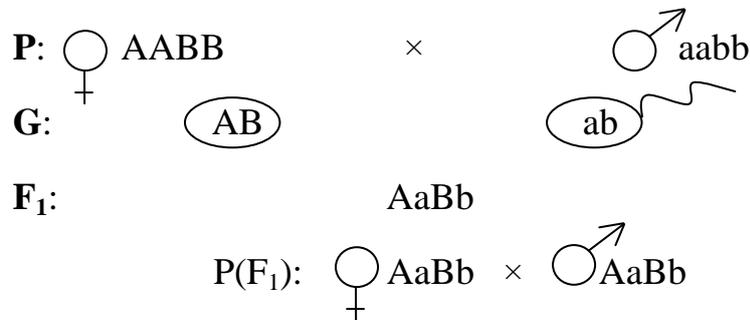
5. Дигибридное скрещивание. 3^й закон Менделя

Изучив наследование *одной пары* аллелей, Мендель решил проследить наследование **двух признаков** одновременно. Для этой цели он использовал гомозиготные растения гороха, отличающиеся по двум парам альтернативных признаков: семена желтые гладкие и зеленые морщинистые. Такое скрещивание, при котором родители различаются по *двум парам* альтернативных признаков, называется **дигибридным**. Если изучаются 3 и более пар признаков, то скрещивание **полигибридное**.

В результате такого скрещивания в первом поколении Мендель получил растения с желтыми гладкими семенами. Этот результат показал, что **закон единообразия гибридов первого поколения** проявляется не только при моногибридном, но и при полигибридном скрещивании, если родительские формы гомозиготны.

Затем Мендель скрестил гибриды первого поколения между собой. Для анализа результата этого скрещивания используем решетку Пеннета.

В результате свободного комбинирования **4 типов гамет** в зиготы попадают гены во всех возможных **16^{ми} комбинациях**. В потомстве выявляются **4 фенотипических класса**: примерно **9 частей** растений с горошинами желтыми гладкими (**A-B-**), **3 части** – с желтыми морщинистыми (**A-вв**), **3 части** – с зелеными гладкими (**aaB-**), **1 часть** – с зелеными морщинистыми (**aaвв**), т. е. расщепление примерно **9:3:3:1**. Два фенотипических класса из четырех – **абсолютно новые**, отличные от родительских форм. При этом количество **генотипических классов** равно 9.



♀ \ ♂	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Если проанализировать расщепление *отдельно по каждой из пар* альтернативных признаков (желтый и зеленый цвет, гладкая и морщинистая поверхность), то получится: $\sim 3:1 \rightarrow$ желтые : зеленые и

$\sim 3:1 \rightarrow$ гладкие : морщинистые,

т. е. каждая пара признаков дала расщепление в F₂ *независимо* от другой пары. Это явилось результатом случайного комбинирования генов при образовании зигот, что и привело к образованию двух новых фенотипических классов, отличных от родительских форм.

Отсюда вытекает *третий закон Менделя* – закон независимого комбинирования признаков: *при дигибридном скрещивании гетерозиготных организмов у гибридов наблюдается независимое комбинирование признаков и генов разных аллельных пар.*

Для объяснения результатов скрещивания, проведенного Г. Менделем, Уильям Бэтсон (1902 г.) предложил *гипотезу «чистоты гамет»*. Ее можно свести к следующим двум основным положениям:

- 1) из каждой пары аллелей в гамету попадает только один ген;
- 2) у гибридного организма гены не смешиваются, а находятся в *чистом аллельном состоянии*.

Эта гипотеза после открытия механизмов мейоза стала очевидным фактом и называется теперь *правилом «чистоты гамет»*.

В общем случае для полигибридного скрещивания справедливы формулы, которые показаны в таблице:

Таблица – Количество классов потомков в F₂ при полигибридном скрещивании

Число пар генов	Число различных типов гамет, образуемых гибридом F ₁	Количество в F ₂ ...		
		комбинаций аллелей	фенотипических классов	генотипических классов
1	2	4	2	3
2	4	16	4	9
...
n	2 ⁿ	4 ⁿ	2 ⁿ	3 ⁿ

6. Источники случайности в генетических процессах

Законы Менделя носят *статистический* (т. е. случайный, вероятностный) характер. Каковы же *источники случайности* в генетических процессах?

1. Случайный подбор родительских пар при скрещивании.
2. Случайная «встреча» гамет.
3. Случайное расхождение гомологичных хромосом в первом делении мейоза и хроматид – во втором.
4. Случайный характер обмена участками хроматид при кроссинговере.

Отклонения (случайные) от ожидаемого расщепления при скрещивании будут тем меньше, чем больше будет потомков (*закон больших чисел*). Например, при скрещивании **Aa** × **Aa** все четыре потомка могут быть **Aa** или **aa**, а не по Менделю. Существуют методы математического прогнозирования отклонений изучаемой случайной величины от ожидаемого значения в зависимости от объема выборки.

Законы Менделя являются *универсальными*, т. е. они присущи всем живым организмам, но при соблюдении ряда условий:

- 1) способ размножения данного организма – половой;
- 2) гены разных аллельных пар должны находиться в разных хромосомах (т. е. максимальное число пар признаков в полигибридном скрещивании ≤ n);
- 3) между аллелями одного гена не должно быть взаимодействия (кроме полного доминирования);
- 4) должна быть равная вероятность образования гамет и зигот разного типа и равная вероятность выживания организмов с разными генотипами (не должно быть летальных генов);

5) должна быть 100% пенетрантность гена, отсутствовать плеiotропное действие и мутации гена.

7. Неслучайные отклонения от ожидаемого расщепления

Отклонения (неслучайные) от ожидаемого расщепления по законам Менделя вызывают *летальные гены*. У человека так наследуется доминантный ген *брахидактилии* (короткие толстые пальцы). У гетерозигот наблюдается брахидактилия, а гомозиготы по этому гену погибают на ранних стадиях эмбриогенеза. У человека имеется также ген нормального гемоглобина (HbA) и ген *серповидноклеточной анемии (HbS)*. Гетерозиготы по этим генам жизнеспособны, а гомозиготы по HbS погибают в раннем детском возрасте (гемоглобин S не способен связывать и переносить кислород).

Другие примеры:

1. При скрещивании гетерозиготных (Aa) желтых мышей друг с другом наблюдается нетипичное расщепление по фенотипу (не 3:1, а 2:1):

P: Желтые мыши (Aa) × Желтые мыши (Aa)

F₁: 1AA : 2Aa : 1aa

2. При скрещивании гетерозиготных (Aa) лисиц платиновой окраски друг с другом наблюдается подобное нетипичное расщепление в F₁:

Лисицы платиновой окраски × Лисицы серебристо – черной окраски

2 : 1

В данном случае аллель желтой окраски у мышей и платиновой у лисиц доминантен, но является летальным для гомозигот AA на эмбриональной стадии.

Все эти исключения лишь подтверждают законы Менделя.

8. Типы межallelного взаимодействия генов

Взаимодействие неallelных генов называется *межаллельным*. Различают следующие его виды: комплементарность, эпистаз и полимерию.

При *комплементарности* присутствие в одном генотипе двух доминантных (рецессивных) генов из разныхallelных пар приводит к появлению нового варианта признака.

Примеры: форма гребня у кур, окраска цветков у душистого горошка *Lathyrus odoratus*, форма плода у тыквы и др.

Типичный пример – *развитие слуха у человека*. Для нормального слуха в генотипе человека должны присутствовать доминантные гены из разныхallelных пар – D и E. Ген D отвечает за нормальное развитие улитки, а ген E – за развитие слухового нерва. У рецессивных гомозигот (dd) будет недо-

развита улитка, а при генотипе **ee** – недоразвит слуховой нерв. Люди с генотипами **D-ee**, **ddE-** и **ddee** будут глухими.

Расщепление при комплементарности во всех случаях – производное от формулы дигибридного скрещивания, т. е. 9:3:3:1; например, 9:7 и др.

При *эпистазе* доминантный (или пара рецессивных) генов из одной аллельной пары подавляет действие доминантного (пары рецессивных) генов из другой аллельной пары. Это явление противоположно комплементарности. Подавляющий ген называется *супрессором* (ингибитором). Пример *доминантного эпистаза* – черная и белая окраска у свиней. Формула расщепления в F_2 – 12:3:1.

У человека описан «*бомбейский феномен*» в наследовании групп крови по АВО системе. У женщины, получившей от матери аллель I^B , фенотипически определялась I(O) группа крови. При детальном исследовании было установлено, что действие гена I^B (синтез в эритроцитах антигена В) было подавлено редким рецессивным геном **h**, который в гомозиготном состоянии (**hh**) оказал эпистатическое действие. Это пример *рецессивного эпистаза*. Еще один пример – *альбинизм* у человека.

При *полимерии* доминантные гены из разных аллельных пар влияют на степень проявления одного и того же признака. Полимерные гены принято обозначать одной буквой латинского алфавита с цифровыми индексами, например, $A_1A_1A_2A_2a_3a_3$ и т. д. Признаки, детерминированные полимерными генами, называются *полигенными*. Таким образом наследуются многие количественные и некоторые качественные признаки у животных и человека: рост, масса тела, величина артериального давления, цвет кожи и др. Степень проявления этих признаков зависит от количества доминантных генов в генотипе (чем их больше, тем сильнее выражен признак) и в значительной мере от влияния условий среды. Другой пример: окраска зерен у пшеницы.

9. Особенности наследования количественных признаков

Ранее мы рассматривали альтернативные признаки, например, окраску цветка у гороха. Такие признаки называются *качественными*.

Однако имеются такие признаки, когда между особями наблюдаются *малозаметные переходы*, а при расщеплении нет четких фенотипических классов. Эти признаки приходится изучать путем *измерений* или *подсчетов*.

К таким признакам принадлежат вес, размеры тела, жирность молока, умственные способности человека. Подобные признаки называют *количественными*.

При *скрещивании* особей, различающихся по количественному признаку, в F_1 , как правило, не наблюдается доминирования признака одного из ро-

дителей, а в F_2 нет четкого расщепления на небольшое число фенотипических классов. Связано это с тем, что проявление количественных признаков (в отличие от качественных) обусловлено суммарным действием большого числа пар генов, как это наблюдается в случае *полимерии*. При этом число фенотипических классов возрастает с увеличением числа пар генов, влияющих на развитие данного признака. При участии в скрещивании одной пары генов в F_2 получается два фенотипа, двух – четыре, трех – восемь комбинаций, при участии многих пар генов получается плавная кривая распределения.

Закономерности наследования количественных признаков

(по П.Ф. Рокицкому, 1978 г.):

1. Кривая распределения особей F_1 обычно располагается между кривыми распределения родительских форм. Средняя арифметическая признака в F_1 чаще всего *промежуточная* между средними арифметическими у родительских форм.

2. Средняя арифметическая значений в F_2 примерно равна средней арифметической в F_1 , но *вариация* особей значительно выше.

3. Кривые распределения особей из возвратных скрещиваний F_1 с каждым из родителей *сдвинуты* ближе к кривым распределения родительских форм.

Лекция № 5

Тема лекции: Морганизм

План лекции:

1. Сцепленное наследование генов
2. Генетическое доказательство перекреста хромосом
3. Цитологические доказательства перекреста хромосом
4. Хромосомная теория наследственности
5. Особенности протекания и варианты кроссинговера
6. Факторы, влияющие на кроссинговер

1. Сцепленное наследование генов

В 1906 г. британские генетики **У. Бэтсон** и **Р. Пеннет** в опытах с *душистым горошком* (*Lathyrus odoratus*) обнаружили явление **сцепления** наследственных признаков при передаче потомству. В том же году британский генетик **Л. Донкастер** (L. Doncaster) в опытах с бабочкой крыжовниковой пяденицей открыл **наследование, сцепленное с полом**. Эти открытия дали толчок работам **Т. Моргана** по созданию хромосомной теории наследственности.

Опыты У. Бэтсона и Р. Пеннета (1906):

Скрещивание душистого горошка *Lathyrus odoratus*

Пурпурные цветки (**P**)
Удлиненная пыльца (**L**)

Красные цветки (**p**)
Круглая пыльца (**l**)



F₁: **PpLl** ← { Пурпурные цветки, удлиненная пыльца (дигетерозигота)

В результате самоопыления этих гибридов в F₂ получено 4 фенотипических класса:

P – L –	:	P – ll	:	ppL –	:	ppll
п. цв.		п. цв.		кр. цв.		кр. цв.
удл. п.		кр. п.		удл. п.		кр. п.

Если бы гены **P(p)** и **L(l)** находились на негомологичных хромосомах (т. е. **нет сцепления**), то соотношение классов было бы : **9:3:3:1** (по третьему закону Менделя), т.е. 56,25% : 18,75% : 18,75% : 6,25%

Если бы сцепление генов было *полное*, т. е. гены **P** и **L** находились на одной и той же хромосоме (а **p** и **l** на гомологичной ей), то промежуточных классов бы не было, а было бы 2 фенотипических класса в соотношении **3:1** (по второму закону Менделя), т. е. 75% : 0% : 0% : 25%.

А фактически получилось: 69,5% : 5,6% : 5,6% : 19,3%

Родительские сочетания аллелей **PL** и **pl** попадали в гаметы гораздо чаще, чем новые **Pl** и **pL**. Это явление **Томас Морган** назвал «*сцеплением генов*». Он предположил, что «сцепленные» гены находятся на одной и той же хромосоме и поэтому наследуются совместно. Но почему, тем не менее, с определенной частотой образуются 2 новых фенотипических класса? Что же мешает полному сцеплению генов?

2. Генетическое доказательство перекреста хромосом

Сразу после установления факта сцепленности многих генов Морган с учениками в 1911г. установил, что в гомологичной паре хромосом при образовании гамет происходит обмен аллелями. Механизм этого обмена – перекрест хромосом (*кроссинговер*). Скрещиванию подвергались дрозофилы двух мутантных линий: *black* (черное тело) и *vestigial* (редуцированные крылья); схема скрещивания представлена на рисунке 1.

Был сделан вывод, что в реципрокном скрещивании образовались 2 класса потомков в результате слияния обычных гамет (это – *некроссоверы*, их всего 83%), а 2 других класса – в результате слияния *кроссоверных* гамет с гаметами *анализаторной линии* (это - *кроссоверы*, или *рекомбинанты*; их суммарно 17%). Полученные результаты явились *генетическим доказательством* перекреста хромосом и рекомбинации. Ещё один важный вывод: при образовании гамет у *самцов* дрозофилы перекрест хромосом *не происходит* (как в аутосомах, так и в половых хромосомах)! Кроссинговер происходит только в организме *самок* плодовой мухи.

Величина (частота) кроссинговера выражается в процентах кроссоверных потомков к их общему числу, причем учитываются все классы потомков *суммарно*, т.к. они являются результатом одного события (взаимный обмен участками хромосом). Она *не может превышать 50%*, т. к. если бы оба аллеля располагались на негомологичных хромосомах, то в анализирующем скрещивании соотношение фенотипических классов было бы 1 : 1 : 1 : 1.

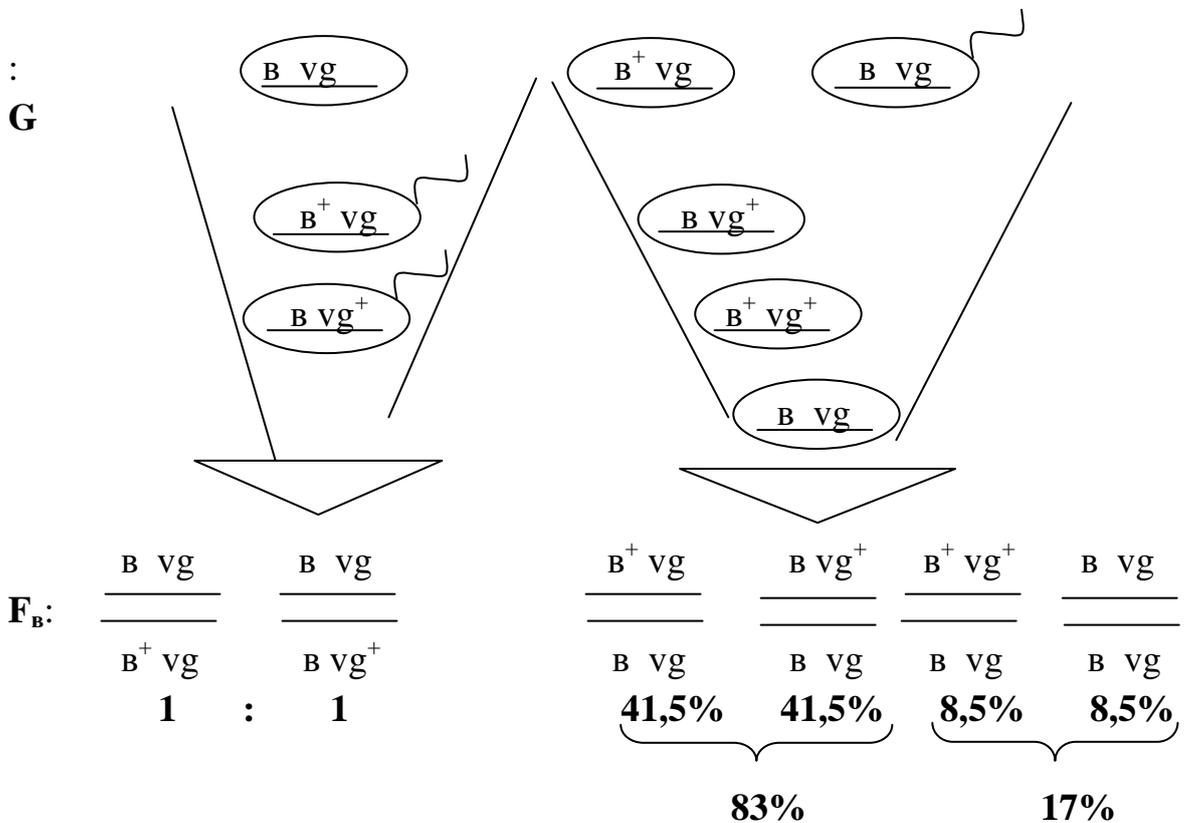
Схема опыта Т. Моргана:

$$P: \begin{array}{c} \text{♀} \frac{B^+ vg}{B^+ vg} \times \text{♂} \frac{B vg^+}{B vg^+} \end{array}$$

$$G: \begin{array}{c} \text{♀} \frac{B^+ vg}{B^+ vg} \quad \text{♂} \frac{B vg^+}{B vg^+} \end{array}$$

2 варианта анализирующего скрещивания

$$P: \left\{ \begin{array}{l} \text{♀} \frac{B vg}{B vg} \times \text{♂} \frac{B^+ vg}{B vg^+} \text{♀} \\ \text{♂} \frac{B vg}{B vg} \times \text{♀} \frac{B^+ vg}{B vg^+} \text{♂} \end{array} \right.$$



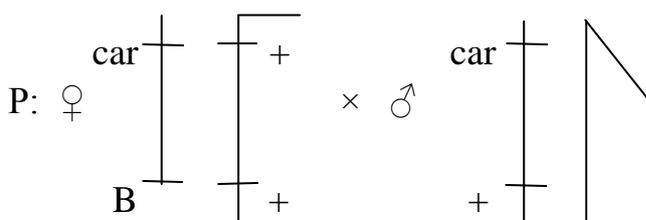
В прямом скрещивании получились 2 фенотипических класса в соотношении 1:1, т. е. наблюдается **полное сцепление**.

При реципрокном скрещивании получилось 4 класса потомков: два - как родительские формы и два - с новыми комбинациями признаков.

Рисунок 1 - Схема скрещивания дрозофил в классическом опыте Моргана

3. Цитологические доказательства кроссинговера

В 1931 г. **К. Штерн** представил цитологические доказательства кроссинговера. Он получил линии дрозофилы, имеющие половые хромосомы, различимые на цитологическом уровне. На одну из X – хромосом был перенесен небольшой фрагмент Y – хромосомы, она приобрела **G – образную форму**. Вторая X – хромосома была **короче** нормальной (ее часть перенесли на другую (4 – ю) хромосому).



Укороченная хромосома была маркирована мутантными генами **Bar (B)** – полосковидные глаза и **carnation (car)** – глаза цвета красной гвоздики. Были получены самки, гетерозиготные по обоим указанным хромосомам. Их скрещивали с самцами, имеющими нормальную по длине X – хромосому с аллелями **car** и **B⁺**.

В потомстве F₁ было 4 класса потомков: 2 некроссоверных и 2 - кроссоверных. У кроссоверных при митозе четко наблюдались изменившиеся по морфологии в результате кроссинговера X – хромосомы: укороченная G - образная и удлинившаяся короткая.

Другое цитологическое доказательство было получено **Г. Крейтон** и **Б. Мак Клинтон** на кукурузе. Им удалось получить линию, у которой гомологичные хромосомы IX пары были разными по строению: одна была нормальной, а другая несла утолщение (**knob**) на одном плече, а второе было удлинено. Эта хромосома была помечена двумя маркерными генами (окрашенный и восковидный эндосперм).

При скрещивании с линией, имеющей хромосомы с нормальной морфологией, получили 2 класса кроссоверных потомков. У последних хромосомы имели соответствующие морфологические особенности.

4. Хромосомная теория наследственности

Развивая свои идеи о сцепленности генов, Морган предположил, что гены расположены на хромосоме в **линейном порядке**, а частота кроссинговера прямо пропорциональна расстоянию между ними.

Классический опыт Моргана и Стертеванта:

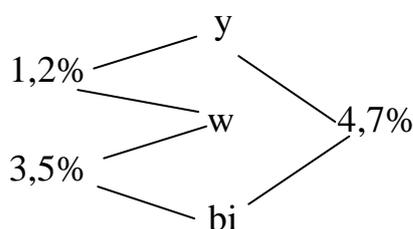
Скрещивание самок дрозофилы, гетерозиготных по трем сцепленным рецессивным генам (расположены на X – хромосоме):

Yellow (y),	white (w),	bifid (bi)
цв. тела	цв. глаз	вильчатые крылья

с самцами, несущими эти же мутации:

$$P: \quad \begin{array}{c} \text{♀} \frac{y \ w \ bi}{y^+ \ w^+ \ bi^+} \\ \times \quad \begin{array}{c} \text{♂} \frac{y \ w \ bi}{} \end{array} \end{array}$$

В F₁ было получено значительное количество некроссоверных потомков, а также немного кроссоверных. Частоты получились такие:



Это свидетельствовало о том, что все 3 гена действительно расположены на X – хромосоме в *линию*. Место расположения гена называется *локус*. Одна хромосома – одна *группа сцепления*.

Расстояние между двумя локусами оценивают частотой кроссинговера, 1% кроссинговера соответствует *1 сМ (сантиморган)*. Так принято во всем мире с 80^х гг. XX века, а до этого называли *ед. Моргана*, или «*морганида*» (в СССР).

Основные положения хромосомной теории наследственности

(Т. Морган и соавт., 1911 г.) сводятся к следующему:

1. Гены расположены в хромосомах в *линейном порядке* в определенных *локусах*. Аллельные гены занимают одинаковые локусы гомологичных хромосом.
2. Гены, расположенные в одной хромосоме, образуют *группу сцепления* и наследуются преимущественно вместе; число групп сцепления равно гаплоидному набору хромосом.
3. Между гомологичными хромосомами возможен обмен участками – *кроссинговер*, который нарушает сцепление генов.
4. Процент кроссинговера пропорционален расстоянию между генами. *Сантиморган* – единица расстояния, равная 1% кроссинговера. Зная расстояние между генами, можно построить карту хромосомы.

Генетическая карта хромосомы представляет собой отрезок прямой, на котором обозначен порядок расположения генов и указано расстояние между ними в сантиморганах. Она строится по результатам анализирующего скрещивания.

Цитологическая карта хромосомы представляет собой фотографию или точный рисунок окрашенной хромосомы, на котором отмечается последовательность расположения генов. Ее строят на основе сопоставления результатов анализирующего скрещивания и хромосомных перестроек, которые хорошо видны под микроскопом (делеции, инверсии и др.).

В 1933 г. Т. Моргану была присуждена Нобелевская премия за создание хромосомной теории наследственности.

5. Особенности протекания и варианты кроссинговера

Перекрест между гомологичными хромосомами может происходить не в одной, а одновременно **в нескольких точках**. Соответствующие названия кроссинговера: одинарный, двойной, тройной, ..., **множественный**. Морган доказал это на дрозофиле, а затем эта закономерность подтвердилась на других организмах.

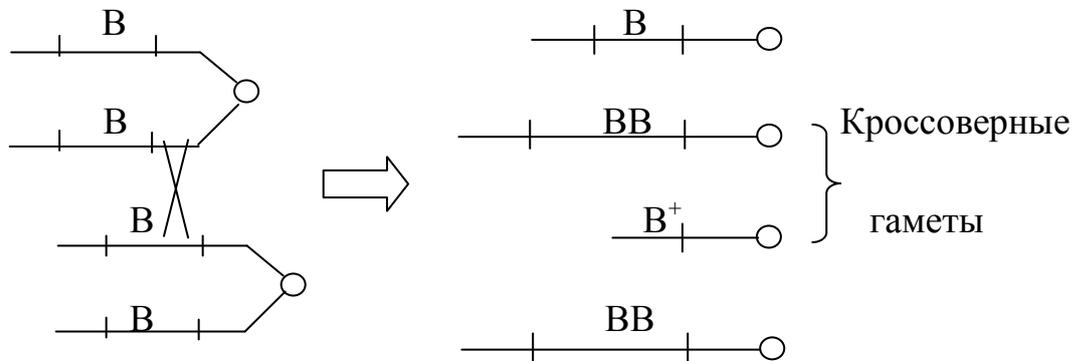
Чем больше расстояние между локусами, тем больше вероятность множественных перекрестов между ними и тем труднее их учитывать; они могут остаться незамеченными; нужен маркер в промежутке. И, наоборот, чем меньше расстояние между генами, тем точнее оно может быть определено.

В 1916 г. Г. Меллер открыл явление **интерференции**. Суть его в том, что кроссинговер, происшедший в одном участке, препятствует одновременному кроссинговеру в близлежащих участках хромосомы. Бывает **положительная** интерференция (когда препятствует) и, реже, - **отрицательная** (когда кроссинговер в одном локусе усиливает его в соседнем участке). Вблизи центромеры интерференция сильная.

Иногда при кроссинговере происходит обмен неравными участками – **неравный кроссинговер**. Впервые это установил в 1925 г. Альфред Хенри Стёртервант, изучая мутацию **Var** – полосковидные глаза у самки дрозофилы. Соответствующий доминантный ген (**V**) находится в половой (X) хромосоме. У самки дикого типа в глазу 800 фасеток, у гетерозиготы по гену **V** – 350, у гомозиготы – 70. Изредка встречается мутация «двойной» **Var (VV)**. В гетерозиготном состоянии он уменьшает число фасеток до 50, а в гомозиготном до 25. Стертевант предположил, что указанные различия связаны не с изменением самого гена, а с увеличением числа его копий за счет обмена го-

гомологичных хромосом не совсем одинаковыми участками при кроссинговере.

Стертевант пометил X – хромосому слева и справа от В двумя маркерными генами, провел скрещивания и доказал свое предположение, изучив фенотипы потомков.



Когда появилась возможность наблюдать строение гигантских хромосом у мух, то одновременно 3 группы ученых (**Г. Меллер, А. А. Прокофьева – Бельговская и К. Бриджес**) подтвердили цитогенетически, что у мух:

- дикого типа (B^+) → один набор дисков на хромосоме;
- у мутантов В → два набора дисков на хромосоме;
- у «двойных» мутантов (ВВ) → три набора дисков на хромосоме.

Неравный кроссинговер наблюдали также на кукурузе.

Известен также **митотический (соматический)** кроссинговер. Он происходит с частотой $\sim 10^{-4}$ в соматических клетках. Конъюгация происходит в *интерфазе* на стадии 4^x хроматид. В митоз гомологичные хромосомы входят спаренными. Рентгеновское облучение может вызвать обмен участками несестринских хроматид.

Пример: у самки дрозофилы – **гетерозиготы** по двум аллелям окраски глаз w – белые глаза и w^{co} – *white corall* (темно – красные глаза) – глаза **бледно – розовые**. После рентгеновского облучения таких самок (личинок) появляются на розовом фоне глаз белые и темно – красные пятна – результат соматического кроссинговера.

6. Факторы, влияющие на кроссинговер

На этот процесс влияют как внутренние факторы, так и внешние.

Половая принадлежность – у гетерогаметного пола (самцы дрозофилы и самки тутового шелкопряда) конъюгации хромосом в профазе I мейоза не происходит. У женщин рекомбинация происходит в 2 раза чаще, чем у мужчин.

Структура хромосом – вблизи центромеры у дрозофилы (там гетерохроматин и выше уровень спирализации) кроссинговер происходит реже, чем в середине плеча.

Возраст дрозофилы влияет на частоту кроссинговера: возраст 1 – 10 суток → 5,9%; 11 – 20 суток → 1,8% и 21 – 30 суток → 3,8%

Генотип – некоторые хромосомные перестройки «запирают» кроссинговер. У кукурузы и ржи открыты гены, влияющие на частоту конъюгации.

Факторы внешней среды (при индуцированном кроссинговере): высокая и низкая температура, ионизирующие излучения, удаление из хромосом ионов Са и Mg с помощью ЭДТА → повышают частоту кроссинговера.

Лекция № 6

Тема лекции: Генетика определения пола

План лекции:

1. Определение пола, первичные и вторичные половые признаки
2. Хромосомная теория определения пола
3. Балансовая теория определения пола
4. Роль условий среды в половой детерминации
5. Соотношение полов и его регуляция
6. Молекулярно-генетические механизмы половой детерминации и компенсации дозы генов

1. Определение пола, первичные и вторичные половые признаки

Пол – совокупность морфологических, физиологических, биохимических, поведенческих и других *признаков* организма, обеспечивающих его самовоспроизведение и передачу наследственной информации за счет образования *гамет*.

Признаки, по которым различаются особи разных полов, подразделяют на *первичные* и *вторичные* половые признаки, а также *соматические*.

К *первичным* относят те морфологические и физиологические особенности организма, которые обеспечивают *образование гамет* и *объединение их* в процессе оплодотворения. К числу их относятся, например, гонады, половые пути и наружные гениталии у высших животных, андроцей и гинецей у высших растений. Первичные половые признаки формируются в период эмбриогенеза.

К *вторичным* половым признакам относят признаки и свойства организма, непосредственно не обеспечивающие процессы гаметогенеза, спаривания и оплодотворения, но играющие *вспомогательную роль* в половом размножении (опознание и привлечение партнера и др.). К ним относятся особенности строения плавников у рыб, оперения у птиц, грудных желез у млекопитающих, тембр голоса, степень развития волосяного покрова у человека, сроков цветения у высших растений и др.

Генетический контроль соматических половых признаков

Соматические признаки, связанные с полом, подразделяют на **3 категории:**

- 1) ограниченные полом,
- 2) контролируемые полом, или зависимые от пола,
- 3) сцепленные с полом (с половыми хромосомами).

Гены признаков, *ограниченных полом*, находятся в аутосомах обоих полов, но проявляются они только у одного пола. Так, быки имеют гены, определяющие *молочность*, петухи – гены, определяющие *яйценоскость*, но действие их у самцов не проявляется.

Развитие признаков, *контролируемых полом*, также детерминировано генами, расположенными в аутосомах обоих полов, но степень и частота их проявления (экспрессивность и пенетрантность) разная у особей разного пола. Характер *доминирования* таких генов в *гетерозиготе* зависит от пола особи. Так, доминантные гомозиготные овцы (**HH**) рогаты, гомозиготные рецессивные (**hh**) безроги, независимо от пола. Однако гетерозиготные (**Hh**) самцы рогатые, а самки безрогие. Аналогично наследуется раннее облысение у человека. Доминирование в таких случаях определяется количеством мужских и женских половых гормонов в крови.

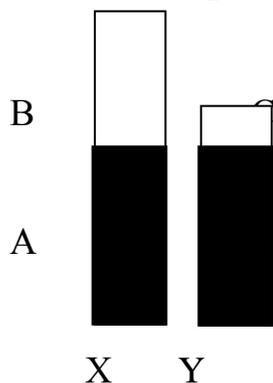
Признаки, развитие которых обусловлено генами, расположенными в одной из половых хромосом, называются *сцепленными* с половыми хромосомами (*гоносомное наследование*).

Организм, у которого определен ген, находящийся на парной половой хромосоме, присутствует в *единственной копии*, называется *гемизиготой*.

У человека X – хромосома по своим размерам значительно больше Y – хромосомы. В X – и Y – хромосомах имеются гомологичные участки (A), содержащие аллельные гены. Но в X – хромосоме есть еще большой участок (B), которому нет гомологичного в Y – хромосоме. Признаки, развитие которых детерминируют гены, расположенные в негомологичном участке X – хромосомы, называются *сцепленными с X – хромосомой* (*с полом*). Таких признаков для человека описано около 200 (далтонизм, гемофилия и др.).

Голандрические признаки детерминируются генами, расположенными в негомологичном (C) участке Y – хромосомы, и проявляются фенотипически только у мужчин. Таких генов описано 6 (перепонки между пальцами ног, волосатые уши и др.).

Схема гомологичных и негомологичных участков половых хромосом человека



2. Хромосомная теория определения пола

Хромосомная теория пола предложена **К. Корренсом** (1907). Суть ее заключается в том, что пол будущего потомка определяется сочетанием половых хромосом в *момент оплодотворения*. Пол, имеющий одинаковые половые хромосомы, называют **гомогаметным**, так как он дает один тип гамет, а имеющий разные – **гетерогаметным**, так как он образует два типа гамет.

Еще Мендель обратил внимание, что соотношение полов у раздельно-половых организмов близко к **1 : 1** и это напоминает *расщепление при анализирующем скрещивании* $Aa \times aa$. Предположили, что один из полов должен быть гетерозиготным, а другой – гомозиготным.

Впервые это предположение доказал экспериментально **К. Корренс** при скрещивании растений рода *Bryonia* (переступень): мужские и женские особи двудомного вида скрещивали с однодомными. Женские растения оказались гомо-, а мужские – гетерогаметными.

Впоследствии было установлено, что существуют разные типы хромосомного определения пола: XO и XY, причем гетерогаметным может быть как мужской, так и женский пол (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Типы хромосомного определения пола

Тип	Гетерогаметный пол	Генотип		Организмы
		самцов	самок	
XY	Мужской	XY	XX	Человек, млекопитающие, дрозофила, меландриум и др.
XO	->-	XO	XX	Клоп (<i>Protenor</i>), кузнечики <i>Dioscorea</i> и др.
XY	Женский	XX (ZZ)	XY (ZW)	Птицы, земноводные, бабочки, клубника и др.
XO	->-	XX (ZZ)	XO (ZO)	Моль и др.

Убедительным доказательством хромосомной теории пола является **гинандроморфизм**. Организмы, совмещающие в себе части тела разных полов – мужского и женского, называют **гинандроморфами** (гин- ♀, андр- ♂). Гинандроморфы существуют у тех видов, у которых четко выражен половой диморфизм (насекомые, птицы, человек), но встречаются они редко.

При **латеральном гинандроморфизме**, например у дрозофилы, одна половина тела имеет признаки женского пола, а другая – мужского. Как может возникнуть такой организм? Цитологические исследования показывают, что ткани гинандроморфа химерны: женская половина несет две X - хромо-

сомы, а мужская – одну. Рассмотрим пример с геном *white* (*w*). Известно, что этот ген рецессивен, сцеплен с X- хромосомой и определяет признак «белые глаза» у дрозофилы.

Предположим, у дрозофилы зигота имела генотип $\frac{W^-}{W^+}$ и при первом

делении дробления в силу каких – то необычных условий *одна из X – хромосом*, несущая ген W^+ , в одной из дочерних клеток (бластомеров) *утрачивается*. Тогда две дочерние клетки окажутся неодинаковыми в отношении X – хромосом: одна $\frac{W^-}{W^+}$, а вторая $\frac{W^-}{-}$.

Половина тела мухи, развившаяся из первой клетки, окажется женской и с красным глазом, а из второй разовьется половина тела с признаками мужского пола и с белым глазом, поскольку рецессивный ген W^- , содержащийся в единственной X – хромосоме, будет в гемизиготном состоянии.

Таким образом, и цитологический, и генетический анализ показывает, что в данном случае причиной гинандроморфизма может быть элиминация одной из X – хромосом на стадии дробления зиготы.

3. Балансовая теория определения пола

К. Бриджес в 1925 г., изучая уникальные линии дрозофилы с разным числом наборов аутосом (A) и разным количеством X – хромосом, выдвинул предположение о том, что у дрозофилы женский пол определяется не присутствием двух X – хромосом, а мужской – наличием хромосом X и Y, а *соотношением* числа половых хромосом и наборов аутосом. В таблице 2 показано, как определяется пол у дрозофилы согласно балансовой теории.

Гены *женской тенденции* сосредоточены главным образом в X - хромосомах, гены *мужской* – в аутосомах. Это видно из того, что все особи с балансом хромосом (или *половым индексом*) $X : A=1$ представляют собой самок; отношение $X : 2A=0,5$ дает самцов; баланс хромосом с отношением от 1 до 0,5 определяет *интерсексуальность*.

От гинандроморфов интерсексы отличаются тем, что у них отсутствуют различно детерминированные по полу сектора. У интерсексов до определенного момента развития сохраняется генетически детерминированный пол, но затем развитие продолжается в направлении противоположного пола. В результате интерсексы отличаются от нормальных особей тем, что у них первичные и вторичные половые признаки носят промежуточный характер, образуя *непрерывный ряд переходов* от нормального самца к нормальной самке.

Таблица 2 – Определение пола у дрозофилы согласно балансовой теории

Пол	Число X-хромосом	Число наборов аутосом (А)	Половой индекс X : А
Сверхсамки	3	2	1,50
Нормальные самки:	4n	4	1,00
	3n	3	1,00
	2n	2	1,00
	n*	1	1,00
Интерсексы	2	3	0,67
Нормальные самцы	1	2	0,50
Сверхсамцы	1	3	0,33
Примечание - Звездочкой отмечены несуществующие гаплоидные особи, однако участки тканей такой структуры удавалось наблюдать в диплоидных особях. Эти участки имели женские признаки.			

Отношение трех X-хромосом к двум наборам аутосом $3X : 2A = 1,5$ ведет к развитию *сверхсамок*. Напротив, увеличение количества наборов аутосом на одну X-хромосому $X : 3A = 0,33$ определяет развитие *сверхсамцов*.

У сверхсамок и сверхсамцов признаки пола гипертрофированы, однако они бесплодны. Особи с генотипом $2A + XO$ выглядят как самцы, но они также бесплодны, т. к. в Y-хромосоме имеются гены, необходимые для нормального сперматогенеза.

Универсальность балансовой теории определения пола

Многочисленные факты подтверждают предложенную К. Бриджесом балансовую теорию определения пола. В современной интерпретации она гласит: пол особи определяется *балансом генов*, детерминирующих мужской и женский пол и локализованных в любых хромосомах.

Так, у *человека*, в отличие от дрозофилы, Y-хромосома играет большую роль в определении пола. При отсутствии Y-хромосомы и любом числе X-хромосом особь фенотипически определяется как женская. Наличие Y-хромосомы определяет развитие мужского пола. У *тутового шелкопряда* Y-хромосома сдвигает баланс, определяя женский пол, независимо от числа X-хромосом в кариотипе и степени ploидности.

Балансовая теория определения пола оказалась приложимой и к высшим растениям. У *дремы (Melandrium)* пол определяется прежде всего балансом X- и Y-хромосом. Изменение количества аутосом эффекта не дает.

В то же время известны случаи, когда пол особей определяется не балансом хромосом, а взаимодействием определенных генов. Например, у одного из видов наездника *Habrobracon*, родственного пчелам, мужской пол

может развиваться в результате комплементарного межallelельного взаимодействия двух генов.

Балансовая теория определения пола сейчас является *общепринятой*. Она показывает генетически обусловленную потенциальную *бисексуальность* всех раздельнополых организмов и их гамет. При этом механизмы, поддерживающие баланс генов, могут быть разными.

4. Роль условий среды в половой детерминации

Пол организма, как и любой признак, развивается, с одной стороны, под влиянием генотипа, с другой – факторов внешней среды. Для различных организмов влияние генотипа и факторов внешней среды на *определение пола* различно, т.е. у одних организмов (человек, большинство млекопитающих) *определяющим является генотип*, у других (рыбы, некоторые черви) – *факторы внешней среды*.

Так, у червя *Bonellia viridis* самка относительно большая, самец – малых размеров. Он постоянно живет в половых путях самки. Личинка червя бисексуальна, развитие самца или самки из такой личинки зависит от случая. Если личинка, ведущая свободный образ жизни, встретит свободную от самца самку и зафиксорируется на ней, она превратится в самца, а если осядет и прикрепится ко дну – в самку.

Другой пример: у *миссисипского крокодила* пол определяется в зависимости от температуры внешней среды.

Имеется и *третий, наиболее древний тип* определения пола, сохранившийся у обоеполых растений (однодомных) и у животных – гермафродитов – *определение пола в ходе онтогенетической дифференцировки*. Почему и как происходит дифференцировка различных частей одного организма в мужскую или женскую сторону не совсем ясно.

5. Соотношение полов и его регуляция

Известно первичное, вторичное и третичное соотношения полов.

Первичное – это *генетически определенное* соотношение полов. Так, у человека на 100 женских зигот образуется 140...160 мужских (сперматозоиды с Y-хромосомой быстрее и легче, чем с X-хромосомой).

Вторичное соотношение – это соотношение полов *в момент рождения*, оно изменяется на эмбриональной стадии развития (меньшая жизнеспособность мужских эмбрионов). У человека на 100 родившихся девочек приходится 103...105 мальчиков.

Третичное соотношение полов определяется *в постнатальный период*:

к 20 годам на 100 девушек приходится 100 юношей;
к 50 годам на 100 женщин – 85 мужчин;
к 85 годам – на 100 женщин - 50 мужчин. Отсюда напрашивается вывод о *большей жизнестойкости женского организма*, что может быть объяснено наличием в клетках женского организма в активном состоянии *обеих X-хромосом* (хотя и в разных клетках, т.е. мозаично).

В *естественных условиях* соотношение полов у разных организмов сильно колеблется. Можно найти примеры почти любого соотношения по полу, вплоть до $100♀ : 0♂$ и $0♀ : 100♂$. Причины могут быть как внешними так и генетическими (т.е. внутренними).

У ряда насекомых (некоторых видов дрозофилы, божьих коровок) найдены *однополые линии*. Самки этих линий дают исключительно *женское потомство*. При скрещивании это свойство наследуется по материнской линии. Оказалось, что в гемолимфе мух однополых линий имеется *спирохета*, которая избирательно поражает мужскую зиготу.

У дрозофилы в одной из аутосом обнаружен *рецессивный ген t*, который в гомозиготном состоянии превращает *женские зиготы* в *фенотипических самцов*; эти самцы оказываются стерильными.

Поиск таких генов имеет практический интерес для целенаправленного формирования генотипов с заданными свойствами.

Разработаны и методы *искусственного регулирования* соотношения полов. Так, Б. Л. Астауров у тутового шелкопряда вызывал партеногенез действием высокой температуры, в потомстве получалось 100% самок. При искусственном андрогенезе все потомство только мужского пола.

В *животноводстве* применяют искусственное регулирование соотношения полов у кроликов, собак и др. путем *разделения спермы* с помощью электрофореза и последующего искусственного осеменения самок «катодной» или «анодной» спермой. Применяется также *иммунизация* самцов или самок разделенной спермой.

6. Молекулярно-генетические механизмы половой детерминации и компенсации дозы генов

Каким же образом соотношение числа X-хромосом и аутосом, согласно балансовой теории Бриджеса, может определять развитие пола?

Рассмотрим, как это происходит у *дрозофилы*. Формирование пола у нее определяют многие гены, в том числе:

Sxl (sex lethal) – расположен на X-хромосоме, он самый важный, *мастер-ген*;

Sis – a u b (sisterless) – расположены на X-хромосоме;

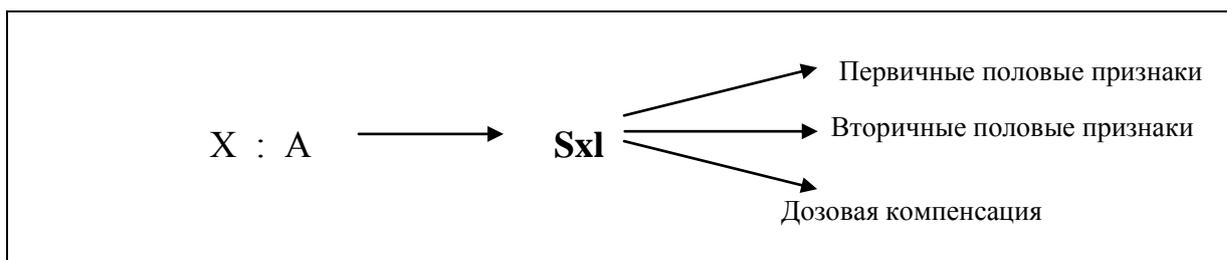
da (daughterless) – расположены на аутосоме.

На начальных этапах формирования пола у эмбрионов действуют гены *sis-a*, *sis-b* и *da*. Белковые продукты этих генов образуют **комплексную молекулу**, которая включает транскрипцию гена *Sxl*.

Количество этих комплексных молекул зависит от дозы генов; доза генов в организме самки на ранней стадии развития эмбриона, когда еще не включен механизм **дозовой компенсации**, в 2 раза больше, чем в организме самца, поэтому ген *Sxl* включается только у зародышей **самок**. Продукт этого гена, в свою очередь, запускает **каскад других генов**; образующиеся белки направляют развитие в сторону формирования самки. Дифференцировка пола идет при этом по 3^м направлениям (см. схему).

В организме зародыша **самца** количество **комплексных молекул** в 2 раза меньше и они могут запустить транскрипцию гена *Sxl* только с другого, более **позднего промотора**. В этом случае образуются **другие транскрипты** (с иными экзонами), другие белки, развитие идет по мужскому типу.

Схема – Баланс хромосом и дифференцировка пола



У **млекопитающих** решающую роль в определении пола играет **Y-хромосома**. В ее коротком плече расположен ген ***SRY*** (эс-рай) (*sex determining region of Y*).

Ген ***SRY*** содержит **консервативный домен**, общий для всех млекопитающих, кодирующий фрагмент белковой молекулы размером 80 аминокислотных остатков. Этот продукт специфически связывается с ДНК, приводя к **изгибанию** ее молекулы. Такая деформация ДНК механически передается на достаточно большое расстояние и играет важную роль в регуляции транскрипции.

Теперь о компенсации дозы генов и ее механизмах

У самцов дрозофилы, как и у самцов млекопитающих гены, локализованные в X-хромосоме, представлены в **одной дозе**, а у самок – в **двух**.

Если бы транскрипция этих генов происходила с одинаковой интенсивностью, количество их продуктов (т. е. белков) у самок было бы вдвое большим, чем у самцов. Однако этого не происходит.

Существуют *механизмы компенсации дозы генов*. Теоретически возможны **2 варианта**: транскрипция X-хромосомных генов происходит вдвое интенсивнее у самцов, или же одна из X-хромосом у самок полностью инактивирована. Природа использовала оба механизма.

У *дрозофилы* единственная X-хромосома самца дополнительно *активируется* до уровня транскрипции двух X-хромосом самки, а у *млекопитающих* *инактивируется* одна из X-хромосом.

X-хромосома у *самца дрозофилы* имеет более *рыхлую* и *деспирализованную* структуру, чем каждая из X-хромосом самки. В этом участвуют не менее 5 белков и 2 вида РНК. Один из этих белков – **MSL-2** (о нем будет сказано ниже). Среди белков есть и *ацетилтрансфераза*, которая ацетилирует *гистон H4*, в результате чего он приобретает способность не упаковывать ДНК в нуклеосому, а деспирализовать ее. Есть там и белок типа **геликазы**, расплетающий 2 цепи ДНК.

В разрыхлении X-хромосомы самца участвуют также молекулы **РНК нового класса**, открытого в 1997 г. Это так называемые РН *roX (RNA on X-chromosome)*, которые синтезируются только у самцов.

Данные молекулы РНК вступают в комплекс с несколькими вышеупомянутыми белками, сотни **комплексов** связываются с X-хромосомой в определенных участках, а затем перемещаются вдоль по X-хромосоме; происходит *ацетилирование* гистонов H4, *разрыхление хроматина* с последующей гиперактивацией транскрипции.

Ключевым геном для запуска всей системы дозовой компенсации у *дрозофилы* является уже известный *Sex lethal (Sxl)*. У самок он включен, у самцов – выключен, поэтому в отсутствие продукта этого гена образуется белок **MSL-2**, который обязательно нужен для образования вышеупомянутых комплексов *roX-белки*.

Компенсация дозы генов у млекопитающих

Дозовая компенсация у млекопитающих происходит в результате инактивации одной из X-хромосом у самок.

В 1949 г. **М. Барр** обнаружил компактные глыбки хромосомного материала в *ядрах нервных клеток у кошек*, у котов таких глыбок не было. По имени исследователя эти структуры были названы *тельцами Барра*. Через 10 лет выяснилось, что тельце Барра формируется из одной X-хромосомы в соматических клетках самок всех млекопитающих.

В 1961 г. **Мэри Лайон** сделала вывод о том, что образование телец Барра – это и есть *механизм дозовой компенсации* генов, локализованных в X-хромосомах млекопитающих.

Процесс инактивации X-хромосом у самок млекопитающих был назван *лайонизацией*. Лайонизация X-хромосомы у *человека* происходит в раннем эмбриональном развитии *на 16-е сутки*. Инактивированная X-хромосома неактивна на протяжении всей жизни организма; относится к гетерохроматину.

Теперь о тонком механизме лайонизации. Оказалось, что в X-хромосомах млекопитающих существует особый центр инактивации (*Xic – X chromosome inactivation center*). Инактивация начинается в этом единственном центре и затем прогрессивно распространяется вдоль всей X-хромосомы. Она происходит по закону «все или ничего». Установившись однажды в эмбриогенезе, неактивное состояние X-хромосомы передается дочерним клеткам во всех последующих клеточных генерациях.

Длина ДНК, занимаемой центром *Xic*, составляет примерно 1 млн п.н. Этот район содержит несколько генов. Из них важнейший – *Xist (X-inactive-specific transcript)* – ген, кодирующий длинную *некодирующую РНК*, которая необходима для инактивации X-хромосомы.

Образующиеся молекулы этой *Xist - РНК* связываются с ДНК X-хромосомы в особых участках, которые есть **только** в X-хромосомах (их совсем нет в других хромосомах); это так называемые «*участки усиления и передачи сигналов*». Затем разобщенные пространственно молекулы *Xist – РНК* объединяются **в единый комплекс друг с другом и с белками ядерной ламины**. В результате такого взаимодействия ДНК данной X-хромосомы «*складывается*», происходит компактизация ее структуры и связывание с ядерной оболочкой, т.е. образуется тельце Барра.

Таким образом, механизмы дозовой компенсации у млекопитающих и дрозофилы противоположные; в первом случае это компактизация ДНК и подавление транскрипции (и связанная с этим поздняя репликация), а во втором случае – разрыхление структуры ДНК, гипертранскрипция и, как побочный эффект, ранняя репликация ДНК.

Лекция № 7

Тема лекции: Нехромосомное (цитоплазматическое) наследование

План лекции:

1. Основные закономерности и примеры цитоплазматического наследования у эукариот
2. Геном митохондрий
3. Геном хлоропластов

1. Основные закономерности и примеры цитоплазматического наследования у эукариот

Сначала основное определение:

Нехромосомное, или **цитоплазматическое** наследование – это наследование, которое определяется генетическими элементами цитоплазмы (в отличие от хромосомного, или ядерного). К генетическим элементам цитоплазмы у эукариот относятся геномы **митохондрий** и **хлоропластов**.

Основные **закономерности** цитоплазматического наследования:

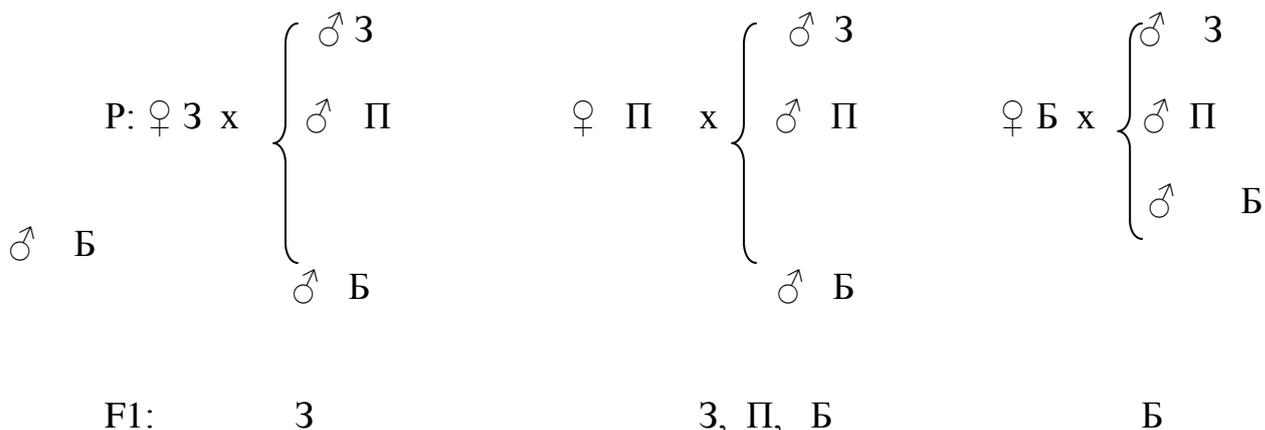
1. Цитоплазматическое наследование осуществляется **по материнской линии**. Это связано с тем, что яйцеклетка имеет много цитоплазмы с содержащимися в ней элементами наследственности, а в мужской половой клетке цитоплазма практически отсутствует.

2. **Отсутствие строгих количественных закономерностей расщепления**. Причина этого в том, что для органоидов цитоплазмы нет такого тонкого механизма распределения при делении клеток, какое существует для хромосом; количество органоидов непостоянно, а деление цитоплазмы не совсем равномерное.

Основоположниками изучения цитоплазматической наследственности являются немецкие генетики **К. Корренс** и **Э. Баур**. В 1908 г. они изучали наследование признака **пестролистности** у растения **ночная красавица** (*Mirabilis jalapa*). У этого вида встречаются пестролистные растения, которые имеют в точках роста разные группы клеток: **с неокрашенными пластидами**, неспособными к образованию хлорофилла, и **с нормальными (зелеными) пластидами**. Вследствие этого иногда на растении образуются чисто зеленые или совершенно белые ветви. Семена, полученные с белых ветвей, дают нежизнеспособные всходы, так как у них не идет процесс фотосинтеза.

При опылении цветков с пестролистных ветвей пыльцой от цветков с зелеными ветвями и при реципрокном скрещивании результаты получаются

различными. В первом случае (♀ *пестролистное* \times ♂ *зеленое*) гибридные растения развиваются *пестролистными*, *зелеными* или *белыми* (гибнут). При реципрокном скрещивании (♀ *зеленое* \times ♂ *пестролистное*) в потомстве все растения оказываются *зелеными*. Цветки с зеленых ветвей дают только зеленое потомство, а с белых – белое (нежизнеспособное), независимо от того, пыльцой с каких растений они опылялись.



Был сделан вывод, что наследование пестролистности связано с передачей и распределением при клеточных делениях *двух типов пластид* - зеленых и неокрашенных, причем передаются пластиды через *яйцеклетку*, в результате чего наследование осуществляется *по материнской линии*.

Исключение: у герани (*Pelargonium zonale*) пластиды передаются не только яйцеклеткой, но и спермием, содержащим цитоплазму. При этом пестролистность наследуется не только по материнской, но и по отцовской линии.

Механизм формирования белых, зеленых и пестрых частей растений определяется *характером их распределения* при клеточном делении (см. схему). Если клетка, имеющая два сорта пластид, разделится по линии АБ, то образуются две клетки, которые дадут два участка (белый и пестрый), при разделении по линии ВГ – зеленые и пестрые.

Другой пример цитоплазматического наследования – **наследование митохондрий**.

У некоторых грибов (дрожжи, нейроспора) была обнаружена дыхательная недостаточность, связанная с тем, что в результате мутации в их митохондриях не вырабатывалась *цитохромоксидаза*. Такие клетки давали **карликовые колонии** на питательном агаре.

Б. Эфрусси в 1949 г. обнаружил *гаплоидные штаммы* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые образовывали *карликовые колонии* при вегетативном размножении.

При их скрещивании с *нормальными (тоже гаплоидными) дрожжами* формируется диплоидная **зигота**. Из нее путем мейоза образуются 4 *гаплоидные аскоспоры*, из которых образуются *нормальные* колонии, что подтверждает цитоплазматический характер наследования.

Еще один пример – явление **цитоплазматической мужской стерильности**, обнаруженное у многих растений – кукурузы, лука, свеклы, льна и др. Цитоплазматическая мужская стерильность у кукурузы была открыта в 30-х годах одновременно в СССР **М.И. Хаджиновым** и в США **М. Родсом**.

Кукуруза – *однодомное* растение, женские цветки у нее собраны в *початок*, мужские – в *метелку*. У некоторых сортов кукурузы были обнаружены растения, имевшие в метелках недоразвитые пыльники, часто совершенно пустые.

Оказалось, что этот признак определяется особенностями цитоплазмы. Опыление растений с мужской стерильностью нормальной пылью с других растений в большинстве случаев дает в потомстве растения со стерильной пылью. При повторении этого скрещивания в течение ряда поколений признак мужской стерильности не исчезает, передаваясь по *материнской линии*. Это послужило убедительным доказательством того, что наследование данного признака осуществляется через цитоплазму и связано с **плазмидой**.

*Интересно, что генотип растения может оказывать влияние на экспрессию генов фактора мужской стерильности, не влияя на его сохранение в цитоплазме. Пыльца может быть стерильной только при наличии в генотипе растения рецессивного гена **rf** в гомозиготном состоянии **rf rf**. Если же этот ген представлен доминантной аллелью **Rf**, то растение имеет нормальную пыльцу. Аллель **Rf** является, таким образом, подавителем генов фактора мужской стерильности.*

От цитоплазматического наследования следует отличать **предетерминацию цитоплазмы** – это такие изменения свойств цитоплазмы, которые могут наследоваться, но *не связаны* с генетическими элементами цитоплазмы.

Пример генотипической предетерминации цитоплазмы

Наследование **направления завитка раковины** у пресноводного моллюска **прудовика** (*Limnaea*). Встречаются раковины двух типов: *левозакрученные* и *правозакрученные*. Направление закручивания раковины определяется одной парой аллелей: правозакрученность **D** доминирует над левозакрученностью **d**.

При реципрокных скрещиваниях гибриды F_1 , имеющие один и тот же генотип **Dd**, различаются по фенотипу. В скрещивании ♀**DD** × ♂**dd** все гибридные особи имеют *материнский* тип завитка – правозакрученные ракови-

ны. В скрещивании ♀ **dd** x ♂ **DD** потомство также имеет материнский тип завитка, т.е. левозакрученную раковину.

При этом типе наследования **фенотип потомков** соответствует **генотипу матери**, в не **генотипу зигот**, их которых они развиваются, т.е. организм матери воздействует на цитоплазму яйцеклетки еще до ее оплодотворения через белки, поступающие из окружающих ее клеток. Результатом этого воздействия является та или иная **ориентация митотического веретена** при втором делении дробления, т.е. определенное расположение **центриолей**. А от этого в конечном счете зависит направление завитка раковины.

Ну и, наконец, известны примеры **псевдоцитоплазматической наследственности**, когда через цитоплазму передаются различные субмикроскопические инфекционные частицы (вирусы, бактерии, риккетсии), которые могут размножаться в цитоплазме и тем самым **имитировать** цитоплазматическое наследование.

Примеры:

- 1) у мышей некий вирус вызывает рак молочной железы; передается по материнской линии через молоко (**фактор молока**);
- 2) **безсамцовые** линии у дрозофилы – в их клетках живет спирохета, вызывающая гибель самцов на стадии зародыша;
- 3) у парамеций в цитоплазме имеются включения (риккетсии), названы **каппа-частицами**: продуцируют **парамецин**, который убивает инфузорий, не несущих каппа-частиц.

2. Геном митохондрий

Митохондрии – «энергетические станции» клетки, ответственные за продукцию АТФ путем окислительного фосфорилирования (ОФ). Внутренняя мембрана митохондрий образует **кристы**, на которых располагаются грибообразные **АТФ-сомы**. В них-то и содержатся белки ОФ, в том числе **АТФ-синтетаза**.

Большинство полипептидов, участвующих в процессе ОФ, а их **более 70**, кодируются **ядерной ДНК**. После сборки на рибосомах клетки (80S) они транспортируются в митохондрии. Лишь небольшое число полипептидов (около 10) кодируется **митохондриальным геномом**.

В отличие от белков, **все транспортные РНК (22 типа)**, участвующие в синтезе белка *in situ*, являются продуктом самих митохондрий. Кроме того, митохондриальная (мтДНК) кодирует **два типа рРНК**.

ДНК в митохондриях двуспиральная, кольцевая, суперскрученная и, как правило, имеет большее содержание G C-пар, чем ядерная.

У животных размер мтДНК обычно менее 20 тпн: у человека – 16 569 пн, у дрозофилы – 18 400 пн. У дрожжей размер мтДНК существенно больше – около 80 тпн, а у растений еще больше – 100 – 2000 тпн.

В матриксе митохондрии есть **нуклеиды**, подобные таковым в бактериальных клетках, каждый из которых содержит по несколько копий мтДНК: например, в клетках дрожжей каждая митохондрия имеет 10-30 нуклеоидов, и в каждом находится 4-5 молекул ДНК. Поскольку у дрожжей в одной клетке содержится от 1 до 45 митохондрий, в ней может быть от 40 до 6750 молекул, т.е. **суммарное количество мтДНК** в клетке может достигать 540 000 тпн, что примерно **в 40 раз** больше количества **ядерной ДНК** (13990 тпн).

Всего в диплоидных клетках дрожжей S. cerevisiae имеется 16 пар хромосом. Хромосомы дрожжей очень маленькие (от 229 до 1530 тпн), их даже нельзя увидеть в световой микроскоп. В геноме дрожжей выявлено 6085 генов, т.е. ~ 1000 пн на 1 ген. Геном E.coli – 4639 тпн и ~ 4290 генов.

Теперь более подробно о **митохондриальной ДНК человека**. Она представляет собой замкнутую двухцепочечную спираль. Цепи сильно различаются по содержанию нуклеотидов G и C, причем **гуанин-богатая тяжёлая цепь (H)** – это главная **кодирующая** цепь, содержащая гены рРНК, большинства белков и тРНК, в то время как **цитозин-богатая легкая цепь (L)** включает лишь один структурный ген белка (ND6) и 8 из 22 генов тРНК. Всего имеется 37 митохондриальных генов (13 генов белков ОФ, 2 гена рРНК и 22 гена тРНК).

Интересно, что **митохондриальный геном млекопитающих** по своей структуре имеет большее **сходство с геномом прокариот**, чем с геномом эукариот: митохондриальные гены лишены интронов и транскрибируются **двумя большими блоками** всего лишь **с двух промоторов** в виде двух длинных информационных РНК. Гены тРНК располагаются между структурными генами, отделяя их друг от друга.

Репликация и транскрипция начинаются **в контрольном районе (КР)**, который состоит из 1122 пн. В этом районе сконцентрировано большинство **регуляторных**, т.е. **некодирующих** последовательностей.

Данные по секвенированию индивидуальных мтДНК из разных популяций человека выявили высокую степень вариабельности контрольного района. Гипервариабельные сегменты составляют в нем примерно 710 пн.

Репликация H-цепи мтДНК начинается с синтеза **7S ДНК**- короткого сегмента, который сразу же спаривается с родительской цепью. В результате образуется **трехцепочечный район** - так называемая **D-петля**. Пройдя 2/3 генома вдоль L-цепи, репликация достигает **точки инициации репликации**

легкой цепи (O_L). Синтез L-цепи идет в **обратном направлении** вдоль матрицы H-цепи. **Разнонаправленность и асинхронность** – отличительные особенности процесса репликации митохондриальной ДНК.

Транскрипция митохондриального генома человека также имеет свои особенности. Каждая цепь считывается, начиная с соответствующего **промотора** P_L , P_{H1} и P_{H2} , которые расположены в контрольном районе.

Сначала **особый белок расплетает** мтДНК. Специфическая **мтРНК-полимераза** движется вдоль расплетенной цепи и образует 2 протяженные молекулы **полицистронной мРНК**. Затем специфическая **эндонуклеаза** разрезает полицистронную РНК, высвобождая рибосомальные, транспортные и матричные РНК.

Трансляция митохондриальной мРНК происходит на **55S рибосомах** митохондрий, каждая из которых состоит из одной большой (**39S**) и одной малой (**28S**) субъединиц. Полисомы здесь не образуются.

Митохондриальная ДНК млекопитающих имеет **уникальный**, отличный от ядерного **генетический код**, где, например, **UGA** кодирует триптофан, **AGA** и **AGG** являются **стоп-кодонами**.

3. Геном хлоропластов

Геномы хлоропластов и митохондрий похожи. ДНК хлоропластов (**хпДНК**) тоже двунигчатая, кольцевая, сверхскрученная. Размеры молекулы хпДНК составляют 80-600 тпн.

Число копий хпДНК на одну клетку, например, в листьях свеклы, составляет 4-8 на нуклеоид, при этом 4-18 нуклеоидов находятся в одном хлоропласте, а в клетке – примерно 40 хлоропластов. В итоге в каждой клетке может быть до 6000 молекул хпДНК.

Геномы хлоропластов у высших растений варьируют по длине, но имеют общие черты. В геноме есть так называемые **инвертированные повторы** (IR_A и IR_B). Гены, находящиеся в составе этих повторов, присутствуют в геноме в двух копиях, в их число входят гены всех 4-х рРНК. Более короткая область ДНК, расположенная **между инвертированными повторами**, называется **«короткая однокопийная последовательность»**, или **SSC** (*short single copy sequence*), а с противоположной стороны находится **LSC** (*long single copy sequence*) - **«длинная однокопийная последовательность»**.

Рассмотрим в качестве примера генетическую карту хлоропластной ДНК печеночного мха *Marshantia polymorpha*. Синим цветом показаны гены, кодирующие продукты, участвующие в трансляции (rpl и rps- белки большой (large) и малой (small) субъединиц рибосом; 4.5; 5; 16 и 23S – рРНК); красным – гены субъединиц РНК – полимеразы; зеленым- гены белков фотосин-

теза; желтым- ген пермеазы. Имеются также гены 32-х типов тРНК (на схеме не показаны). Часть белков, необходимых для фотосинтеза и других функций хлоропластов, поступает из клетки.

В некоторых генах, кодирующих белки и тРНК, найдены *интроны*. Все мРНК, которые образуются в геноме хлоропластов, транслируются на *собственных рибосомах* хлоропластов.

В заключение необходимо сказать, что геном митохондрий и пластид называется *плазмон*, в отличие от генома ядерного, а их гены – *плазмогены*.

Лекция № 8

Тема лекции: Основные закономерности изменчивости

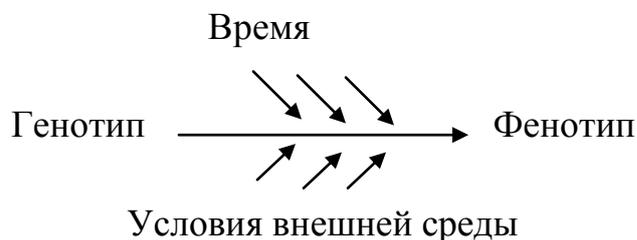
План лекции:

1. Классификация типов изменчивости
2. Мутационная теория де Фриза
3. Множественный аллелизм
4. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости
Н.И. Вавилова
5. Классификация мутаций
6. Плейотропный эффект мутаций
7. Экспрессивность и пенетрантность мутаций
8. Условные мутации
9. Методы учета мутаций
10. Спонтанные и индуцированные мутации
11. Генные мутации

1. Классификация типов изменчивости

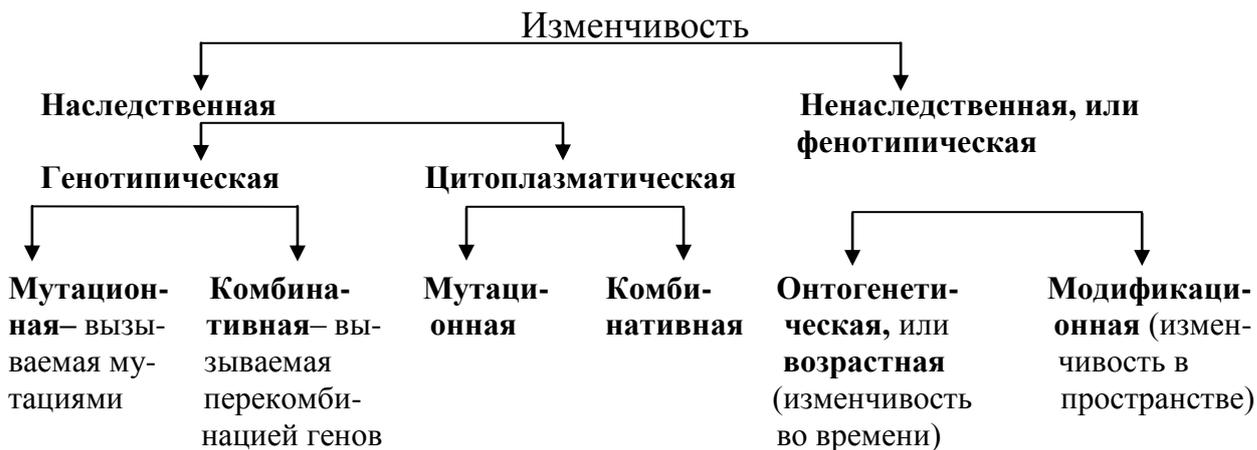
Изменчивость – способность живых организмов *изменяться* в процессе развития или *существовать в различных формах* (вариантах). *Изменяться* означает приобретать новые признаки или утрачивать старые.

Прежде чем переходить к классификации типов изменчивости, давайте вспомним, что такое генотип и фенотип. Генетики говорят: «**Фенотип** формируется на основе **генотипа** под влиянием времени и условий внешней среды». Это положение хорошо иллюстрирует следующий рисунок:



Из этого рисунка следует, что фенотип может изменяться при изменении условий внешней среды (это **модификационная** изменчивость), в процессе онтогенеза (**онтогенетическая** изменчивость) и при изменении самого генотипа (**генотипическая** изменчивость).

Схема – Типы изменчивости



Наследственная изменчивость связана с изменением генетического материала, а **ненаследственная** – не связана. При этом **онтогенетическая** изменчивость приводит к возрастным изменениям, а **модификационная** – связана с разнообразием проявлений одного генотипа в разных условиях внешней среды.

Примеры модификационной изменчивости: различия у **однояйцевых близнецов**, живущих в разных семьях, или у растений на **хлебном поле**.

Особняком стоит **цитоплазматическая** изменчивость, которую мы изучали ранее.

Все эти типы изменчивости наглядно изображены на рисунке, где показана изменчивость листьев земляники (род *Fragaria*).

В центре (**по вертикали**) показано изменение листа в онтогенезе от однолопастного до трехлопастного. Это – **онтогенетическая** изменчивость (изменчивость во времени).

Но в каждый момент онтогенеза (**по горизонтали**) степень выраженности признака может быть различной. Так, однолопастный лист может иметь разные размеры и разное число зубчиков и т.д. Это – **модификационная** изменчивость (изменчивость в пространстве).

Если же в гаметах родительских особей произойдет изменение гена, то листья растения, развивающегося из такой зиготы, могут быть однолопастными в течение всего онтогенеза. Это – **мутационная** изменчивость (на рисунке слева).

При скрещивании комбинация нескольких генов в генотипе может привести к образованию пятилопастного листа. Это – **комбинативная** изменчивость (на рисунке справа).

На рисунке для упрощения не показаны онтогенетическая и модификационная изменчивость в пределах мутационной и комбинативной.

Наследственная изменчивость является источником **генетического разнообразия** и исходного материала для эволюции и селекции. **Ненаслед-**

ственная изменчивость обеспечивает *пластичность* организмов, их *приспособление* к варьирующим условиям внешней среды. Этим она важна для эволюции.

2. Мутационная теория Де Фриза

Термин «*мутация*» впервые был предложен Г. Де Фризом в его классическом труде «Мутационная теория» (1901-1903).

Мутация – это скачкообразное стойкое ненаправленное изменение генетического материала.

Такие изменения были известны еще Ч.Дарвину. Он называл их *неопределенными изменениями* и придавал им большое значение в эволюции. Однако теория мутаций была сформулирована позже Де Фризом. До сих пор не утратили своего значения *основные положения его теории*:

1. Мутация возникает *скачкообразно*, т.е. внезапно, без переходов.
2. Образовавшиеся новые формы наследуются, т.е. являются *стойкими*.
3. Мутации *ненаправленны* (т. е. могут быть полезными, вредными или нейтральными).
4. Мутации – *редкие* события.
5. Одни и те же мутации могут возникать *повторно*.

Однако Де Фриз необоснованно противопоставил теорию мутаций теории естественного отбора. Он ошибочно считал, что мутации могут сразу приводить к образованию новых видов. На самом деле мутации являются лишь материалом для длительного отбора, результатом которого может стать возникновение нового вида.

3. Множественный аллелизм

До сих пор мы с вами считали, что один и тот же локус гомологичных хромосом может быть представлен двумя аллелями: *A* и *a*, *B* и *b*, *C* и *c* и т.д. На самом деле один и тот же ген может мутировать в несколько состояний; иногда таких состояний бывает несколько десятков и даже сотен. Ген *A* может мутировать в состояние $a^1, a^2, a^3 \dots a^n$. Ряд мутаций одного и того же локуса называют *серией множественных аллелей*, а само явление наличия в популяции множества аллелей одного гена – *множественным аллелизмом*.

Любой аллель такой серии может возникать мутационно непосредственно от аллеля дикого типа или от любого другого.

Наследование множественных аллелей подчиняется менделевским закономерностям. При этом, в отличие от генов, для которых известно только

два состояния, сочетание двух разных мутантных аллелей одного локуса в гетерозиготе называется *компаундом*.

Примеры множественного аллелизма

У норки существует серия множественных аллелей *по окраске шерсти*: *коричневая* (дикий тип), *платиновая* (серебристо-голубая) и *белая*. Ген окраски шерсти у норки обозначается буквой **P**: *PP* – коричневая; *pp* – платиновая; *p^hp^h* – белая. Характер доминирования: $P > p > p^h$.

У человека известна серия аллелей, определяющих *группы крови*: I^0, I^A, I^B . Аллели I^A и I^B кодоминантны, а I^0 рецессивен по отношению к ним.

У дрозофилы известно около 350 аллелей гена *white*. Фенотипы этих мутантов варьируют в очень широких пределах: от нормального цвета глаз до полного отсутствия пигмента.

Распространенность множественного аллелизма среди организмов обусловлена тем, что это явление увеличивает *резерв* генотипической изменчивости, а потому важно для эволюции.

Вообще говоря, принципиальной разницы между нормальным геном (диким типом) и мутантными генами не существует. Многие гены, свойственные диким формам вида, также были когда-то мутантными, а затем благоприятные мутантные аллели в ходе эволюции вида распространились до такой концентрации, что каждая особь вида стала их носителем.

4. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова

Следующим после Де Фриза серьезным исследованием мутаций была работа Н.И. Вавилова по наследственной изменчивости у растений.

Изучая морфологию различных растений, **Н.И Вавилов** в 1920 г. пришел к выводу, что, несмотря на резко выраженное *разнообразие (полиморфизм) многих видов*, можно заметить и четкие *закономерности в их изменчивости*. Если взять для примера семейство злаков, то окажется, что одинаковые отклонения признаков присущи всем видам (карликовость у пшеницы, ржи, кукурузы; колоски безостые, неосыпающиеся и т.д.).

Закон Н. И. Вавилова гласит: «Виды и роды, *генетически близкие*, характеризуются *сходными рядами наследственной изменчивости* с такой правильностью, что, зная ряд форм в пределах одного вида, можно *предвидеть нахождение параллельных форм* у других видов и родов».

Свой закон Н.И. Вавилов выразил формулой:

$$G_1(a_1 + b_1 + c_1 + \dots),$$

$$G_2(a_2 + b_2 + c_2 + \dots),$$

$$G_3(a_3 + b_3 + c_3 + \dots),$$

где G_1, G_2, G_3 , – виды, а a, b, c – различные варьирующие признаки.

Этот закон важен прежде всего для *селекционной практики*, потому что позволяет *прогнозировать* наличие мутантных форм, не известных у растений данного вида, если они уже известны у других видов.

Н. И. Вавилов положил закон гомологических рядов в наследственной изменчивости в основу поиска новых форм растений. Под его руководством были организованы многочисленные экспедиции по всему миру. Из разных стран были привезены сотни тысяч образцов семян культурных и диких растений для коллекции Всесоюзного института растениеводства (ВИР). Она до сих пор является важнейшим источником исходных материалов при создании новых сортов.

Теоретическое значение этого закона состоит в признании *родства* тех живых организмов, которые имеют сходные ряды наследственной изменчивости (обратный ход мысли). Этот подход нашел применение в *эволюционной биологии*, причем не только при изучении растений, но и при сравнении животных и даже географических подвидов человека.

Кроме того, в законе Н.И. Вавилова содержалось *предвидение* того, что у близкородственных видов должны быть *гомологичные*, т.е. сходные по структуре гены. В тот период, когда о структуре гена ничего не было известно, это был шаг вперед в познании живого («периодический закон Д. И. Менделеева в биологии»). Молекулярная генетика, секвенирование генов подтвердили правильность догадки Н.И. Вавилова, его идея стала очевидным фактом и попрежнему является ключом к познанию живого.

5. Классификация мутаций

Наиболее полную классификацию мутаций предложил в 1989 г. С. Г. Инге-Вечтомов. Приводим ее с некоторыми дополнениями.

I. По характеру изменения генотипа:

1. Генные мутации, или точковые.
2. Хромосомные перестройки.
3. Геномные мутации.

II. По характеру изменения фенотипа:

1. Морфологические.
2. Физиологические.
3. Биохимические.
4. Поведенческие

III. По проявлению в гетерозиготе:

1. Доминантные.
2. Рecessивные.

IV. По условиям возникновения:

1. Спонтанные.
2. Индуцированные.

V. По локализации в клетке:

1. Ядерные.
2. Цитоплазматические (мутации внеядерных генов).

VI. По возможности наследования (по локализации в организме):

1. Генеративные (возникшие в половых клетках).
2. Соматические (возникшие в соматических клетках).

VII. По адаптивному значению:

1. Полезные.
2. Нейтральные.
3. Вредные (летальные и полулетальные).

VIII. Прямые и обратные.

Теперь дадим пояснения по некоторым типам мутаций.

Классификация мутаций по характеру изменения фенотипа

Морфологические мутации (часто их называют *видимыми*) связаны с изменением в строении органов, тканей или отдельных структур клетки. К ним относятся: *коротконогость* у крупного рогатого скота и овец; *безглазость* и *бескрылость* у насекомых; *бесшерстность* у млекопитающих; *неопушенность* различных органов у растений; *гигантизм*, *карликовость*, *альбинизм* у человека и др.

Физиологические мутации вызывают изменения физиологических процессов. Типичный пример – мутация, вызывающая у мышей «*вальсирующие*» движения.

К **биохимическим** относятся мутации, изменяющие или полностью блокирующие синтез определенных веществ в организме. Наиболее хорошо они изучены у микроорганизмов. Многие мутанты (*ауксотрофы*) не растут без введения в среду некоторых веществ, в отличие от **прототрофов** – организмов дикого типа, которые способны синтезировать все необходимые им вещества и растут на минимальных средах (содержат только минеральные соли и углеводы).

Классификация мутаций по фенотипу *очень условна*. В основе **любых мутаций** всегда лежат изменения **биохимических процессов**. Конкретный пример: наследственное заболевание **фенилкетонурия** проявляется как умственная неполноценность, т.е. это – *физиологическая мутация*, но связана с

нарушением синтеза тирозина из фенилаланина и накоплением фенилпири-виноградной кислоты, которая блокирует цепи ряда реакций и в конечном счете является причиной слабоумия.

Классификация мутаций Г. Мёллера

При **гипоморфных** мутациях измененные аллели действуют в том же направлении, что и аллель дикого типа, *но дают ослабленный эффект*. Например, особи с двумя летальными мутациями в гомозиготе выживают, но гемизиготы (особи, у которых одна хромосома несет мутацию, а вторая отсутствует) гибнут. В данном случае мутантный аллель действует в *направлении обеспечения жизнедеятельности*, но его действия не хватает. Увеличение дозы мутантного гена ведет к восстановлению признака дикого типа.

Аморфные мутации проявляются в фенотипе как потеря признака. Пример – аморфная мутация *w*. Фенотип – **белые глаза** – обусловлен полной потерей функции гена, который контролирует транспорт пигмента в клетки глаза.

Антиморфные мутации изменяют фенотип дикого типа на противоположный. Например, у кукурузы ген *A* (дикий тип) обеспечивает **пурпурный** цвет растений и семян из-за наличия *антоциана*. Аллель *a^p* (антиморф) действует в противоположном направлении, что проявляется в формировании **бурой** окраски и блокировании образования антоцианов.

Неоморфные мутации – фенотип мутантов совершенно отличен от дикого. Например, мутация *Antp* у дрозофилы приводит к формированию ноги на голове, на месте антенны.

Гиперморфные мутации – у этих мутантов количество биохимического продукта резко увеличивается. Пример: окраска глаз у дрозофилы:

красная → эозиновая → темно – красная.

Генеративные и соматические мутации

Мутации могут возникать в любой клетке многоклеточного организма. Те из них, которые возникают в гаметах, называются **генеративными**. Мутации, возникающие в соматических клетках, называются **соматическими**.

Генеративная мутация может возникнуть на любом этапе развития половых клеток. Если это происходит *на ранних стадиях*, то число мутантных клеток пропорционально числу клеточных делений после появления мутации. В этом случае мутацию несет целая группа половых клеток; их называют **пучком мутаций**. Мутации, возникшие *на последних этапах* развития половых клеток, остаются **единичными**.

Соматическая мутация проявляется *мозаично*. Особи, несущие участки мутантной ткани, называют **мозаиками**, или **химерами**. Чем раньше в онтогенезе возникает соматическая мутация, тем большим оказывается участок

ткани, несущий данную мутацию, и чем позднее – тем меньшим. *Пример:* соматическая мутация окраски *шерстного покрова у овцы* – черное пятно на фоне коричневой окраски. Подобные явления иногда встречаются у растений, животных и человека.

Соматические и генеративные мутации различаются *возможностью наследования: генеративные* всегда передаются по наследству. У *соматических* мутаций две судьбы:

а) они не сыграют роли в наследственности, если организм размножается исключительно половым путем;

б) они могут передаться потомству, если организм способен размножаться бесполом путем, например, при вегетативном размножении у растений.

Одним из видов соматических мутаций у растений являются **почковые мутации**, возникающие в меристемных клетках **точки роста** стебля. В этом случае весь побег, развившийся из этой клетки, в том числе цветков, будет нести мутантный признак. Почковые мутации были известны давно и назывались **спортами**.

Соматические мутации могут вызывать *злокачественные опухоли* у человека и животных. Они имеют также отношение к процессам *старения*, так как с возрастом может происходить накопление физиологических мутаций.

Классификация мутаций по адаптивному значению

Летальные и ***сублетальные*** мутации вызывают гибель или снижение жизнеспособности организма. Мутации, увеличивающие жизнеспособность особей, повышающие плодовитость, относят к ***полезным***. *Пример* – мутация, приводящая к увеличению синтеза антибиотиков в клетках грибов – продуцентов антибиотиков: она увеличивает вероятность выживания таких клеток среди других микроорганизмов. Мутации, которые не влияют на вероятность выживания особи или оставления ею потомства, называются ***нейтральными***.

Классификация мутаций по их адаптивному значению также условна, так как при изменении условий внешней среды мутации из полезных могут стать вредными и наоборот. У дрозофилы мутанты *с белыми глазами* в нормальных условиях обладают пониженной жизнеспособностью по сравнению с мухами дикого типа. *При повышении температуры* белоглазые мухи оказываются более приспособленными и успешно конкурируют с красноглазыми. Другой пример: ***ярко-зеленый хлорофилльный мутант*** (полезная мутация) у ячменя, который давал значительно больший урожай на севере *Швеции*. На юге эта мутация оказалась нейтральной.

Признаки, ***полезные*** с точки зрения *хозяйственной*, могут быть нейтральными или даже ***вредными биологически***. Например, мутация у гриб-

ков по способности синтезировать *антибиотик* хозяйственно тем полезнее, чем больше антибиотиков синтезирует клетка – продуцент. Для организма же она является полезной лишь до определенного предела, а потом чрезмерный синтез антибиотика начинает угнетать клетку и может привести ее к гибели.

Еще два важных понятия.

Фенокопия – это явление, когда признак под действием факторов внешней среды изменяется и *копирует* признаки другого генотипа (ненаследственная изменчивость копирует наследственную). Например, если беременная женщина заразилась *токсоплазмозом*, то у ребенка может наблюдаться поражение головного мозга (*водянка*) как при *болезни Дауна*.

Генокопия – это одинаковое фенотипическое проявление мутаций разных генов. Примером генокопий могут служить различные виды гемофилии, клинически проявляющиеся понижением свертываемости крови, связанные с недостаточностью восьмого или девятого факторов свертывающей системы (гемофилия А и В соответственно).

Прямые и обратные мутации

Мутации, вызывающие изменения от дикого типа к новому, называют ***прямыми***, а от мутантного к дикому – ***обратными***, или ***реверсиями***.

Прямые и обратные мутации возникают с разной частотой. Некоторые мутации не дают реверсий к норме. Они обычно связаны с полной потерей (делецией) гена. Если же обратные мутации возникают, это значит, что при прямом мутировании ген не потерян, а произошло лишь его изменение.

*В ряде случаев возврат к дикому типу представляет собой не обратную мутацию гена, а имитируется мутацией другого гена. Гены, которые путем взаимодействия с другими рецессивными генами приводят к восстановлению дикого фенотипа, называются **супрессорами**, а такой тип взаимодействия, являющийся частным случаем **эпистаза**, - **супрессией**. Поэтому, прежде чем решить вопрос, действительно ли произошла обратная мутация, необходимо провести генетический анализ.*

6. Плейотропный эффект мутаций

Большинство мутаций затрагивает развитие многих признаков. **Множественное проявление мутации** (гена) называется **плейотропией** и характерно для большинства генов. Это объясняется тем, что продукт любого гена используется не в одном, а в нескольких, иногда в очень многих процессах роста и развития.

Так, при *арахнодактилии*, которая вызывается доминантной мутацией, наблюдаются изменения пальцев рук и ног и одновременно – вывихи хрусталика глаза и врожденные пороки сердца.

Фенилкетонурия связана с отсутствием фермента, обеспечивающего синтез тирозина из фенилаланина. У больных наблюдается слабоумие, а также ослабление пигментации (изменение морфологического признака), в моче их присутствует фенилпировиноградная кислота (откуда происходит и название болезни – фенилкетонурия).

7. Экспрессивность и пенетрантность мутаций

Оба понятия ввел в 1926 г. **О. Фогт** для описания варьирования мутантных фенотипов.

Экспрессивность – это *степень проявления* мутантного признака в фенотипе. Например, мутация *eyeless* у дрозофилы вызывает редукцию глаза, степень которой неодинакова у разных особей.

Пенетрантность – это *частота*, или *вероятность проявления* мутантного фенотипа среди всех особей, несущих данную мутацию. Например, 100%-ная пенетрантность рецессивной мутации означает, что у всех гомозиготных особей она проявляется в фенотипе. Если же фенотипически она обнаруживается только у половины особей, то пенетрантность мутации равна 50%.

8. Условные мутации

Эти мутации проявляются только при выполнении определенных условий.

Температуро-чувствительные мутации. Мутанты этого типа живут и развиваются нормально при одной (*пермиссивной*) температуре и обнаруживают отклонения при другой (*рестриктивной*). Например, у дрозофилы выделяют холодочувствительные (при 18°C) *ts*-мутации (*temperature sensitive*) и теплочувствительные (при 29°C) *ts*-мутации. При 25°C сохраняется нормальный фенотип.

Мутации чувствительности к стрессу. В данном случае мутанты развиваются и внешне выглядят нормально, если их не подвергать каким-либо стрессирующим воздействиям. Так, мутанты *sesB* (*stress sensitive*) дрозофилы в обычных условиях не проявляют каких-либо отклонений.

Однако если резко встряхнуть пробирку, у мух начинаются судороги и они не способны двигаться.

Ауксотрофные мутации у бактерий. Подобные мутанты (*ауксотрофы*) нуждаются для своего роста в определённых веществах (аминокислотах,

нуклеотидах) и растут только на богатой среде или же на минимальной, но с добавкой соответствующего вещества. В противоположность им, **прототрофы** могут расти на минимальной среде, например, на глюкозо – минеральной.

9. Методы учета мутаций

Особенности методов учета мутаций. Методы обнаружения мутаций должны быть разными в зависимости от способа размножения организма. Видимые морфологические изменения учитываются легко; сложнее определить физиологические и биохимические изменения у многоклеточных организмов. Легче всего обнаруживаются *видимые доминантные* мутации, которые могут проявляться в гетерозиготном состоянии в первом же поколении, труднее анализировать *рецессивные мутации*, их необходимо *переводить в гомозиготное состояние*.

Для хорошо изученных в генетическом отношении объектов (дрозофила, кукуруза, ряд микроорганизмов) изучение новой мутации проводить довольно легко. Например, для дрозофилы разработаны специальные методики учета частоты мутаций.

Метод *CIB*. Герман Мёллер создал линию дрозофил ***CIB*** (**Си Эль Би**) у которой одна из *X*-хромосом маркирована доминантным геном ***Bar*** (***B***) и ***инверсией***, названной ***C***. Эта инверсия препятствует кроссинговеру и обладает рецессивным *летальным эффектом* – ***l***. Поэтому линия и названа ***CIB***.

Самок этой ***линии-анализатора*** скрещивают с самцами из исследуемой выборки. Если самцы взяты из *природной популяции*, то можно оценить частоту леталей в ней. Или же берут самцов, *обработанных мутагеном*. В этом случае оценивается частота летальных мутаций, вызванных этим мутагеном.

В F_1 отбирают самок ***CIB/+***, гетерозиготных по мутации ***Bar***, и скрещивают ***индивидуально*** (каждую самку в отдельной пробирке с самцом дикого типа). Если в проверяемой хромосоме ***нет мутации***, то в потомстве будет два класса самок и один класс самцов (***B⁺***), поскольку самцы ***CIB*** гибнут из-за наличия летали ***l***, т.е. общее расщепление по полу будет **2:1** (см. рисунок).

Если же в опытной хромосоме ***есть летальная мутация *l_m****, то в F_2 ***будут только самки***, так как самцы обоих классов погибнут – в одном случае из-за наличия летали в *X*-хромосоме ***CIB***, в другом – из-за наличия летали ***l_m*** в опытной *X*-хромосоме (см. рисунок). Определяя отношение числа *X*-хромосом (пробирок с индивидуальными скрещиваниями), в которых возникла леталь, к общему числу изученных *X*-хромосом (пробирок), подсчитывают частоту летальных мутаций в определенной группе.

Мёллер неоднократно модифицировал свой метод выявления леталей в X-хромосоме дрозофилы, в результате чего появились такие *линии - анализаторы*, как *Mu-5*, а позднее – *линии - балансеры* *Vasc*, *Vinsn* и др.

Метод *Su L/Pm*. Для учета летальных мутаций в *аутосомах* дрозофилы используют линии *сбалансированных леталей*. Для проявления рецессивной летальной мутации в аутосоме тоже необходимо, чтобы она оказалась в *гомозиготном состоянии*. Для этого необходимо поставить два скрещивания, а учет потомков вести в F_3 . Для обнаружения леталей во *второй* хромосоме используют линию *Su L/Pm* (Сай Эл Пи Эм) (см. рисунок).

У мух этой линии во второй хромосоме расположены две доминантные мутации *Su* (*Curly* – загнутые крылья) и *L* (*Lobe* – маленькие дольковидные глаза), каждая из которых в гомозиготном состоянии вызывает летальный эффект. Мутации представляют собой протяженные *инверсии* в разных плечах хромосомы. Обе они «*запирают*» кроссинговер. В гомологичной хромосоме также присутствует доминантная мутация – инверсия *Pm* (*Plum* – коричневые глаза). Анализируемого самца скрещивают с самкой из линии *Su L/Pm* (на рисунке показаны не все классы потомков).

В F_1 отбирают самцов *Su L/Pm⁺* и *индивидуально* скрещивают их с самками исходной линии *Su L/Pm*. В F_2 отбирают самцов и самок *Su L*, у которых гомологичная хромосома является испытуемой. В результате скрещивания их между собой получается три класса потомков. Один из них погибает из-за гомозиготности по мутациям *Su* и *L*, еще один класс потомков – это гетерозиготы *Su L/Pm⁺*, а также класс гомозигот по испытуемой хромосоме. В итоге получают мухи *Su L* и *Su⁺ L⁺* в соотношении **2:1**.

Если в испытуемой хромосоме произошла *летальная мутация*, в потомстве от последнего скрещивания будут *только мухи Su L*. С помощью такого метода можно учитывать частоту рецессивных летальных мутаций во второй хромосоме дрозофилы.

Учет мутаций у других объектов. Аналогичные методы обнаружения мутаций разработаны и для других объектов. В основу их положены те же принципы:

1) обнаружить *рецессивную* мутацию можно, переводя ее в *гемо- или гемизиготное* состояние,

2) учесть точно частоту возникающих мутаций можно лишь при условии *отсутствия кроссинговера* у гетерозиготных особей.

Для *млекопитающих* (мышь, кролик, собака, свинья и др.) разработана методика учета частоты возникновения *доминантных летальных* мутаций. О частоте мутаций судят по разнице между числом *желтых тел* в яичнике и развивающихся *эмбрионов* у вскрытой беременной самки.

Учет частоты возникновения мутаций *у человека* очень затруднен, однако *генеалогический анализ*, т.е. анализ родословных, позволяет установить возникновение новых мутаций. Если в родословной супругов в течение нескольких поколений не встречался какой-то признак, а у одного из детей он появился и стал передаваться следующим поколениям, значит мутация возникла в гамете одного из этих супругов.

Учет мутаций у микроорганизмов. Изучать мутации у микроорганизмов очень удобно, так как все гены у них *в единственном числе* и мутации проявляются уже *в первом поколении*.

Мутантов легко обнаружить *методом отпечатков*, или *реplik*, который предложили супруги Э. и Дж. Ледерберги.

Для выявления у *E. coli* мутаций устойчивости к бактериофагу T1 бактерии высевают на питательный агар, чтобы образовались отдельные колонии. Затем при помощи бархатной реплики эти колонии перепечатывают на чашки с нанесенной суспензией частиц фага T1. Большая часть клеток исходной чувствительной (*TonS*) культуры не будет образовывать колоний, поскольку их лизирует бактериофаг. Вырастут лишь отдельные мутантные колонии (*TonR*), устойчивые к фагу. Подсчитывая число колоний в контрольном и опытном (например, после облучения ультрафиолетовым светом) вариантах, легко определить частоту индуцированных мутаций.

10. Спонтанные и индуцированные мутации

Спонтанные – это мутации, которые возникают самопроизвольно, без участия со стороны экспериментатора.

Индукцированные – это те мутации, которые вызваны искусственно, с использованием различных факторов *мутагенеза*.

Вообще, процесс образования мутаций называется *мутагенезом*, а факторы, вызывающие мутации, – *мутагенами*.

Мутагенные факторы подразделяются на *физические, химические и биологические*.

Частота спонтанных мутаций одного гена составляет $10^{-4} \dots 10^{-9}$, для каждого гена каждого организма она своя.

Причины спонтанных мутаций не совсем ясны. Раньше считали, что их вызывает *естественный фон ионизирующих излучений*. Однако оказалось, что это не так. Например, у дрозофилы естественный радиационный фон вызывает не более 0,1% спонтанных мутаций.

С возрастом последствия от воздействия естественного радиационного фона могут *накапливаться*, и у человека от 10 до 25% спонтанных мутаций связаны с этим.

Второй причиной спонтанных мутаций являются *случайные повреждения хромосом и генов* во время деления клетки и репликации ДНК вследствие *случайных ошибок* в функционировании молекулярных механизмов.

Третьей причиной спонтанных мутаций является *перемещение* по геному *мобильных элементов*, которые могут внедриться в любой ген и вызвать в нем мутацию.

Американский генетик М. Грин показал, что около 80% мутаций, которые были открыты как спонтанные, возникли в результате перемещения мобильных элементов.

Индукцированные мутации впервые обнаружили в 1925 г. **Г.А. Надсон** и **Г.С. Филиппов** в СССР. Они облучали рентгеновскими лучами культуры плесневых грибов *Miscor genevensis* и получили расщепление культуры «на две формы или расы, отличающиеся не только друг от друга, но и от исходной (нормальной) формы». Мутанты оказались стабильными, так как после восьми последовательных пересевов сохраняли приобретенные свойства. Их статья была опубликована только на русском языке, к тому же в работе не использовались какие-либо методы количественной оценки действия рентгеновских лучей, поэтому она осталась малозамеченной.

В 1927 г. **Г. Мёллер** сообщил о действии рентгеновских лучей на мутационный процесс у дрозофилы и предложил **количественный метод** учета рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме (**C1B**), который стал классическим.

В 1946 г. Мёллеру была присуждена Нобелевская премия за открытие радиационного мутагенеза. В настоящее время установлено, что практически *все виды излучений* (в том числе ионизирующая радиация всех видов – α , β , γ ; УФ-лучи, инфракрасные лучи) вызывают мутации. Их называют **физическими мутагенами**.

Основные механизмы их действия:

- 1) нарушение структуры генов и хромосом за счет **прямого действия** на молекулы ДНК и белков;
- 2) образование **свободных радикалов**, которые вступают в химическое взаимодействие с ДНК;
- 3) разрывы нитей **веретена деления**;
- 4) образование **димеров** (тиминовых).

В 30-х гг. был открыт **химический мутагенез** у дрозофилы: **В. В. Сахаров** (1932), **М. Е. Лобашев** и **Ф. А. Смирнов** (1934) показали, что некоторые соединения, такие как *йод, уксусная кислота, аммиак*, способны индуцировать рецессивные летальные мутации в X-хромосоме.

В 1939 г. **Сергей Михайлович Гершензон** (ученик С.С. Четверикова) открыл сильный мутагенный эффект *экзогенной ДНК* у дрозофилы. Под влиянием идей Н.К. Кольцова о том, что хромосома является гигантской молекулой, С.М. Гершензон решил проверить свое предположение, что именно ДНК является такой молекулой. Он выделил ДНК из тимуса и добавил ее в корм личинкам дрозофилы. Среди 15 тыс. контрольных мух (т.е. без ДНК в корме) не было ни одной мутации, а в опыте среди 13 тыс. мух было обнаружено 13 мутантов.

В 1941 г. **Шарлотта Ауэрбах** и **Дж. Робсон** показали, что *азотистый иприт* индуцирует мутации у дрозофилы. Результаты работы с этим боевым отравляющим веществом были опубликованы только в 1946 г., после окончания Второй мировой войны. В том же 1946 г. Иосиф Абрамович **Рапопорт** в СССР показал мутагенную активность *формальдегида*.

В настоящее время к *химическим мутагенам* относят:

- а) *природные* органические и неорганические вещества;
- б) продукты промышленной *переработки природных соединений* – угля, нефти;
- в) *синтетические вещества*, ранее не встречавшиеся в природе (пестициды, инсектициды и т.д.);
- г) некоторые *метаболиты* организма человека и животных.

Химические мутагены вызывают преимущественно *генные* мутации и действуют в период репликации ДНК.

Механизмы их действия:

- 1) модификация структуры оснований (гидроксилирование, дезаминирование, алкилирование);
- 2) замена азотистых оснований их аналогами;
- 3) ингибция синтеза предшественников нуклеиновых кислот.

В последние годы используют так называемые *супермутагены*:

- 1) *аналоги оснований*;
- 2) соединения, *алкилирующие ДНК* (этилметансульфонат, метилметансульфонат и др.);
- 3) соединения, *интеркалирующие* между основаниями ДНК (акридины и их производные).

Супермутагены повышают частоту мутаций на 2-3 порядка.

К *биологическим мутагенам* относятся:

- а) *вирусы* (краснухи, кори и др.);
- б) *невирусные инфекционные агенты* (бактерии, риккетсии, простейшие, гельминты);
- в) *мобильные генетические элементы*.

Механизмы их действия:

1) геномы вирусов и мобильных элементов встраиваются в ДНК клеток хозяина;

2) продукты жизнедеятельности паразитов – возбудителей болезней действуют как химические мутагены.

Индукцированный мутагенез, начиная с конца 20-х годов XX века, используют для селекции новых штаммов, пород и сортов. Наибольшие успехи достигнуты в селекции штаммов бактерий и грибов – продуцентов антибиотиков и других биологически активных веществ.

Так, удалось повысить активность ***продуцентов антибиотиков*** в 10-20 раз, что позволило значительно увеличить производство соответствующих антибиотиков и резко снизило их стоимость. Активность лучистого гриба – ***продуцента витамина B₁₂*** удалось повысить в 6 раз, а активность бактерии – ***продуцента аминокислоты лизина*** – в 300-400 раз.

Использование мутаций ***карликовости у пшеницы*** позволило в 60-70 годах резко увеличить урожай зерновых культур, что было названо «***зеленой революцией***». Пшеница карликовых сортов имеет укороченный толстый стебель, устойчивый к полеганию, он выдерживает повышенную нагрузку от более крупного колоса. Использование этих сортов позволило существенно увеличить урожай (в некоторых странах в несколько раз).

Автором «зеленой революции» считают американского селекционера и генетика (предки – из Норвегии, из семьи фермера) **Нормана Эрнеста Борлоуга**, который в 1944 г., в возрасте 30 лет, поселился и стал работать в Мексике. Прожил там 12 лет. Он скрещивал местные сорта с карликовыми сортами из Японии, широко применял удобрения, гербициды, пестициды (в том числе ДДТ). Полученные им высокопродуктивные сорта пшеницы были переданы и нашли применение в Пакистане, Индии, В Африке. По аналогии с методом Борлоуга на Филиппинах были выведены карликовые сорта риса. За успехи в выведении высокопродуктивных сортов растений в 1970 году ему была присуждена Нобелевская премия мира.

11. Генные мутации

Генные (точковые) мутации связаны с относительно небольшими изменениями последовательностей нуклеотидов. Генные мутации ***подразделяются*** на изменения ***структурных генов*** и изменения ***регуляторных генов***.

Типы мутаций:

1. ***Вставка (инсерция)*** или ***выпадение (делеция)*** пары или нескольких пар нуклеотидов, они приводят к ***сдвигу рамки считывания***. В зависимости

от места вставки или выпадения нуклеотидов изменяется меньшее или большее число кодонов.

2. **Транзиция** – замена оснований пуринового на пуриновое или пиримидинового на пиримидиновое, например: А ↔ Г, Ц ↔ Т.

3. **Трансверзия** – замена пуринового основания на пиримидиновое или пиримидинового на пуриновое. Например: А ↔ Ц, Г ↔ Т.

Изменения структурных генов приводят:

а) к **миссенс-мутациям** – изменению смысла кодонов и образованию других белков;

б) к **нонсенс-мутациям** – образованию СТОП-кодонов (УАА, УАГ, УГА).

Последствия мутаций регуляторных генов:

1. Белок-репрессор не подходит к оператору («ключ не входит в замочную скважину») – структурные гены работают постоянно (белки синтезируются все время).

2. Белок-репрессор плотно «присоединяется» к оператору и не снимается индуктором («ключ не выходит из замочной скважины») – структурные гены постоянно не работают и не синтезируются белки, закодированные в данном опероне.

3. **Нарушение чередования репрессии и индукции** – при отсутствии индуктора специфический белок синтезируется, а при его наличии белок не синтезируется. Это связано с мутациями гена-регулятора или операторной последовательности.

Генные мутации являются основной причиной **генных болезней**, частота проявления которых в популяциях человека достигает 1-2%.

12. Модификационная изменчивость. Модификации

Мы знаем, что модификационная изменчивость – частный случай ненаследственной изменчивости.

Модификационная изменчивость – способность организмов с одинаковым генотипом развиваться по-разному в разных условиях окружающей среды. В популяции таких организмов возникает определенный набор фенотипов. При этом организмы должны быть одного возраста.

Фенотипические ненаследственные различия, возникающие под влиянием условий среды у одинаковых по генотипу организмов, **Карл Нэгели** в 1884 г. назвал **модификациями**.

Примеры модификаций широко известны и многочисленны.

Морфология листьев у *водяного лютика* и *стрелолиста* зависит от того, в какой среде, воздушной или подводной, они развиваются (рис. 4.23).

Если надземную часть стебля *картофеля* искусственно *лишить доступа света*, на ней развиваются клубни, висящие в воздухе.

У *камбалы*, ведущей донный образ жизни, верхняя сторона тела темная, что делает ее незаметной для приближающейся добычи, а нижняя — светлая. Но если аквариум со стеклянным дном и освещается не сверху, а снизу, то темной становится нижняя поверхность тела.

Кролики горностаевой породы имеют белый мех на теле, кроме конца морды, лап, хвоста и ушей. Если выбрить участок, например, на спине и держать зверька при пониженной температуре (0-1 °С), то на выбритом месте отрастает черная шерсть. Если выщипать часть черных волос и поместить кролика в условия повышенной температуры, то вновь отрастает белая шерсть.

Норма реакции – это свойство данного **генотипа** в определенных пределах **изменять фенотип** в зависимости от условий среды. Иначе говоря, это **диапазон возможной изменчивости в реализации генотипа**.

С. М. Гершензон [1983] описывает следующие **свойства модификаций**:

1. **Степень выраженности** модификации пропорциональна силе и продолжительности воздействия. Эта закономерность коренным образом отличает модификации от мутаций, особенно генных.

2. В подавляющем большинстве случаев модификация представляет собой **полезную, приспособительную реакцию** организма на тот или иной внешний фактор. Это можно видеть на примере вышеперечисленных модификаций у различных организмов.

3. **Адаптивными** бывают только те модификации, которые вызываются **обычными** изменениями природных условий, с которыми данный вид сталкивался раньше множество раз. Если же организм попадает в **необычные, экстремальные** обстоятельства, то возникают модификации, лишенные приспособительного значения - **морфозы**.

Если действовать на личинок или куколок дрозофилы рентгеновскими или ультрафиолетовыми лучами, а также предельно переносимой температурой, то у развивающихся мух наблюдаются разнообразные **морфозы**.

4. В отличие от мутаций, модификации **обратимы**, т. е. возникшее изменение постепенно исчезает, если устранено вызвавшее его воздействие. Так, загар у человека проходит, когда кожа перестает подвергаться инсоляции, объем мышц уменьшается после прекращения тренировки и т. д.

5. В отличие от мутаций, **модификации не передаются по наследству**. Это положение наиболее остро обсуждалось на протяжении всей исто-

рии человечества. **Ламарк** считал, что наследоваться могут любые изменения организма, *приобретенные в течение жизни (ламаркизм)*. Даже Дарвин признавал возможность наследования некоторых модификационных изменений.

Первый серьезный удар по представлению о наследовании приобретенных признаков нанес **А. Вейсман**. Он на протяжении 22 поколений *отрубал* белым мышам *хвосты* и скрещивал их между собой. В общей сложности было обследовано 1592 особи, и ни разу не было обнаружено укорочения хвоста у новорожденных мышат. Результаты эксперимента были опубликованы в 1913 г., однако в нем не было особой необходимости, поскольку *преднамеренные повреждения у человека*, сделанные из ритуальных или «эстетических» соображений, — обрезание, протыкание ушей, уродование ступней, черепа и т. д., как известно, также не наследуются.

В СССР в 30-50-х гг. получили широкое распространение ошибочные теории **Лысенко** о *наследовании «приобретенных признаков»*, т. е. фактически модификаций. Множество опытов, проведенных на разных организмах, показало ненаследуемость модификаций, и исследования такого рода представляют теперь лишь исторический интерес.

В 1956-1970 гг. **Ф. Криком** сформулирована так называемая *«центральная догма молекулярной биологии»*, согласно которой перенос информации возможен только от ДНК к белкам, но не в обратном направлении.

Каковы же особенности строения и функционирования генома, которые приводят к модификационной изменчивости?

Запишите *генетические механизмы* модификационной изменчивости:

1. *Зависимость* проявления генов *от условий среды* (наличие механизмов регуляции экспрессии, индукторов, репрессоров и т.д.).
2. *Полигенная детерминация* любого признака (комплементарность, эпистаз, полимерия).
3. *Плейотропность* действия гена.
4. *Гетерозиготность* организма, вследствие чего у некоторых генов могут изменяться отношения доминирования (неполное доминирование, сверхдоминирование и др.).
5. *Альтернативные пути метаболизма* и развития в клетке, когда блокирование одного пути компенсируется другим.

Лекция № 9

Тема лекции: Хромосомные перестройки и геномные мутации

План лекции:

1. Инверсии
2. Транслокации
3. Делеции
4. Дупликации
5. Механизмы возникновения хромосомных перестроек и их значение
6. Типы геномных мутаций и их причины. Полиплоидия
7. Автополиплоидия
8. Аллополиплоидия
9. Анеуплоидия
10. Гаплоидия

К хромосомным перестройкам относятся: *инверсии, транслокации, делеции, дупликации*. Все эти мутации выявляются либо *генетически* (т. е. при скрещивании различных линий и анализа потомства), либо *цитогенетически* – путем наблюдения хромосом гетерозигот во время их конъюгации в профазе I мейоза или путем визуального анализа гигантских (политенных) хромосом клеток слюнных желез дрозофилы.

Гомологичные хромосомы в клетках слюнных желез дрозофилы в норме конъюгируют довольно тесно (*соматическая конъюгация*). При этом идентичные диски тесно прилегают друг к другу. Но в случае *гетерозиготного состояния* (одна хромосома – нормальная, другая – дефектная) конъюгация в этом районе нарушается. Такой участок нормальной хромосомы, не имея себе партнера в другой хромосоме, образует *петлю*, в то время как все остальные, гомологичные участки в обеих хромосомах тесно прилегают друг к другу.

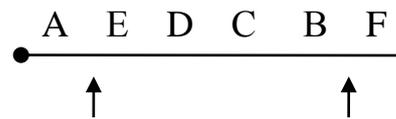
1. Инверсии

Инверсия – это поворот отдельного участка хромосомы на 180° . Такие перестройки открыл **А.Стёртевант** в 1926 г.

Инверсии бывают *пара-* и *перицентрическими*. В случае *парацентрической* инверсии происходят два разрыва хромосом, оба *по одну сторону от центромеры*. Участок между точками разрывов поворачивается на 180° :

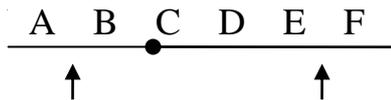


Нормальная хромосома



Парацентрическая инверсия

При *перичесентрической* инверсии точки разрывов расположены *по обе стороны от центромеры*:



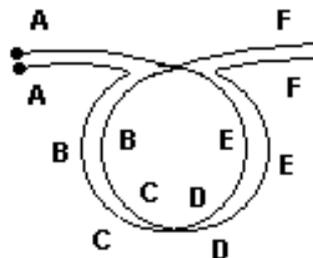
Нормальная хромосома



Перичесентрическая инверсия

Для инверсий приняты *специальные обозначения*: например, **In(1)BE** означает, что инверсия (**In**) произошла в первой хромосоме (**1**), **BE** – инвертированный район.

У *гомозигот* по инверсиям кроссинговер происходит нормально. У особей, *гетерозиготных* по любому типу инверсии, в хромосомах при конъюгации образуется *петля*. Вот так, например, это происходит при парацентрической инверсии:



Далее у гетерозигот по *парацентрической* инверсии происходит «*запирание*» кроссинговера следующим образом: в случае перекреста между генами C и D (происходит внутри петли) образуются два продукта: *ацентрическая* и *дицентрическая* хромосомы, т.е. без центромеры и с двумя центромерами соответственно:



Ацентрик



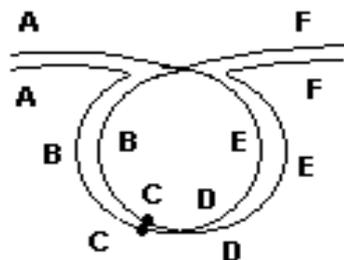
Дицентрик

Дицентрик образует «*хромосомный мост*» в анафазе I мейоза, который виден под микроскопом.

Обе комбинации *летальны*. Таким образом, в результате кроссинговера образуются *нежизнеспособные гаметы*, и потомства нет.

Двойной кроссинговер, если он случается в пределах инверсии, восстанавливает образование гамет.

При *перичентрической* инверсии, в случае перекреста между генами С и D, также получают два продукта:



A B C D E A

Дупликация А и делеция F

F B C D E F

Дупликация F и делеция А

Каждая из полученных хромосом несет дупликацию одного неинвертированного района хромосом и делецию другого. В результате такие гаметы нежизнеспособны и кроссоверы не выявляются. Так же как и парацентрические, перичентрические инверсии «*запирают*» кроссинговер.

Поскольку кроссинговер в инвертированном участке хромосомы «заперт», в нем могут *накапливаться мутации*, которые «не испорчены» кроссинговером и тем самым отличаются от обычных, расположенных в «нормальных» участках хромосом. Такие мутации изучают особенно тщательно, а явление получило название *инверсионный полиморфизм* популяций.

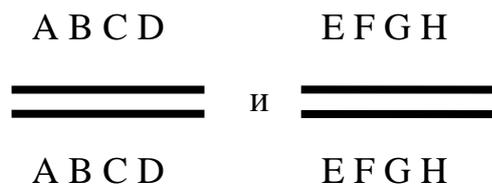
2. Транслокации

Транслокации – это хромосомные перестройки, в результате которых часть хромосомы переносится в другой локус той же хромосомы или в другую хромосому, но общее число генов не изменяется. Транслокации открыл **К. Бриджес** в 1923 г. у дрозофилы.

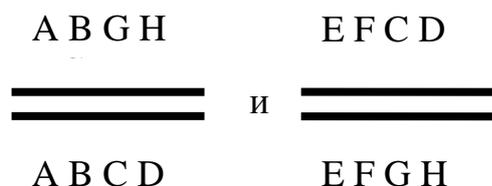
Внутрихромосомные транслокации возникают в результате образования трех разрывов и перенесения хромосомного сегмента в другой район той же хромосомы.

Межхромосомные реципрокные транслокации возникают в результате образования двух разрывов и обмена участками негомологичных хромосом.

Две хромосомы из разных пар



обмениваются фрагментами, в результате образуется гетерозигота по транслокации:



Реципрокные транслокации у дрозофилы обозначают следующим образом: например, **T(2;3)35A;71C** означает, что транслокация (**T**) произошла между второй и третьей хромосомами, **35A** и **71C** – точки разрывов на цитологических картах этих хромосом.

Если образуются три разрыва и фрагмент хромосомы удаляется из одной хромосомы и встраивается в другую – это **инсерционная транслокация**. В результате расщепления в последующих поколениях возникает *делеция* в одной хромосоме и *дупликация* в другой.

Инсерционные транслокации у дрозофилы обозначают таким образом: например, **T(2;3)22A-23A;64E**, т.е. транслокация участка **22A-23A** второй хромосомы в участок **64E** третьей.

Как же ведут себя хромосомы с реципрокными транслокациями во время мейоза? У гетерозиготы при конъюгации на *стадии зигонемы* образуется фигура в виде **креста**, так как транслоцированные участки притягиваются друг к другу (см. рис.). В *стадии диплономы* крестообразные фигуры образуют **сложные хиазмы**. В *диакинезе* хиазмы сползают от центромер к концам хромосом и образуются **кольца**. Иногда хромосомы такого кольца перекручиваются и образуются фигуры **в виде восьмерки**. Только в этом случае получают жизнеспособные **сбалансированные гаметы**, потому что к одному полюсу отходят либо обе измененные хромосомы, либо обе неизменные.

Когда же хромосомы остаются в профазе I **в виде колец**, то образуются **несбалансированные гаметы**: в одних гены повторяются дважды, в других – они отсутствуют.

Вообще, для многих высших растений, например кукурузы, пиона, дурмана, колокольчика и др., **гетерозиготные транслокации** – это **нор-**

мальное явление. Так, растение *ослиник* (энотера) гетерозиготно по транслокациям, которые затрагивают 12 из 14 хромосом.

Транслокации встречаются и у животных, но реже; например, у *кузнечиков и скорпионов*.

Есть особый вид транслокации, который по имени ученого, его открывшего, называется **«робертсоновская транслокация»**.

В 1911 г. **У.Робертсон** (W.Robertson) обнаружил, что метацентрическая хромосома у одного из видов *прямокрылых насекомых* соответствует двум акроцентрическим хромосомам у другого вида и заключил, что в ходе эволюции **метацентрики могут возникать за счет слияния акроцентриков**. Такие слияния целых плеч хромосом стали называть робертсоновскими, или **центрическими слияниями** (транслокациями).

В 1934 году **Н.П. Дубинин** экспериментальным путем изменил число хромосом в кариотипе. Вначале с помощью робертсоновской транслокации он получил расу дрозофилы *с тремя парами хромосом*. Еще через два года была создана раса *с пятью парами хромосом*, у которой были три пары нормальных хромосом (X, вторая и четвертая), а также две пары перестроенных, состоящих из частей 4-ой и 3-й хромосом.

Таким образом была показана возможность **экспериментального преобразования** кариотипа у животных как в сторону уменьшения числа пар хромосом, так и в сторону увеличения.

Логично было предположить, что робертсоновские слияния происходят и в ходе эволюции. В 1960 г. **П. Полани** (P. Polani) с соавторами показали, что синдром Дауна у человека может возникать и в результате робертсоновской транслокации.

Было установлено также, что у человека 23 пары хромосом, а у крупных человекообразных обезьян – 24. Оказалось, что два плеча крупной второй хромосомы человека соответствуют двум разным хромосомам обезьян (это хромосомы 12 и 13 у шимпанзе и 13 и 14 у гориллы и орангутана).

Каков же **механизм** центрического слияния? Известно, что центромера не может разрываться с последующей сшивкой фрагментов. Было предложено 2 механизма. Один из них: **неравная транслокация** двух акроцентрических хромосом с потерей образовавшегося маленького метацентрика (см. рис.).

По другому механизму может произойти **соединение** двух акроцентрических хромосом в результате **тандемного слияния двух центромер**. При этом две близко расположенные центромеры функционируют как одна, или же одна из двух центромер инактивируется. Это – **С-С** соединение хромосом (центромера к центромере). Примером С-С соединения является вторая хромосома человека.

3. Делеции

Делеция – это утрата какого-либо участка хромосомы. Делеции открыл в 1917 г. **К. Бриджес** генетическими методами. Впервые увидели делеции под микроскопом и предложили термин **Т. Пайнтер** и **Г. Меллер** в 1929 г.

Рассмотрим пример. В нормальной хромосоме гены расположены в определенном порядке:

А В С D E F
• —————

При потере фрагмента хромосомы возможны два варианта:

А В E F
• —————

или

А В С
• —————

т.е. может быть потеряна *средняя* или *концевая* часть хромосомы.

Гетерозиготные делеции цитологически выявляются из-за наличия *петли* в нормальном гомологе:

А В D E F
• —————
• —————
А В  E F
С

Для делеций также существуют определенные **обозначения**, например, **Df(1)C-D** (для первого случая) или **Df(1)D-F** (для второго). Эта запись означает, что делеция (*deficiency*) произошла в первой (1) хромосоме, а буквы или цифры после скобок – удаляемый сегмент.

Делеции используются для *картирования генов*, для этого необходимо иметь серию перекрывающихся делеций.

Делеции не могут быть очень длинными, поскольку чем они длиннее, тем больше вероятность того, что в удаленном участке находится ген, необходимый для выживания в двух дозах. У человека синдром «*кошачьего крика*» возникает у *гетерозигот* по делеции в коротком плече пятой хромосомы. У младенцев-гетерозигот очень высокий мяукающий плач, кроме этого микроцефалия (малый размер головы), значительные нарушения физического и умственного развития.

Особи с очень маленькими делециями в гомозиготе могут оказаться жизнеспособными. Такие делеции обнаружены у кукурузы, дрозофилы и других организмов. У *E.coli* нелетальные делеции составляют около 1 % генома. У дрозофилы самая большая из известных делеций, не препятствующая

щих в гомозиготном состоянии жизнеспособности, имеет длину до 4 дисков политенных хромосом.

С другой стороны, у дрозофилы известны огромные делеции, фактически не влияющие на жизнеспособность в гетерозиготном состоянии. Так, может быть утрачена преобладающая часть X-хромосомы – остаются только центромеры и теломеры. Хромосомы с такими делециями называют *мини-хромосомами*. Они нормально ведут себя во время клеточных делений, однако могут существовать только при наличии нормальной гомологичной им хромосомы.

4. Дупликации

Дупликация – это дополнительный наследственный материал, идентичный тому, который уже есть в геноме. Дупликации открыл **К. Бриджес** в 1919 г. Рассмотрим расположение генов в дупликациях разных типов. Нормальная хромосома:

A B C D E F

• —————

1. Дупликация участка ABC – транспозиция в одной и той же хромосоме:

A B C D E F A B C

• —————

2. *Тандемная* дупликация участка ABC:

A B C A B C D E F

• —————

3. Дупликация (инсерционная транслокация, транспозиция) участка ABC в результате встраивания его в другую хромосому:

A B C D E F

• —————

A B C G H I

• —————

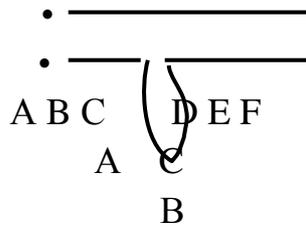
Дупликации обозначают, например, так: **Dp(1 ; 1) ABC** или

Tr (1 ; 1) ABC, т.е. дупликация (**Dp**) материала (**ABC**) первой хромосомы в первой же хромосоме (**1 ; 1**) или, что то же самое, дупликация участка **ABC** за счет *транспозиции* (**Tr**) в эту же хромосому.

Дупликация материала **ABC** первой хромосомы во второй хромосоме (*транспозиция* участка **ABC** первой хромосомы во вторую) обозначается как **Dp(1 ; 2) ABC** или **Tr (1 ; 2) ABC**.

На цитологическом уровне у *гетерозигот* по дупликации в несущем ее гомологе образуется *петля*:

A B C D E F



Дупликации используются для «*перекрытия*» действия летальных мутаций или делеций. Так, возникновение летали или делеции в X – хромосоме дрозофилы будет приводить к гибели самцов, несущих эту хромосому в гемизиготном состоянии. Однако наличие материала X – хромосомы, содержащего *нормальный аллель* летали и включенного в любую из хромосом (аутосому, X- или Y-хромосому), делает самца жизнеспособным и позволяет скрещивать его с самками.

Дупликации могут иногда проявляться в фенотипе. Наиболее известным примером служит мутация *Bar* у дрозофилы, которая возникает в результате дупликации маленького участка X-хромосомы. Если этот участок *утроен*, то мутация называется *Double Bar*.

5. Механизмы возникновения хромосомных перестроек и их значение

Всякая хромосомная перестройка происходит в результате разрывов и соединений фрагментов. Как же возникают, например, делеции и инверсии в *одноплечих (acrocentрических)* хромосомах?

Если акроцентрическая хромосома, гены которой на рисунке обозначены цифрами, *случайно образовала петлю* и в точке контакта произошел *разрыв*, то последующее *соединение* может идти *тремя путями*: с сохранением *нормальной структуры* хромосомы; с образованием хромосомы с *делецией* и *ацентрического кольца*, которое в метафазе из-за отсутствия центромеры элиминируется; и с возникновением *инверсии*.

Разрыв и соединение могут произойти, когда хромосома состоит из *одной нити* (ранняя интерфаза) или из *двух хроматид* (поздняя интерфаза и профазы I). Перестройки, которые произошли на стадии единичной нити, называют *хромосомными перестройками*, а на стадии двух хроматид – *хроматидными*.

Каждая хромосома представляет собой *целостную систему взаимодействующих генов*, сложившуюся в процессе эволюции. Если эта система нарушается в результате хромосомных перестроек, т. е. изменяется *порядок генов*, то могут возникать *новые признаки*.

Так, **А. Стертевант** объяснил мутацию *Bar* как следствие *изменения положения гена* в хромосоме, которое вызвало изменение признака. Такое изменение действия гена в зависимости от его положения в системе других

генов он предложил называть *эффектом положения*. Впервые ген рассматривали не как самостоятельную, независимую единицу, а как *часть единой системы генов*, которая является характерной для каждого вида. Теперь это положение не вызывает сомнения.

С помощью хромосомных перестроек в процессе эволюции могут создаваться новые генотипы. Так, может появиться жизнеспособная форма, гомозиготная по транслокации, инверсии или дупликации; она может оказаться приспособленной к определенным условиям существования и размножиться, а затем обособится в *новый вид*. У этого нового вида сохраняются все прежние гены, но их взаимное расположение в геноме изменено.

6. Типы геномных мутаций и их причины. Полиплоидия

Геномные мутации - это аномальное изменение числа хромосом в клетках организма. Изменение числа хромосом может происходить за счет увеличения или уменьшения числа целых гаплоидных наборов или отдельных хромосом.

Полиплоидия - это геномная мутация, которая состоит в изменении числа хромосом, *кратном* гаплоидному (числу).

В свою очередь *гаплоидным* называют такой набор хромосом, в котором из каждой пары гомологичных хромосом представлена только одна. *Наследственная информация, заключенная в гаплоидном наборе, называется геномом* (Г. Винклер, 1920 г.).

Известное всем число n – это *гаплоидное число*, или *плоидность*; например, у человека $n = 23$, у дрозофилы $n = 4$ и т. д.

Организмы, у которых произошло увеличение количества (умножение) гаплоидных наборов, называют *полиплоидами*, или *эуплоидами*.

Другие типы геномных мутаций – это *анеуплоидия* и *гаплоидия*. О них будет сказано отдельно.

Причины геномных мутаций - нарушения механизмов митоза и мейоза, а именно: нарушение функций (или повреждение) *микротрубочек* веретена деления, *центромер* или *центриолей*, значительное увеличение *вязкости цитоплазмы*; другие изменения физиологического состояния клетки.

Возможны следующие *последствия* этих нарушений:

1. Неравное расхождение хромосом к полюсам в анафазе.
2. Удвоение хромосом без их отделения друг от друга.

Около 30% всех покрытосеменных растений, в том числе культурных, являются полиплоидами. Полиплоиды лучше приспособлены к произрастанию в *суровых условиях*: среди цветковых растений в арктических широтах полиплоиды составляют более 70%, на Памире - 86%, на Алтае – 65%. Инте-

ресно отметить, что «*живые ископаемые*» *растения* — представители древних растительных групп - оказываются часто полиплоидными по отношению к их родственникам значительно менее древнего происхождения (т.е. именно полиплоидность помогла им выжить).

Важнейший для жизни человека пример полиплоидии: род *пшеница* (*Triticum*) состоит из нескольких видов, которые разделяются на три группы как по числу хромосом, так и по признакам растений. Гаплоидное число у пшениц $n=7$, при этом однозернянки *T. monosocum* являются *диплоидами* ($7 \times 2 = 14$), твердые пшеницы *T. durum* — *тетраплоидами* ($7 \times 4 = 28$), а мягкие *T. aestivum* — *гексаплоидами* ($7 \times 6 = 42$). Такой же ряд полиплоидов известен внутри рода *овса* (*Avena*) и у многих других растений (пырея, розы, земляники; у всех у них $n=7$).

Группа родственных видов, у которых наборы хромосом составляют ряд с возрастающим числом хромосом, кратным гаплоидному, называется *полиплоидным рядом*. Полиплоидный ряд может быть двучленным и многочленным.

7. Автополиплоидия

Полиплоиды, возникающие в результате *умножения* числа геномов одного вида, называют *автополиплоидами*.

Например, тетраплоиды чаще всего имеют *большую вегетативную массу* (листья, стебли, семена, плоды), размеры клеток увеличены. Однако у них может резко уменьшиться плодовитость из-за нарушения расхождения поливалентов в мейозе.

В результате скрещивания тетраплоида с диплоидом получается *триплоид*. Эти растения крупнее и мощнее, чем растения с четным числом хромосомных наборов, но полностью *стерильные*. Под руководством А. Н. Луткова в середине 60-х гг. было создано несколько сортов триплоидной *сахарной свеклы*. По содержанию сахара они на 15% превышают стандартные диплоидные сорта. Ценные качества триплоидов способствовали их широкому внедрению в практику (до 80% посевных площадей свеклы в Краснодарском крае). Экономический эффект от их внедрения в производство к началу 70-х гг. перекрыл расходы, связанные со строительством новосибирского Академгородка.

8. Аллополиплоидия

Аллополиплоидия - это *сложение* хромосомных наборов *разных* видов или родов.

Полиплоиды, возникающие в результате сложения геномов разных видов, называются *аллополиплоидами*, или *амфиплоидами*. Они образуются в результате скрещиваний различных видов.

Часто *отдаленные гибриды* оказываются *бесплодными* (например, гибриды ржи с пшеницей, редьки с капустой и др.). Это связано с особенностями мейоза у аллополиплоидов. Например, объединены геномы **S** (рожь) и **T** (пшеница). У гибрида будет два генома — **T** и **S**, по 7 хромосом в каждом. В мейозе образуются 14 *унивалентов*, поскольку хромосомы одного вида не имеют гомологии с хромосомами другого. В анафазе они будут беспорядочно расходиться к полюсам.

Гаметы могут иметь от 0 до 14 хромосом (**7T+7S**). Большинство из них являются *несбалансированными*, т.к. число хромосом в них некратно **n**, а потому и нежизнеспособными. Однако у такого гибрида часть как мужских, так и женских гамет будут нести *оба набора* хромосом (**7T+7S**). Такие гаметы называются *сбалансированными*. При их объединении образуется зигота с удвоенным набором хромосом каждого вида — *амфидиплоид*. Он является фертильным.

В 1925 г. два американских генетика **Т. Гудспид** и **Дж. Клаусен** получили вид табака с 72 хромосомами в результате гибридизации двух видов с 48 и 24 хромосомами.

Фертильный *межродовой* гибрид (*амфидиплоид*) впервые в мире получил получил **Георгий Дмитриевич Карпеченко** в 1927 г. Аллополиплоид у животных от межвидового скрещивания *шелкопрядов* *Bombix mori* и *B. mandarina* впервые получили **Б. Л. Астауров** и **В. Н. Верейская** в 1961 г.

Г. Д. Карпеченко использовал в скрещиваниях два вида из разных родов — *Brassica oleracea* (*капуста*) и *Raphanus sativus* (*редька*). У обоих видов диплоидное число хромосом $2n = 18$ (рис.). Гибрид **BR** имел 18 хромосом (**9R+9B**), был мощным, сильно цвел, но семян не образовывал. Отдельные гаметы были *нередуцированными*, т. е. имели **9R + 9B** хромосом. В результате их слияния получились устойчивые фертильные *амфидиплоидные* растения с $4n = 36$, которым автор дал новое видовое название — *Рафанобрас-сика*. Его генотип имеет формулу **BBRR**.

Аллополиплоидия широко распространена в природе. Известны многие полиплоидные виды и у культурных растений. Вернемся к примеру с пшеницами. Естественный аллополиплоид ($2n = 42$) *Triticum aestivum* (*пшеница мягкая*, или хлебная) является одним из основных хлебных растений мира. Она имеет генотип **AABBDD**. Для 35 % населения Земли – это основной продукт питания.

Эволюция геномов пшеницы посредством полиплоидизации представлена на рисунке.

Донором генома **A** (разновидность A^u) является обнаруженная на территории Армении дикая однозернянка *T. urartu* (пшеница урарту). Донор другой разновидности генома **A** – A^b – *T. boeoticum* (беотийская дикая форма пшеницы) — предок культурной однозернянки *T. monococcum*.

Второй геном у одних пшениц был обозначен **B**, у других — **G**. Их наиболее вероятными донорами послужили разные расы эгилопса *Aegilops spelta*.

Донором генома **D** является вид *Aegilops squarrosa*, точнее, его подвида *strangulata*, объединившийся в результате амфиполиплоидии с тетраплоидной пшеницей, имевшей геном A^uA^bBB .

9. Анеуплоидия

Анеуплоидия — это геномная мутация, состоящая в изменении числа хромосом, *некратном гаплоидном*.

Причина этого явления - *нерасхождение гомологичных хромосом в мейозе*, после образования бивалентов. Бивалент целиком может отойти в одну клетку, и тогда в другой клетке эта пара гомологичных хромосом отсутствует.

Если гамета, имеющая дополнительную хромосому ($n+1$), сочетается с нормальной, гаплоидной (n), то зигота оказывается с одной *лишней* хромосомой; число хромосом у нее будет равно $2n+1$. При сочетании гаметы, утратившей одну хромосому, с нормальной, т. е. гаплоидной гаметой образуется зигота с неполным диплоидным числом, *с нехваткой* одной хромосомы $2n-1$.

Организм с набором хромосом $2n+1$ называется *трисомиком*, $2n-1$ – *моносомиком*, а $2n-2$ – *нуллисомиком*. В некоторых редких случаях одна и та же пара хромосом может иметь дополнительно не одну хромосому, а две ($2n+2$) – *тетрасомик*, три ($2n+3$) – *пентасомик* и т.д.

Известно, что анеуплоидия у *растений* менее сказывается на жизнеспособности, чем у животных. Поэтому удалось получить *коллекции нуллисомиков, моно-, три- и тетрасомиков* многих растений (пшеницы, шпината, дурмана) и изучить влияние этих мутаций на свойства. Например, у дурмана прибавка по одной хромосоме к каждой из 12 пар ведет к изменению фенотипа — формы или размера семенной коробочки.

У *животных* анеуплоиды жизнеспособны, как правило, только в том случае, если анеуплоидия затрагивает *половые хромосомы*.

При нормальном течении мейоза у *женского организма* образуется один тип гамет, содержащий X-хромосому. Однако при нерасхождении по-

ловых хромосом могут образовываться ещё два типа гамет, ХХ и О (не содержащая половых хромосом). У мужского организма в норме образуется два сорта гамет, содержащих Х- или Y-хромосому. При нерасхождении половых хромосом возможны варианты гамет ХУ и О. Составим таблицу возможных комбинаций половых хромосом в зиготе у человека (их получится 12) и проанализируем каждый вариант.

Таблица - Возможные комбинации половых хромосом в зиготе

♀ ♂	Х	ХХ	О
Х	ХХ	ХХХ	ХО
Y	ХУ	ХХУ	YО
ХУ	ХХУ	ХХХУ	ХУ*
О	ХО	ХХ*	ОО

1) **ХХ** — нормальный женский организм.

2) **ХХХ** — синдром *трисомии Х*. Частота встречаемости 1:800 — 1:1000. Кариотип 47, ХХХ. Женский организм с мужеподобным телосложением. Недоразвиты первичные и вторичные половые признаки. В 75% случаев наблюдается умственная отсталость. У таких женщин нарушена функция яичников, но иногда они могут иметь детей. Повышен риск заболевания шизофренией.

3) **ХО** — синдром *Шерешевского-Тернера* (моносомия Х). Частота встречаемости 1:2000 — 1:3000. Кариотип 45,Х. Фенотип женский. Соматические признаки: рост 135-145 см, крыловидная кожная складка на шее (от затылка к плечу), низкое расположение ушей, недоразвитие первичных и вторичных половых признаков. В 25% случаев имеются пороки сердца и аномалии работы почек. Интеллект страдает редко. Недоразвитие яичников приводит к бесплодию. Эффективно раннее гормональное лечение.

4) **ХУ** — нормальный мужской организм.

5) **ХХУ** и **ХХХУ** — синдром *Кляйнфельтера*. Частота встречаемости 1:400 -1:500. Кариотип — 47, ХХУ; 48, ХХХУ и др. Фенотип мужской. Женский тип телосложения, гинекомастия. Высокий рост, относительно длинные руки и ноги. Слабо развит волосяной покров. Интеллект снижен. Вследствие недоразвития семенников слабо развиты первичные и вторичные половые признаки, нарушено течение сперматогенеза. Половые

рефлексы сохранены. Иногда эффективно раннее лечение мужскими половыми гормонами.

6) YO и OO — зиготы нежизнеспособны.

7) XY* - нормальный мужской организм. Его особенность заключается в том, что обе половые хромосомы он получил от отца.

8) XX*- нормальный женский организм, но обе половые хромосомы получены от матери.

Иногда возможны случаи увеличения количества Y хромосом: XYY и др. Эти больные имеют признаки синдрома Кляйнфельтера, высокий рост (в среднем 186 см) и агрессивное поведение. Могут быть аномалии зубов и костной системы. Половые железы развиты нормально.

10. Гаплоидия

Гаплоидия — это явление уменьшения числа хромосом, когда в соматической клетке присутствует только гаплоидный набор хромосом. **Гаплоидом** называют организм, имеющий в соматических клетках гаплоидный набор хромосом.

Естественная гаплоидия встречается в жизненном цикле пчел (трутень), спорообразующих грибов и одноклеточных водорослей.

У высших растений гаплоид впервые был обнаружен у дурмана в 1921 г., затем гаплоиды были найдены у пшеницы, кукурузы. В настоящее время гаплоидия известна у 71 вида.

Фенотип гаплоидов имеет следующие особенности:

1. Проявляются **рецессивные** гены, так как их не прикрывают доминантные аллели.

2. По внешнему виду, как правило, они сходны с соответствующими диплоидными организмами, но **мельче** их. Исключение – трутень.

3. Клетки имеют **меньший размер**, что может объясняться уменьшением дозы генов.

4. Гаплоиды почти **бесплодны**, так как у них в мейозе не образуются полноценные гаметы: хромосомы не имеют гомологов, в силу чего они не конъюгируют и расходятся случайно, образуя **несбалансированные** гаметы. В редких случаях весь набор хромосом отходит к одному полюсу. Из этих клеток образуются гаметы с нередуцированным гаплоидным числом хромосом. При встрече таких гамет образуется диплоид, гомозиготный по всем генам.

Растения, полученные от гаплоида путем *вегетативного размножения*, имеют фенотип, полностью соответствующий генотипу. Изучая гаплоидные растения, можно выявлять полезные и вредные рецессивные мутации.

Лекция № 10

Тема лекции: Молекулярные механизмы мутагенеза и репарации ДНК

План лекции:

1. Механизмы точковых мутаций
2. Экспансия тринуклеотидных повторов
3. Прямая коррекция мутационных повреждений
 - 3.1. Репарация ДНК-полимеразой
 - 3.2. Световая репарация
 - 3.3. Репарация алкилирующих повреждений
 - 3.4. Репарация лигазой
4. Эксцизионная репарация
 - 4.1. Темновая репарация
 - 4.2. Репарация неспаренных оснований
 - 4.3. Пострепликативная репарация
 - 4.4. SOS - репарация

1. Механизмы точковых мутаций

Основные *механизмы* точковых мутаций (как спонтанных, так и индуцированных):

1. Ферментативная модификация структуры нуклеотидов.
2. Ошибки репликации.
3. Ошибки репарации.
4. Воздействие мутагенных факторов.

Так, у *E.coli* большое число спонтанных мутаций возникает путем **ферментативной модификации цитозина**. Фермент *метилаза* добавляет группу $-CH_3$ к некоторой части цитозиновых остатков в молекуле ДНК, образуется 5-метилцитозин. В результате происходят транзиции от G - C к A - T.

Теперь, что касается **ошибок репликации**, точнее, *ошибок в работе ДНК-полимераз*, то они возникают с частотой примерно 10^{-5} . *Корректирующая 3'-5'-экзонуклеазная активность* ДНК-полимераз снижает эту частоту до 10^{-10} . Репаративные процессы еще более уменьшают возможность подобных ошибок. Тем не менее, число их все же достаточно для возникновения мутаций.

Ошибки возникают и в молекулярных механизмах **репарации**.

Среди **мутагенных факторов**, как известно, выделяют ионизирующие и неионизирующие излучения, а также химические и биологические агенты.

Проникая в ткани, **ионизирующие излучения** разрывают химические связи, в том числе и в ДНК. В результате возникают хромосомные перестройки и разрывы, а также точковые мутации.

Ультрафиолетовый свет не является ионизирующим, тем не менее это довольно эффективный мутаген. Связано это с тем, что пурины и пиримидины интенсивно поглощают ультрафиолет с длиной волны 254-260 нм, в результате чего возникают димеры между молекулами **тимина** находящимися рядом в одной и той же цепи ДНК или на противоположных цепях. Со значительно меньшей частотой образуются димеры других пиримидинов. Возникновение димера приводит к **выпячиванию** в цепи ДНК. Большинство таких нарушений репарируется, оставшиеся нерепарированными приводят к мутациям.

Многие **химические соединения** могут индуцировать мутации. Это аналоги оснований; соединения, модифицирующие основания; интеркалирующие агенты.

Аналоги оснований по молекулярной структуре очень похожи на обычные азотистые основания. Эти соединения вызывают мутации потому, что они могут существовать в альтернативных (**таутомерных**) состояниях. В каждом из двух состояний аналоги спариваются с разными нормальными основаниями, в результате чего может произойти их замена. Например, **5-бром урацил** в нормальном состоянии спаривается с аденином, в более редком таутомерном состоянии — с гуанином.

Агенты, модифицирующие основания. Ряд химических агентов действуют как мутагены, непосредственно модифицируя химическую структуру оснований. К ним относятся **дезаминирующие, гидроксимирующие и алкилирующие** агенты.

Азотистая кислота (HNO_2) осуществляет окислительное **дезаминирование**, т. е. удаляет аминогруппы ($-NH_2$) из таких оснований как гуанин, цитозин и аденин.

Например, когда модифицируется цитозин, получается урацил (который спаривается с аденином). В итоге происходит транзиция от С-Г к Т-А в ходе акта репликации.

Другим мутагеном, модифицирующим основания, является **гидроксиламин (NH_2OH)**, который специфически реагирует с цитозином, добавляя гидроксильную группу ($-OH$), в результате чего он спаривается уже не с гуанином, а с аденином.

И наконец, рассмотрим алкилирующий агент **метилметансульфонат**, алкилирующий гуанин, т.е. он добавляет группы $-CH_3$ или $-C_2H_5$ к кислороду в 6-й позиции, в результате чего образуется O^6 -алкилгуанин или

O⁶-метилгуанин. Метилированный гуанин будет спариваться не с цитозином, а с тиминном.

Интеркалирующие агенты. К этой группе относятся профлавин, акридин, этидиумбромид и др. Они встраиваются (интеркалируют) между соседними нуклеотидами в одной или обеих цепях ДНК.

Если интеркалирующий агент встраивается между соседними основаниями в матричной цепи ДНК, дополнительное основание, в данном случае G (его выбор случаен), включается во вновь синтезируемую цепь и возникает мутация **сдвига рамки**. Похожая ситуация будет и при удалении интеркалирующего агента.

Весьма часто в клетке происходят инсерции **мобильных элементов**. Когда мобильный элемент вырезается из места встройки, могут возникнуть делеции прилегающего материала.

Существует такое понятие, как **горячие точки** мутирования (*hotspots*) – это участки гена, в которых частота мутации на 1...3 порядка выше, чем в соседних сайтах. Для каждого мутагена они свои и их локализация связана со специфичностью воздействия мутагена на молекулу ДНК.

2. Экспансия тринуклеотидных повторов

В 1991 г. **А. Феркерк** с сотрудниками идентифицировали ген умственной отсталости **FMR-1** (*fragile X mental retardation*), расположенный в **хрупком** (*fragile*) сайте в X-хромосоме человека. Ген экспрессируется в клетках мозга. У мутантов-гемизигот развивается умеренная степень **умственной отсталости** (I.Q. ~50). На долю мутантов по этому гену приходится примерно четверть всех психических заболеваний у мужчин. С гена считывается мРНК размером 4,8 тпн, кодирующая белок, состоящий из 657 аминокислотных остатков.

Выше кодирующего района расположен сегмент, в котором триплет **CGG** повторен примерно **30 раз**. У некоторых людей число копий триплета увеличено **до 50-100**. У них возникает цитологически выявляемый **хрупкий сайт** в X-хромосоме. Мужчины — носители этого X-аллеля обнаруживают нормальное умственное развитие, но они становятся **носителями предмутации**.

В F₁ дочери, получившие этот аллель, также имеют нормальный I.Q. Однако в этой хромосоме начинается **экспансия CGG-повтора**, когда она передается **следующему поколению**. Когда число повторов достигает нескольких тысяч, белок, кодируемый геном *FMR-1*, естественно, не функционирует, и нормальный уровень умственного развития не достигается.

Не менее чем в 50 генах человека содержится по пять или более *повторенных триплетов*. И по крайней мере *12 болезней* у человека обусловлены *экспансией*, т. е. увеличением числа копий тринуклеотидных повторов.

Некоторые *закономерности* этого типа мутирования:

1. Нестабильность числа копий тринуклеотидных повторов начинается после достижения определенного порога (*35-50 копий*), после чего число тринуклеотидов начинает быстро увеличиваться в последующих поколениях.

2. Все известные до сих пор мутации этого сорта подразделяются на две группы. В первую входят мутации, обусловленные массивной экспансией в *некодирующих районах*. Вторая группа включает мутации с *умеренной экспансией* *CAG*-повторов в *экзоне FMR – гена*, кодирующих *полиглутамин*, что приводит к образованию *токсического белка* с последующей гибелью нейронов.

3. Прямая коррекция мутационных повреждений

Все клетки имеют системы ферментов, репарирующих повреждения ДНК. Известны 2 основных типа таких систем:

- 1) *непосредственно* корректирующие повреждения;
- 2) сначала *вырезающие* повреждения с образованием одноцепочных брешей, а затем *заполняющие эту брешь*.

Если эти системы дадут сбой, то возникнет мутация.

3.1. Репарация ДНК-полимеразой

Большинство бактериальных полимераз в дополнение к *основной полимеризующей* активности в направлении 5'-3' имеет *редактирующую (корректирующую) экзонуклеазную* активность в направлении 3'-5'. Если встраивается «неправильный» нуклеотид, ошибка чаще всего (*в 99% случаев*) распознается полимеразой, вероятно, из-за того, что в этом месте в двойной спирали образуется пузырь или впячивание. Процесс репликации останавливается до тех пор, пока «неправильный» нуклеотид не будет удален, а нужный не встанет на его место.

У эукариотических ДНК-полимераз 3'-5'-экзонуклеазной активности не обнаружено.

3.2. Световая репарация

В 1949 г. **А. Кельнер, Р. Дюльбекко и И. Ф. Ковалев** независимо друг от друга установили, что жизнеспособность ряда микроорганизмов, утраченная ими после облучения УФ – светом, может быть восстановлена, если их сразу после этого осветить *видимым светом*.

Это явление было названо *фотореактивацией*, или световой репарацией. Тиминовые димеры, возникшие в результате УФ-облучения, разрушаются, и тимины возвращаются к своей исходной форме под действием видимого света.

Фотореактивация катализируется ферментом *фотолиазой*, кодируемой геном **phr**. Этот фермент, когда активируется фотоном света, расщепляет димер на исходные составляющие. Линии с мутациями гена **phr** имеют дефекты световой репарации. Фотолиаза обнаружена у прокариот и у низших эукариот, однако ее нет, например, у человека.

3.3 Репарация алкилирующих повреждений

Генетические повреждения, вызываемые присоединением *алкильных* или *метильных групп*, могут репарироваться в результате удаления этих групп *специфическими ферментами*. Следует заметить, что в этой репарирующей системе модифицированное основание не удаляется из ДНК. В данном случае фермент, *О⁶-метилгуанинтрансфераза*, распознает О⁶-метилгуанин в ДНК и удаляет метильную группу, возвращая основание в исходную форму.

3.4. Репарация лигазой

Еще один тип прямой репарации был обнаружен для одностранных разрывов ДНК, индуцируемых, например, ионизирующим излучением. При этом фермент *лигаза* осуществляет прямое воссоединение разорванных концов в молекуле ДНК.

4.Эксцизионная репарация

При этом типе репарации поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК, а затем образовавшиеся бреши заполняются неповрежденным материалом.

4.1. Темновая репарация

Первая система такого типа была открыта в 1964 г. **Бойсом** и др. Эти авторы выявили несколько УФ-чувствительных мутантов у *E.coli*, которые после облучения ультрафиолетом обнаруживали более высокий, чем в норме, уровень мутаций.

Эти мутации были названы **UvrA** (UV - repair — репарация УФ – повреждений). При этом мутанты **UvrA** сохраняли способность репарировать димеры с потреблением света, т. е. они имели нормальную систему фотореактивации. Поэтому предположили, что должна быть и *другая система репарации*, которая не требует света. Эта система была названа *темновой*,

или *эксцизионной* репарацией. Так как клетки *дикого типа* могут репарировать димеры в темноте, аллель дикого типа называют **UvrA⁺**.

Предположим, что УФ – свет вызвал образование димера тимина в ДНК. Нарушение опознается **UvrA, B, C - эндонуклеазой**; это фермент, состоящий из 3 – х субъединиц — **UvrA, UvrB и UvrC**. Этот фермент (нуклеаза) делает надрез в поврежденной цепи через 8 нуклеотидов в 5'-сторону от димера и второй надрез — через 4 – 5 нуклеотидов с 3' – стороны. Затем вырезанный фрагмент удаляется, брешь заполняется с помощью ДНК-полимеразы I и запечатывается ДНК – лигазой.

Измененные азотистые основания репарируются в темноте и *другими способами*. Клетки содержат фермент *гликозилазу*, которая может обнаружить ненормальное основание и удалить его путем разрушения гликозидной связи между основанием и сахаром. Эта каталитическая активность оставляет *брешь* в ДНК, где удалено основание. Эта брешь называется **AP-сайтом** (*апуриновым*, если нет А или G, или *апириимидиновым*, если отсутствуют С или Т).

Фермент **AP-эндонуклеаза** опознает наличие бреши и разрезает остов ДНК на 5'-конце от поврежденного основания. Затем удаляется фосфат на 5'-конце надрезанной нити с помощью **фосфодиэстеразы**. Образовавшаяся брешь из одного нуклеотида заполняется **ДНК-полимеразой** и запечатывается **ДНК-лигазой**.

К настоящему времени описано *много типов ферментов-гликозилаз*, каждый из которых узнает разнообразные поврежденные основания – метилированные, дезаминированные и др.

4.2. Репарация неспаренных оснований

Как мы уже говорили, во время репликации ДНК – полимеразы допускает ошибки, в результате которых в дочернюю цепь ДНК оказываются включенными нуклеотиды, не комплементарные нуклеотидам в материнской нити (их называют **мисмэтчами** — от англ. *mismatch*). Такие ошибки корректируются с помощью **мисмэтч – системы репарации**. У *E. coli* в этот процесс вовлечены продукты трех генов: **mutS, mutL и mutH** (рис. 8.14). Мутации по всем этим генам приводят к увеличению частоты спонтанных мутаций у *E. coli* на 2-5 порядков.

Ясно, что неправильное спаривание (ошибка репликации) может затронуть **только дочернюю нить ДНК**, **матричная нить** в процессе репликации **остаётся неизменной**. Следовательно, система репарации мисмэтчей должна оперировать на дочерней цепи и производить замену некомплементарных оснований только в ней. Клетки при этом используют **важное различие** в

структуре матричной и дочерней нитей, найденное в 70-х гг. Оказалось, что вскоре после окончания репликации специальные ферменты *метилазы* присоединяют метильные группы к аденинам в последовательностях **GATC**. Поэтому во время следующего цикла репликации нити ДНК *оказываются различимыми*: материнская нить несет метилированные аденины, а дочерняя – нет.

Пока они остаются неметилованными, клетки должны успеть отрепарировать мисмэтчи.

Процесс начинается с того, что к некоплементарной паре мисмэтча присоединяется белок **MutS**. С ним тут же связываются белок **MutL** и две молекулы белка **MutH**. Белок **MutH** распознает участок **GATC** и обладает *эндонуклеазной активностью*, с помощью которой ДНК в этой последовательности может быть надрезана вблизи аденина в неметилованной нити. Надрезы могут быть внесены как в 5'-, так и в 3'-положение относительно аденина. Мультимолекулярный комплекс, составленный из этих белков, массивен и связывает длинный фрагмент ДНК. Последний *протягивается* через комплекс до следующего участка **GATC**, *расположенного по другую сторону от мисмэтча*. Иногда расстояние между участками **GATC** может превышать *несколько тысяч нуклеотидов*.

Благодаря своей эндонуклеазной активности **MutH** разрезает дочернюю нить в участке **GATC**. Затем к комплексу присоединяется еще один белок — *экзонуклеаза*, которая разрушает всю дочернюю нить до места неправильного спаривания и даже несколько дальше. Затем бреши застраиваются *ДНК-полимеразой*, а концы воссоединяются с помощью *лигазы*.

4.3. Пострепликативная репарация

Этот способ восстановления целостности ДНК заключается в репарации *пробелов*, образующихся *в дочерних цепях* напротив *неудаленных* до репликации *димеров пиримидинов*. Основная часть таких пробелов репарируется путем *рекомбинационных обменов* между двумя материнскими молекулами ДНК. В клетках этот процесс контролируется по крайней мере 17 генами.

Из комплементарной нити сестринской двойной спирали (она была свободна от дефектов), на которой репликация уже завершена, с помощью белка **RecA** вырезается участок ДНК, равный по длине участку бреши, и встраивается в брешь. Затем *лигазы* соединяют концы вставленного фрагмента с концами нормально синтезированного участка дочерней нити.

После этого другие ферменты репарации устраняют димер в исходно поврежденной нити, и ДНК становится «*залеченной*». Одновременно брешь,

оставшаяся после вырезания участка из материнской нити, застраивается *ДНК – полимеразой I* и концы соединяются *лигазой*.

4.4. SOS - репарация

Что случится, если клетка подошла к моменту, когда нужно реплицировать ДНК, но в ней остались повреждения, которые ни одна из описанных выше систем репарации не смогла устранить? Репликация застынет на первом же неустранимом повреждении, и если их в ДНК много, клетка должна погибнуть. В этих условиях в клетках активируется еще один крайне *рискованный* механизм репарации, обнаруженный впервые в 1974 г. **М. Радманом**.

Большая доза УФ – света индуцирует повреждение ДНК (образование Т – Т димера), а также синтез *RecA - копротеазы*, которая разрезает белок **LexA** – репрессор оперона **umuD, C**. В результате синтезируются белки **UmuD** и **UmuC**, они вступают в комплекс с *ДНК – полимеразой* и **RecA**, который способен завершить остановившуюся репликацию на поврежденной матрице. При этом напротив повреждений в дочернюю цепь ставятся *любые случайные нуклеотиды*.

В результате SOS-репарации клетка спасается на этом этапе: ее ДНК оказывается удвоенной, *хотя и с ошибкой*, и теперь может произойти клеточное деление. Но если из-за этой ошибки жизненно важные функции клетки все-таки пострадают, такая клетка позже все равно погибнет.

С дефектами систем репарации связаны некоторые *наследственные болезни человека*.

В 1968 г. **Дж. Кливер** нашел, что причиной неизлечимой болезни *пигментной ксеродермии* являются дефекты разных репарирующих систем. У носителей болезни под действием обычного *солнечного света*, в котором всегда присутствуют УФ-лучи, на коже возникают красные пятна, которые постепенно переходят в незарастающую коросту, которая затем трансформируется в *раковые опухоли*.

В настоящее время известно, что многие другие наследственные болезни человека связаны с повреждениями процессов репарации.

Если в клетке, несмотря на осуществляемую репарацию, количество повреждений структуры ДНК остается высоким, в ней блокируются процессы репликации ДНК. Такая клетка не делится, а значит, не передает возникших изменений потомству.

Вызываемая повреждениями ДНК остановка клеточного цикла в сочетании с невозможностью молекулярной репарации измененного наследственного материала может с участием белка, синтез которого контроли-

руется геном **p53**, приводит к активации процесса **самоликвидации (апоптоз)** дефектной клетки с целью устранения ее из организма.

Таким образом, обширный набор различных ферментов репарации осуществляет непрерывный **«осмотр» ДНК**, удаляя из нее поврежденные участки и способствуя поддержанию стабильности наследственного материала. Совместное действие ферментов репликации (ДНК-полимераза и редактирующая экзонуклеаза) и ферментов репарации обеспечивает достаточно **низкую частоту ошибок** в молекулах ДНК, которая поддерживается на уровне $1 \cdot 10^{-9}$ пар измененных нуклеотидов на геном. При размере генома человека $3 \cdot 10^9$ нуклеотидных пар это означает появление около **3 ошибок** на реплицирующийся геном. Вместе с тем даже этот уровень достаточен для образования за время существования жизни на Земле значительного генетического разнообразия в виде генных мутаций.

Лекция № 11

Тема лекции: Природа гена

План лекции:

1. Развитие представлений о гене
2. Аллелизм и критерии аллелизма
3. Тонкая структура гена. Ступенчатый аллелизм, псевдоаллелизм
4. Современное определение гена
5. Оперонный принцип организации генов у прокариот

1. Развитие представлений о гене

Впервые **Мендель** постулировал, что *ген* (наследственный задаток, по Менделю) является *дискретной* единицей наследственности, которая определяет развитие *одного признака*.

Затем **Морган** показал, что гены связаны с хромосомами. С помощью классических методов генетического анализа были установлены следующие *свойства гена*:

ген имеет основные *свойства хромосом*: способность к редупликации — самовоспроизведению и к закономерному распределению в митозе и мейозе;

ген занимает определенный участок (локус) хромосомы и является предельной *единицей рекомбинации*, не разделяемой посредством кроссинговера;

ген *мутирует как единое целое* и представляет собой единицу наследственной изменчивости — мутации.

Таким образом, согласно *классическому определению*, ген представляет собой *элементарную единицу* строения, функции, мутирования и рекомбинации наследственного материала; он определяет развитие одного элементарного признака и *неделим*.

Указанное представление о гене *на раннем этапе* существования генетики оказало *положительное влияние* на дальнейшее ее развитие. Позднее выяснилось, что ген является значительно *более сложной единицей* наследственности и изменчивости, чем это считалось раньше.

2. Аллелизм и критерии аллелизма

Аллелями называются различные состояния (варианты) одного гена. Как известно, в результате мутирования ген может находиться более чем в двух различных состояниях (*явление множественного аллелизма*).

Для объяснения существования пар аллелей уже в 1902 г. **К. Корренс** и **У. Бэтсон** предложили теорию, согласно которой доминантный признак обуславливается *наличием* определенного гена, а рецессивный – выпадением, *отсутствием* этого гена. Эта теория получила название *теории «присутствия-отсутствия»*. Она очень просто объясняла существование пар аллелей. Вначале признавал ее и Т. Морган. Однако позднее, когда были открыты *серии* аллельных генов, Морган отказался от нее. Его слова: «Не могут одному присутствию отвечать несколько отсутствий!»

Как же практически определить, аллельны или нет две независимо возникшие мутации, изменяющие проявление одного и того же признака, т. е. произошли они *в одном гене* или *в разных*? Каков *критерий аллелизма*? Впервые на эти вопросы ответил **Т. Морган**. Он предложил *два критерия аллелизма*: функциональный (или комплементарный) и рекомбинационный.

Функциональный критерий основывается на том, что при скрещивании двух мутантов, несущих изменения *разных генов*, возникает гибрид первого поколения — *дигетерозигота*, имеющая *дикий фенотип* в силу доминирования нормальных аллелей каждого из генов.

В таком случае принято считать, что нормальные аллели исследуемых мутаций *комплементарны* друг другу. В то же время если скрещиваемые мутанты несут аллели *одного гена*, то в компаунде дикий тип *не проявляется* (См. рис.).

Например, при скрещивании двух мутантных *норок*, белой и пастелевой, все гибриды имеют коричневую окраску, т. е. дикий фенотип. При скрещивании же белой норки с другой мутантной формой—платиновой все гибриды имеют платиновую окраску, т. е. мутантный фенотип.

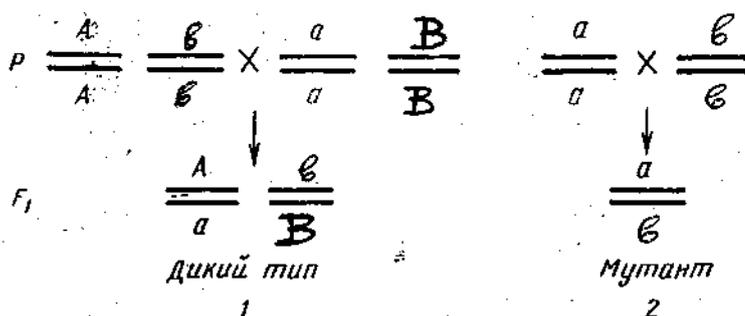


Рис. Функциональный тест на аллелизм:

1 — мутации а и в неаллельны; 2 - мутации а и в аллельны

Следовательно, в первом случае наблюдается комплементарность, т. е. неаллельность, а во втором — отсутствие комплементарности, т. е. аллельность.

Рекомбинационный критерий заключался в том, что только мутации в *разных* генах способны рекомбинировать между собой в результате кроссин-

говера. Исследователи школы Моргана считали мутации *аллельными*, если одновременно соблюдались функциональный (гетерозигота — *мутантный фенотип*) и рекомбинационный (*рекомбинаций нет*) критерии. В дальнейшем критерии аллелизма уточнялись.

3. Тонкая структура гена

Ступенчатый аллелизм. В 1929 г. в нашей стране в работах А. С. Серебровского и его молодых сотрудников — Н. П. Дубинина, Б. Н. Сидорова и других была впервые экспериментально показана функциональная *сложность гена*. Авторы исследовали у дрозофилы серию множественных аллелей локуса *scute* (от лат. *scutum* – щиток), локализованного в нулевой точке хромосомы X. Мутации этого локуса sc_1 , sc_2 ; sc_3 и другие обуславливают *редукцию разных щетинок* на теле мухи.

При скрещивании особей, гомозиготных по тем или иным мутантным аллелям, например $\frac{sc_1}{sc_1} \times \frac{sc_2}{sc_2}$, выявилась интересная картина: у гетерозигот

$\frac{sc_1}{sc_2}$, как правило, отсутствовали лишь те щетинки, которые были редуциро-

ваны *у обеих* гомозигот $\frac{sc_1}{sc_1}$ и $\frac{sc_2}{sc_2}$.

Более того, если два аллеля нарушали развитие *совсем разных* щетинок, то в компаунде они давали *возврат к норме*: развивались все щетинки, например у особей sc^5/sc^6 .

Всего было исследовано 17 различных мутаций в локусе *scute*, и при их сочетании наблюдалась одна и та же закономерность.

Авторы впервые в мире сделали вывод о «*делимости*» гена, т.е. о его сложной, многосоставной природе.

Авторы называли ген *scute базигеном*, который состоит из многих частей. Эти части, т. е. элементарные участки внутри базигена были названы *центрами*. Мутации (*трансгенации*) могут захватывать как отдельные центры, так и целые их группы. При этом *аллели* (т. е. измененные центры, или *трансгены*) расположены ступенчато. Это явление было названо *ступенчатым аллелизмом*.

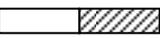
Эту теорию сложного (*центрового*) строения, или делимости, гена не поддержали крупнейшие генетики того времени (А. Стёртевант, Г. Мёллер и др.).

Псевдоаллелизм. Если считать, что ген не делится в результате кроссинговера, то при гаметогенезе у *компаундов*, несущих два аллеля одной се-

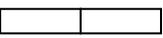
рии ($\frac{a_1}{a_2}$), могут образовываться гаметы **только двух типов** — a_1 и a_2 . При **возвратном скрещивании** таких особей с любой из родительских форм возможно появление только **мутантных** форм: $\frac{a_1}{a_2} \times \frac{a_1}{a_1} \rightarrow \frac{a_1}{a_1}$ и $\frac{a_2}{a_1}$. Действительно, это и наблюдается при исследовании **ограниченной выборки** потомков от возвратного скрещивания.

Однако если выборку **увеличить**, например, до 100 тысяч и более особей, то в ней окажутся и потомки **дикого типа**. Такие особи могут появиться **при двух условиях**: мутация затрагивает **часть гена** дикого типа, и **между частями гена может происходить кроссинговер**.

Это можно представить следующим образом:

ген a_1 : ; ген a_2 : 

Тогда **гетерозигота** $\frac{a_1}{a_2}$ имеет такой вид: 

При кроссинговере между частями гена получатся следующие гены:  и . Последний представляет собой **исходный ген** и обуславливает возникновение особей **дикого типа**.

Явление это было открыто в 1949 г. **М. Грином** и **К. Грином** при изучении генов *lz* у дрозофилы, определяющих строение глаз. У гетерозигот по двум мутациям этого гена среди потомков в 0,1% случаев были **нормальные глаза**, что могло произойти только в результате кроссинговера **внутри гена lz**.

Это явление противоречило представлению о гене как о единице, неделимой при кроссинговере. Однако трудно было сразу отказаться от традиционных представлений, поэтому об **аллелях, делимых при кроссинговере**, стали говорить как о **псевдоаллелях**.

Первоначально считали, что **псевдоаллелизм** встречается в виде **редких исключений**, но с увеличением разрешающей способности генетического анализа, когда число анализируемых особей в исследуемых выборках резко возросло, становилось все более ясным, что данное явление распространено **весьма широко**. Оно было продемонстрировано на разнообразных организмах: нейроспоре, дрожжах, хлопке, кукурузе, шелкопряде, дрозофиле, голубях, мышах, норках и многих других.

В связи с этим были сделаны попытки модернизировать критерии аллелизма и само определение гена.

4. Современное определение гена

Огромный вклад в понимание структуры и функции гена внесли **Джордж Бидл** и **Эдвард Тейтум**, которые в начале 40-х гг. впервые исследовали биохимические мутации у *Neurospora crassa*. Эти исследования показали, что мутации ауксотрофности у нейроспоры прерывают цепи метаболизма на конкретных этапах. Причем *аллельные* мутации всегда затрагивали *один и тот же этап биосинтеза*. На основе своих результатов Дж. Бидл и Э. Тейтум сформулировали принцип «**ОДИН ГЕН – ОДИН ФЕРМЕНТ**», означавший, что каждый ген контролирует синтез какого-либо определенного фермента.

За это открытие Бидл и Тейтум в 1958 г. получили Нобелевскую премию.

Позднее было показано, что многие белки имеют четвертичную структуру, в образовании которой принимают участие разные *пептидные цепи*. Например, *гемоглобин* взрослого человека включает четыре глобиновых цепи — 2 α и 2 β , кодируемые *разными генами*. Поэтому формула, отражающая связь между геном и признаком, была несколько преобразована: «**Один ген — один полипептид**».

Открытия *экзон-интронной* организации эукариотических генов и возможности *альтернативного сплайсинга* показали, что одна и та же нуклеотидная последовательность первичного транскрипта может обеспечить синтез нескольких полипептидных цепей с разными функциями.

Примером может служить ген **box** (или **cob**), кодирующий дыхательный фермент *цитохром В* митохондрий дрожжей. В результате разных вариантов сплайсинга с разных экзонов этого гена образуются *две разных и-РНК* - короткая и длинная.

Короткая служит матрицей для синтеза самостоятельного белка *РНК-матуразы*, которая участвует в созревании (сплайсинге) *длинного* первичного транскрипта и превращении его в матрицу для самого цитохрома В.

У вирусов и бактерий описана ситуация, когда один ген *может одновременно являться частью другого гена* или некоторая нуклеотидная последовательность может быть составной частью двух разных *перекрывающихся генов*. Например, на физической карте генома фага **ФХ174** видно, что последовательность гена В располагается внутри гена А, а ген Е является частью последовательности гена D. Этой особенностью организации генома фага удалось объяснить существующее несоответствие между относительно *небольшим его размером* (он состоит из 5386 нуклеотидов) и *числом аминокислотных остатков* во всех синтезируемых белках, которое *превышает теоретически допустимое* при данной емкости генома. Возможность сборки разных пептидных цепей на мРНК, синтезированной с перекрывающихся ге-

нов (А и В или Е и D), обеспечивается наличием внутри этой мРНК *участков связывания с рибосомами*. Это позволяет начать трансляцию другого пептида с новой точки отсчета.

В геноме фага λ были также обнаружены *перекрывающиеся гены*, транслируемые как *со сдвигом рамки*, так и в той же рамке считывания. Предполагается также возможность транскрибирования двух разных мРНК с *разных цепей* одного участка двунитевой ДНК. Это требует наличия промоторных областей, определяющих движение РНК-полимеразы *в разных направлениях* вдоль молекулы ДНК (вспомним строение генома митохондрий).

Перекрывающиеся гены представляют собой довольно распространенный вариант организации генома *вирусов* и, возможно, *прокариот*. У эукариот *прерывистость генов* также обеспечивает возможность синтеза разнообразных пептидов на основе одной и той же последовательности ДНК.

Таким образом, необходимо внести *поправку* в определение гена. Очевидно, *нельзя* больше говорить о гене как о непрерывной последовательности ДНК, *однозначно кодирующей определенный белок*. По-видимому, в настоящее время наиболее приемлемой все же следует считать формулу «*Один ген - один полипептид*», хотя некоторые авторы предлагают ее переименовать: «*Один полипептид — один ген*».

Мы будем пользоваться следующим *современным определением гена*:

Ген – это участок нуклеиновой кислоты, определяющий синтез одной (или нескольких) полипептидных цепей или одного вида РНК (транспортной, рибосомальной, малой ядерной и др.).

5. Оперонный принцип организации генов у эукариот

Французские микробиологи **Франсуа Жакоб** и **Жак Моно** сформулировали в 1961 г. концепцию оперона. *Оперон* – это система генов, определяющих синтез *группы белков*, которые участвуют *в одной цепи биохимических преобразований*. Например, это могут быть гены, которые детерминируют синтез ферментов, участвующих в утилизации какого-либо вещества или синтезе какого-то компонента клетки.

В 1965 г. **Франсуа Жакоб**, **Жак Моно** и **Андрэ Львов** получили за эту работу Нобелевскую премию.

Гены можно поделить на *две группы* по принципу действия их продукта. Гены, которые кодируют *структуру* белков, называются *структурными*. Таких генов у бактерий большинство.

Гены (последовательности нуклеотидов), которые обеспечивают *регуляцию экспрессии* (активности, транскрипции) структурных генов, называются *регуляторными*.

В качестве *примера* оперонной организации генов рассмотрим так называемый *лактозный оперон* кишечной палочки.

При отсутствии в среде, на которой выращиваются бактерии, сахара *лактозы* белок *репрессор*, кодируемый *геном-регулятором (I)*, взаимодействует с *оператором (O)*, препятствуя соединению РНК-полимеразы с *промотором (P)* и транскрипции *структурных генов Z, Y, A*.

Появление в среде лактозы *инактивирует* репрессор, он не соединяется с оператором, РНК-полимераза взаимодействует с промотором и осуществляет транскрипцию *полицистронной мРНК*. Последняя обеспечивает синтез сразу всех ферментов, участвующих в метаболизме лактозы. Уменьшение содержания лактозы в результате ферментативного расщепления приводит к восстановлению способности репрессора соединяться с оператором и прекращению транскрипции генов Z, Y, A.

Лактоза относится к *β -галактозидам*, в результате ее расщепления образуются *глюкоза и галактоза*.

Весь *кластер генов* занимает около 6000 пн. Ген *lacI* имеет свои промотор и терминатор. Конец района *lacI* непосредственно примыкает к промотору P_{lac} , оператор O_{lac} занимает первые 26 пн гена *lacZ*. После гена *lacZ*, который имеет *необычно большую длину*, расположены гены *lacY* и *lacA*, а также *общий терминатор транскрипции*.

Гены имеют следующие функции:

продукт *lacZ* расщепляет *β -галактозид* на составляющие его сахара;

продукт гена *lacY* является *β -галактозид-пермеазой*, он транспортирует *β -галактозид* в клетку;

ген *lacA* кодирует белок *трансацетилазу* — фермент, который переносит ацетильную группу с ацетил-СоА на β -галактозид.

Мутации генов *lacZ* и *lacY* дают фенотип *Lac⁻*, когда клетки не могут использовать лактозу.

Мутации *гена-регулятора I* приводят к тому, что гены *lacZ, Y* и *A* экспрессируются *непрерывно*.

Данный способ регуляции активности гена со стороны гена-регулятора называется *негативным контролем*, так как *продукт гена* (репрессор) *останавливает* транскрипцию. Он может быть *двух видов*: *негативная индукция* (если репрессор активен сам по себе) и *негативная репрессия* (если белок репрессор становится активным, соединяясь с низкомолекулярным *ко-репрессором*; например, в случае *триптофанового оперона* у *E. coli*).

Основным преимуществом оперонной организации генов у микроорганизмов является **координация регуляции** активности: все гены экспрессируются или не экспрессируются **одновременно**, и относительные **количества всех трех ферментов** остаются **одинаковыми** независимо от условий индукции.

В ходе реализации геномного проекта *E. coli*, завершившегося в 1997 г. полным секвенированием ДНК, в геноме кишечной палочки выявлено **2584 оперона**. Среди них 73 % содержат один цистрон, 16 % — 2 цистрона, 4,6 % — 3 цистрона (в том числе *lac*-оперон); 6 % — 4 и более цистрона (в том числе *trp*-, *his*-опероны). Все они имеют не менее одного промотора и управляются регуляторными белками.

У эукариот опероны не обнаружены.

Лекция № 12

Тема лекции: Строение гена на молекулярном уровне

План лекции:

1. Регуляторная часть гена
 - 1.1. Промоторы
 - 1.2. Энхансеры
 - 1.3. Инсуляторы
2. Структурная часть гена
 - 2.1. Интроны и экзоны
 - 2.2. Сплайсинг и альтернативный сплайсинг
3. Терминаторы транскрипции
4. Псевдогены
5. Кластерная организация генов в хромосомах эукариот

1. Регуляторная часть гена

1.1. Промоторы

Каждый ген состоит из *регуляторной* части, с которой начинается транскрипция *структурной* части, где записана информация о структуре белка, и *терминирующей* части, где завершается транскрипция.

У *прокариот* процесс транскрипции осуществляется с помощью *голлэнзима* (или «полного энзима») *РНК-полимеразы*, состоящего из *собственно РНК-полимеразы* и присоединяющегося к ней *σ-фактора*. Собственно РНК-полимераза состоит из *4 полипептидов*: двух α , а также β и β' -субъединиц. *РНК-полимераза* осуществляет основную реакцию – синтез молекулы иРНК, *σ-фактор* необходим для опознавания *промотора* — особого участка в начале гена.

Промоторы имеют определенные последовательности нуклеотидов, «узнаваемые» РНК-полимеразой.

Выявлены общие для всех бактерий *особенности структуры промоторов*:

- 1) наличие *стартовой точки* транскрипции;
- 2) особая последовательность нуклеотидов, начиная с положения **-10**;
- 3) особая последовательность нуклеотидов в районе **-35**;
- 4) фиксированное расстояние между участками **-10** и **-35**.

Рассмотрим их подробнее (рис. 7.35).

1. В *стартовой точке* транскрипции (у >90% промоторов) располагается *пурин*. Довольно часто это – центральный нуклеотид в последовательности **СAТ**.

2. Шесть нуклеотидов **ТАТААТ** в районе от **-10 п.н.** обнаруживают почти во всех промоторах. Они были найдены впервые в 1975 г. **Д. Прибновым** и названы *доменом Прибнова*.

3. Последовательность **ТТGАСА** находится в районе - **35 п.н.**

4. Расстояние, разделяющее указанные консервативные последовательности, составляет **16 и 18 п.н.** в 90 % промоторов. В виде исключений может быть 15, 19 или 20. Это расстояние важно, поскольку согласуется с формой молекулы РНК-полимеразы.

Рассмотрим процесс *инициации транскрипции*. Вначале РНК-полимераза контактирует с районом от -55 до +20 пн. *Иницирующий комплекс* содержит РНК-полимеразу и σ -фактор, который слабо связывается с участком промотора в положении **-35 п.н.**, контролируя посадку РНК-полимеразы именно на промотор.

Затем РНК-полимераза связывается с *доменом Прибнова* — районом вблизи положения **-10**. Одновременно с этим *расплетаются* полностью почти *два витка* двойной спирали ДНК (длиной в 17 п.н.) вокруг нуклеотида в положении -10. Следует отметить, что в этом положении присутствуют в основном *A-T нуклеотиды*, имеющие по две водородные связи между собой, что значительно *облегчает возможность их разъединения*.

Далее σ -фактор удаляется, а собственно фермент РНК-полимеразы становится *более компактным*, превращаясь в *комплекс элонгации*.

У *эукариот* процесс транскрипции значительно *сложнее по двум причинам*.

Во-первых, транскрипция осуществляется под действием *трех разных РНК-полимераз*:

РНК-полимераза I синтезирует **18, 28 и 5,8S** рРНК.

РНК-полимераза II считывает мРНК с генов, кодирующих **белки** и некоторые **мяРНК** (малые ядерные РНК);

РНК-полимераза III транскрибирует гены **5S рРНК**, **тРНК** и остальные **мяРНК**.

Во-вторых, РНК-полимераза эукариот *не может самостоятельно инициировать транскрипцию*. Для ее активирования необходимо большое число белков, называемых *факторами транскрипции*, которые должны объединиться *в комплекс*, прежде чем транскрипция начнется.

Рассмотрим организацию *регуляторных участков* гена, транскрибируемого с помощью РНК-полимеразы II. Типичный ген, считываемый этим ферментом, имеет *промотор*, расположенный выше стартовой точки транскрипции. Он содержит несколько *коротких (меньше 10 п.н.) последовательностей нуклеотидов*, с которыми связываются белки — *общие факто-*

ры транскрипции. Эти последовательности разбросаны на участке длиной свыше 200 пн. Они могут быть **позитивными** и **негативными**.

Другой регуляторный участок – **энхансер** – находится в нескольких тпн от промотора и содержит более плотно расположенные регуляторные **элементы** – последовательности нуклеотидов, которые также связывают факторы транскрипции, но они называются **специфическими**.

Промотор состоит из нескольких элементов. Из них самым близким к точке начала транскрипции является **ТАТА-домен**, называемый также **доме-ном Хогнесса**. Затем следуют домены **СААТ** и **ГС**.

Домен **СААТ** контролирует первоначальное связывание РНК-полимеразы с промотором, **ТАТА** и **ГС**, по-видимому, выполняют **вспомогательные роли**.

Помимо РНК-полимеразы в процессе транскрипции участвуют уже упомянутые белки – **общие факторы транскрипции**. Они связываются с РНК-полимеразой II, формируя **комплекс**, окружающий стартовую точку.

Известно **шесть общих факторов транскрипции**: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIЕ, TFIIF и TFIIN (по некоторым данным, семь — описан TFIIJ). Они обозначаются первыми буквами слов *transcription factors* — TF с добавлением римской цифры I, II или III, в зависимости от того, какая это РНК-полимераза — I, II или III. Далее следует обозначение собственно белковой молекулы.

В состав транскрибирующего комплекса входят еще белки, называемые **Srb** и **Swi/Snf**, которые помогают РНК-полимеразе **разрушить нуклеосомы** и декомпактизовать молекулу ДНК.

Всего в состав транскрибирующих комплексов входит до **50 белков**, иногда эти комплексы называют **транскриптосомами**, или транскрипционными пузырьками.

Комплекс РНК-полимеразы II и общих факторов транскрипции может функционировать самостоятельно, но с низкой эффективностью. Чтобы достичь необходимого уровня, требуется участие **специфических факторов транскрипции**.

Они обладают двумя важнейшими свойствами:

- 1) **опознавать** специфические **последовательности нуклеотидов**, расположенные в энхансерах, промоторах и других регуляторных элементах данного гена;
- 2) **связываться с белками**-другими компонентами транскрипционного аппарата после присоединения к ДНК.

Известны различные белки, имеющие следующие **специфические мотивы связывания с ДНК**:

1. Белки-*рецепторы стероидных гормонов*. Каждый такой белок активируется в результате связывания с определенным стероидным гормоном, т.е. в некоторых случаях для транскрипции гена нужны еще и *гормоны*.

2. Мотив «*цинковые пальцы*» (*zinc-finger*).

3. *Спираль-поворот-спираль*. Одна L-спираль лежит в широкой бороздке ДНК, вторая под углом поперек ДНК.

4. *Спираль-петля-спираль*.

5. «*Лейциновая застезжка*» - состоит из последовательности аминокислот с остатком лейцина в каждой седьмой позиции. Мотивы двух белков взаимодействуют, образуя димер.

1.2. Энхансеры

Чтобы транскрипция какого – либо гена пошла, нужен промотор, а чтобы она происходила интенсивно, необходимы энхансеры.

В 1981 г. Дж. Банерджи, С. Раскони и С. Шеффнер обнаружили некую последовательность нуклеотидов у вируса SV40, которая в сотни раз **усиливала** транскрипцию гена β-глобина, если связывалась с ним. Авторы назвали подобные последовательности *энхансерами (усилителями)*.

Энхансеры отличаются от промоторов **в трех отношениях**:

- во-первых, **расстояние**, на которое они удалены от точки инициации транскрипции, **не является фиксированным**;

- во-вторых, это расстояние **очень большое**;

- в-третьих, многие энхансеры могут располагаться не только в **5'-**, но и в **3'-области**, и в **середине гена**.

С энхансерами специфически связываются регуляторные белки (**специфические факторы транскрипции**), активирующие процесс транскрипции.

Как эти белки могут действовать на больших расстояниях?

Согласно самой простой модели, ДНК между энхансером и промотором образует **петлю**, в результате чего белки, связанные с энхансером, непосредственно взаимодействуют с одним из общих факторов транскрипции или с молекулой самой РНК-полимеразы.

Разнообразие **общих факторов** транскрипции невелико, но каждый из них представлен в клетке большим количеством **копий**, поскольку связывается с промоторами всех генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II. Кроме этого в клетке существуют **тысячи** различных **специфических факторов транскрипции**, связывающихся с регуляторными участками ДНК. Их наборы различаются в разных клетках и у разных генов. Каждый из этих белков представлен **малым числом** молекул и распознает свою особую последовательность нуклеотидов в регуляторных участках. С помощью этих белков-

регуляторов каждый ген специфически включается или выключается, т. е. для генов, характерных для каждого органа или ткани, есть свой белок-регулятор и свой энхансер.

У *дрожжей* имеются последовательности, по своему действию похожие на энхансеры, которые называются **UAS** (*upstream activating sequences*). Как и энхансеры, они могут функционировать в любой ориентации и на различных расстояниях от промотора. Однако, в отличие от энхансеров, **UAS не могут работать, когда локализованы ниже промотора. UAS-последовательности активизируются, когда с ними связываются белки GAL4.**

Недавно был разработан метод *направленной экспрессии генов* у дрозофилы с использованием энхансеров. Суть его заключается в том, что исследователи создают две трансформированные линии мух. Для создания *первой линии в Р-элемент* наряду с обычными маркерами вводится ген, кодирующий **белок GAL4.**

Такой транспозон встраивается в случайные районы хромосом дрозофилы, в том числе может попасть под какой-нибудь энхансер, например, под энхансер гена, работающего в клетках формирующегося крыла или ноги. Поэтому **GAL4** будет экспрессироваться в клетках крыла или ноги, однако никаких последствий для этих клеток не будет, поскольку белок **GAL4** может активировать транскрипцию другого гена лишь в том случае, если он свяжется с промотором **UAS**, который в норме присутствует *только в геноме дрожжей.*

Поэтому создают *вторую линию* дрозофилы, которую трансформируют транспозоном, содержащим *испытуемый ген X, сшитый с промотором UAS.* Когда в результате *скрещивания* двух линий оба транспозона объединяются в геноме потомка, ген **GAL4** начинает функционировать в тех клетках, в которых активен его энхансер. Белок **GAL4** связывается с промотором **UAS**, который и «*включает*» *ген X.* При этом индукция *X* будет наблюдаться совсем не в той ткани, в которой он активизируется своим собственным энхансером, а в той, где функционирует энхансер гена **GAL4.** Такая экспрессия называется *эктопической*, т. е. «не на своем месте».

Интересный пример использования этого методического подхода связан с работами **Вальтера Геринга** (р. 1939) по изучению *генетики развития глаз* у дрозофилы и некоторых других животных. Мутации некоторых генов, например *eyeless* у дрозофилы, приводят к полному отсутствию глаз. В результате сопоставления молекулярной организации генов *Aniridia* у человека, *Small eye* у мыши и *eyeless* у дрозофилы было найдено значительное их сходство. Это тем более удивительно, что анатомически глаза у мухи и млекопитающих очень мало напоминают друг друга.

В 1995-1996 гг. **В. Геринг** с сотрудниками получили гетерозиготных мух при скрещивании двух линий с мутацией *eyeless*, содержащих транспозоны с GAL4 и UAS. **GAL4** находился под контролем *энхансера*, функционирующего в клетках развивающихся ног, крыльев и органов головного комплекса. В транспозон, содержащий **UAS**, на место *гена X* была встроена ДНК *нормального аллеля* гена *eyeless*. В результате функционирования гена *eyeless* появились, во-первых, *нормальные глаза*, а также *маленькие глаза* в разных участках крыльев, ног, на голове — там, где был активен энхансер.

Затем был поставлен еще более смелый эксперимент: на место *гена X* в транспозон с **UAS** встроили ДНК *гена Small eye*, выделенную из генома *мышь*. И опять начали формироваться сложные глаза, характерные для дрозофилы, в разных участках тела мухи. Как же могло получиться, что действие гена, контролирующего развитие глаза у *мышь*, привело к развитию глаза совершенно другого типа у *дрозофилы*?

Оказалось, что в процессах формирования глаз у животных принимает участие около **2,5 тыс. генов**, которые организованы в *каскад*. При этом все три рассмотренных выше гена - *Small eye*, *Aniridia* и *eyeless* – кодируют лишь факторы транскрипции; они находятся *в начале каскада*, т. е. *только дают команду* на начало развития глаза, а остальные гены, функционирующие после них, уже определяют, какой глаз будет сформирован.

1.3 Инсуляторы

Теоретически можно предположить, что любой конкретный промотор может находиться под контролем неограниченного числа энхансеров, разбросанных по всему геному. Однако этого не происходит, поскольку в геноме существуют особые структуры, называемые *инсуляторами* (от англ. *insulate* — изолировать, отделять от окружения). *Инсуляторы* – участки ДНК, которые *разграничивают* соседние гены, блокируют взаимодействия между энхансерами и чужими промоторами. Инсуляторы замыкают ген с двух сторон.

С инсуляторами связываются специфические *белки*, которые и являются, вероятно, *структурным препятствием* для взаимодействия "чужих" энхансеров со "своим" промотором.

2. Структурная часть гена

2.1 Интроны и экзоны

При изучении первичной структуры, т. е. последовательности нуклеотидов ряда генов выяснилось, что в них, наряду с участками, кодирующими специфичный для этого гена продукт (полипептид, рРНК, тРНК и т. д.),

имеются *участки, которые ничего не кодируют*, т. е. они не содержат генетической информации.

Ричард Робертс и **Филипп Шарп** обнаружили такие расщепленные гены у аденовируса 2 в 1977 г. В 1993 г. эти ученые получили Нобелевскую премию за открытие *расщепленных генов*.

Некодирующие участки получили название *интронов*, кодирующие — экзонов. Такой тип организации характерен для большинства генов в хромосомах эукариот, для некоторых генов пластид и митохондрий, а также для генов нескольких вирусов, поражающих эукариот. У бактерий и бактериофагов расщепленных генов нет.

Некоторые гены содержат только один-два интрона, но часто их значительно больше. Так, например, в гене овальбумина курицы 7 интронов, а один из генов коллагена курицы имеет даже 51 интрон.

У эукариот в среднем *один ген* содержит *3,7 интрона на 1 тпн* кодирующего участка ДНК.

Экзоны имеют, как правило, небольшую длину.

Длина интрона может быть разной — от нескольких десятков пар нуклеотидов до многих тысяч. *Общая длина всех интронов* значительно *превышает* суммарную длину экзонов.

По данным проекта «Геном человека», только 1 % ДНК генома приходится на экзоны и 24 % — на интроны, при этом размер гена (экзоны + интроны) составляет около 28 тпн; 75% составляют межгенные промежутки.

Интроны транскрибируются наравне с экзонами, так что *про-мРНК* содержит участки, транскрибированные как с экзонов, так и с интронов. В дальнейшем в ходе *процессинга*, происходящего в ядре, участки *про-мРНК*, соответствующие интронам, вырезаются, а бывшие разобщенными участки, считанные с экзонов, *«сращиваются»*, и зрелая мРНК содержит только транскрипты экзонов. Эти прежде разобщенные участки соединяются в нужном порядке. Воссоединение участков, транскрибированных с экзонов при образовании зрелой мРНК, называют *сплайсингом* (от англ. *splicing* — сращивание морских канатов).

Последовательности нуклеотидов в экзонах *консервативны*, а в интронах сильно *варьируют*. *Интроны эволюционируют значительно быстрее, чем экзоны*. При сравнении последовательностей нуклеотидов в одних и тех же генах у *разных видов* находят большую *гомологию в экзонах*.

В *интронах* некоторых генов располагаются *другие гены*. По результатам проекта "Геном дрозофилы", 8% генов у этого вида локализованы в интронах других генов.

2.2. Сплайсинг и альтернативный сплайсинг

Какова последовательность событий при *сплайсинге* экзонов и вырезании интрона между ними? Первым шагом является *расщепление* в 5'-положении интрона, что приводит к отделению экзона 1 от молекулы РНК, содержащей интрон и экзон 2. *5'-конец интрона* образует *петлю* и соединяется с нуклеотидом **A**, входящим в последовательность, называемую *участком разветвления* (*branchpoint sequence*) и расположенную выше 3'-конца интрона. Интрон удаляется в форме *лассо*.

В клетках млекопитающих участок разветвления содержит консервативную последовательность (консенсус) *YNCURAY*, где *Y* — пиримидин, *R* — пурин, а *N* — любое основание. Ключевой *A*-нуклеотид в этой последовательности расположен в положении 18-28 пн выше 3'-конца интрона.

Сплайсинг происходит в особых структурах, называемых *сплайсеосомами* и состоящих из пре-мРНК, связанной с частицами *малых ядерных рибонуклеопротеинов* (*snRNP*, иногда ученые называют их *snurps*).

Альтернативный сплайсинг – это процесс, когда с одного гена считывается *более одного типа мРНК*, за счет считывания *с разных экзонов*, а также за счет использования альтернативных промоторов или альтернативных терминаторов.

Использование *альтернативных промоторов* может изменять *5'-конец*, использование *альтернативных терминаторов* — *3'-конец* транскрипта. Эти изменения могут возникать только за счет иницирующих или терминальных последовательностей мРНК. Но главный механизм – альтернативный сплайсинг

3. Терминаторы транскрипции

У прокариот за терминацию транскрипции отвечают участки ДНК, называемые *терминаторами*.

В процессе терминации некоторых генов у бактерий участвует белок *ρ*. Терминаторы в таких генах называются *ρ-зависимыми* (или терминаторы II типа).

Во многих других терминаторах РНК-полимераза *сама по себе* может осуществлять терминацию. Терминаторы такого типа называются *ρ-независимыми* (I типа). *ρ-независимые* терминаторы состоят из последовательностей, расположенных за *16-20 п.н.* от точки терминации и представляющих собой *палиндром* (*инвертированный повтор*). Эта последовательность замыкается хвостом из *4-8 A(T)*-нуклеотидов, на которой синтезируется *полиU*-последовательность.

p-зависимые терминаторы не имеют A(T)-хвоста и не приводят к образованию шпильки в молекуле иРНК.

Три ключевых события происходят на терминаторах обоих типов:

- 1) останавливается синтез РНК;
- 2) цепь РНК освобождается от ДНК;
- 3) РНК-полимераза освобождается от ДНК.

4. Псевдогены

Иногда в геномах встречаются так называемые *псевдогены*. Они имеют все необходимые черты генов, т. е. полный набор экзонов, характерных для каких-то генов, полиA(T)-хвосты и короткие прямые повторы длиной 10-20 пн (как у мобильных элементов), однако остаются *функционально неактивными*. Существуют **2 типа** псевдогенов:

1. **Традиционные** псевдогены (семейство генов глобинов). Они возникают за счет дупликаций определенных генов, которые затем выключаются в результате делеций и точковых мутаций.

2. **Процессированные** псевдогены. У них нет интронов, но есть остатки полиA(T)-хвоста; по флангам чаще всего находят прямые повторы. Такие псевдогены часто встречаются у млекопитающих и редко — у дрожжей.

В геноме человека не менее 3 тыс. последовательностей являются псевдогенами.

5. Кластерная организация генов в хромосомах эукариот

У эукариот нет оперонов. Гены, контролирующие даже последовательные биохимические реакции, могут быть расположены в *разных* районах хромосомы и даже в *разных хромосомах*. Например, у дрозофилы многие гены, кодирующие ферменты, под контролем которых происходит превращение триптофана в бурый глазной пигмент, разбросаны во множестве участков генома.

Вместе с тем известны примеры **кластерной организации** генов. У человека существует несколько типов **гемоглобинов**. Каждый из них синтезируется на определенной стадии развития. Например, гемоглобины ζ и ϵ вырабатываются в клетках **эмбрионального желточного мешка**. В это время молекула белка состоит из двух цепей **α -подобного** ζ -гемоглобина и двух цепей **ϵ (β -подобный)**.

К концу третьего месяца развития синтез гемоглобина этого типа заканчивается и начинается синтез **фетального** (утробного) гемоглобина в

клетках *печени* и *селезенки*. Фетальный гемоглобин состоит из двух α -*полипептидов* и двух γ (β -подобных): двух γ A или двух γ G.

Во время *постэмбрионального развития* гемоглобин синтезируется в клетках *костного мозга* и состоит из α - и β -полипептидов и некоторого количества β -подобного δ -полипептида. Большая часть гемоглобина в крови взрослого человека представляет собой *тетрамер $\alpha_2\beta_2$ (Hb-A)*.

В геноме человека гены гемоглобина расположены *двумя кластерами*: все α -подобные гены собраны в хромосоме **16**, в то время как все β -подобные гены — в хромосоме **11**. В каждом кластере есть *псевдогены*.

Интересно, что данные гены вдоль по хромосоме *расположены в том порядке*, в каком они *включаются в работу в ходе онтогенеза*, но функционально (по типу оперона) они *никак не связаны*.

Организация генов **18S** и **28S** рРНК у всех эукариот в общих чертах одинаковая. Гены **18S** и **28S** рРНК, *лидерная* последовательность, а также транскрибируемый и нетранскрибируемый *спейсеры* составляют *единицу* длиной около **11 тпн**, которая *повторена* несколько сот раз.

Как правило, число копий варьирует в пределах от 100 до 1000: у дрожжей — 140 повторов, у дрозофилы — 200-250, у человека — 1250.

Участок ДНК между генами 18S и 28S транскрибируется вместе с этими генами и называется транскрибируемым спейсером. В нем расположены короткие последовательности, которые выделяются из общего транскрипта в ходе процессинга РНК. У млекопитающих и амфибий в коротком спейсере формируется 5,8S РНК — небольшая молекула, образующая водородную связь с 28S рРНК в рибосоме.

Еще один пример – кластер *густоновых* генов у дрозофилы. Его длина составляет примерно 500 тпн (100 повторов *единицы* около 5 тпн с пятью генами в каждой). Отдельные гены в пределах повторенной единицы транскрибируются в противоположных направлениях (т. е. с *разных цепей ДНК*).

У другого вида насекомых — *хирономуса* (*Chironomus thummi*) эти же пять *густоновых* генов также составляют кластер. И у этого вида гены, расположенные в кластере, могут считываться с разных цепей.

Гены, контролирующие развитие крупных частей тела (*гомеозисные* гены) дрозофилы, собраны в кластеры. Их называют *комплексами*. Головная капсула дрозофилы формируется в результате активности генов комплекса *Antennapedia* (*Antp-C*), брюшная часть — генами комплекса *Bithorax* (*BX-C*).

Лекция № 13

Тема лекции: Организация генома. Геномика

План лекции:

1. Геномика
2. Уникальные и повторяющиеся последовательности в геноме эукариот
3. Мобильные элементы генома
 - 3.1. Открытие и классификация мобильных элементов
 - 3.2. Мобильные элементы дрозофилы
 - 3.3. Ту-элементы дрожжей
 - 3.4. Транспозоны млекопитающих
 - 3.5. Значение мобильных элементов

1. Геномика

Вспомним классическое определение: «**Геном** – это совокупность **генов гаплоидного набора** хромосом данного организма или биологического вида». Сейчас это понятие трактуют шире: **геном** – это **вся ДНК** (ядра, митохондрий, плазмид, хлоропластов), содержащаяся в клетке данного организма или вида. Для РНК-содержащих вирусов – геном это **вся его РНК**.

Геномика - это новый раздел генетики, посвященный изучению на молекулярном уровне строения и функционирования геномов живых организмов. Выделяют структурную и функциональную геномику, а также медицинскую геномику.

С начала 90-х годов разрабатываются многочисленные так называемые геномные проекты. Цель их заключается в выяснении последовательностей оснований во всех молекулах ДНК в клетках того или иного организма.

Для выполнения работ по геномным проектам используют современные методы геномной инженерии, компьютерные технологии обработки данных и базы данных.

Первой крупной удачей геномных проектов было секвенирование генома бактерии *Haemophilus influenzae* в 1995 г. В 1996 г. был секвенирован геном *Saccharomyces cerevisiae*. Геном человека был секвенирован в 2003 г.

К настоящему времени составлены карты геномов около 1000 видов как одноклеточных, так и многоклеточных организмов (мыши, дрозофилы, комара, нематоды и др.).

Расшифровка геномов требует огромных финансовых затрат и скоординированных усилий большого числа ученых из многих стран мира. Например, для того, чтобы расшифровать последовательность нуклеотидов в геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, потребовались усилия более чем 600 ученых из 96 лабораторий мира.

Россия сегодня в этих работах фактически не участвует.

Протеом – полный набор белков, которые могут быть синтезированы и модифицированы в течение всей жизни клетки. **Протеомика** – наука, изучающая протеомы. Цель протеомики – определить для каждого белка, кодируемого генами, его функцию, структуру, особенности посттрансляционной модификации, клеточную модификацию, взаимодействие с другими белками. Пример: у человека ≈ 30 тыс. генов и \approx полмиллиона белков.

2. Уникальные и повторяющиеся последовательности в геноме эукариот

Главной особенностью генетического материала *эукариот* в сравнении с прокариотами является наличие **избыточной** ДНК.

87,8 % генома *E.coli* занимают белок – кодирующие гены, или цистроны, 0,8 % — гены, кодирующие различные виды РНК (тРНК, рРНК и др.). Таким образом, геном *E. coli* на 88,6 % занят генами, а **межгенные участки** составляют относительно малую долю (**около 11%**). Однако и межгенные интервалы очень часто содержат различные функциональные сайты, т. е. выполняют регуляторные функции.

Иная картина наблюдается у эукариотических организмов. Например, у человека только **1 %** генома приходится на кодирующие **экзоны**, **24 %** на некодирующие **интроны** и **75 %** на **межгенные промежутки**. Другими словами, у человека только 1 % ДНК генома кодирует информацию о синтезе белков.

Существуют виды, геном которых в десятки раз больше генома человека, например некоторые рыбы, хвостатые амфибии, лилейные растения. Избыточная ДНК характерна для всех эукариот.

Различают следующие **фракции** в геноме эукариот:

1. **Уникальные** последовательности, т. е. представленные в одном экземпляре. Обычно это – гены.

2. **Среднечастотные повторы**. Это последовательности, повторяющиеся десятки и сотни раз.

3. **Высокочастотные повторы**, число которых в геноме достигает 10^6 копий. Они образуют **семейства** - совокупность последовательностей, полностью или частично гомологичных друг другу.

Эта фракция генома (*сателлитная ДНК* в градиенте CsCl) представлена небольшим (10—15) числом семейств *коротких* (5-12 пн) *повторов*, образующих *протяженные блоки*. У большинства видов эта фракция занимает не более 10% генома.

Остальные 90 % генома эукариот построены по принципу *чередования (интерсперсии)* уникальных и повторяющихся последовательностей. Условно выделяют *два основных типа* интерсперсии, получивших названия по тем видам, у которых они впервые были описаны: интерсперсия *типа «ксенопус»* (обнаружена у *Xenopus laevis*) и *типа «дрозофила»* (впервые описана у *D. melanogaster*).

Примерно в 50 % генома *Xenopus laevis* *уникальные* последовательности из **1500 пн** чередуются с *повторяющимися*, средний размер которых **300 пн**. В остальной части геномов типа «ксенопус» расстояния между соседними повторами значительно превышают 1-2 тпн.

Структура генома типа «ксенопус» широко распространена, особенно среди животных. *Млекопитающие и человек* также относятся к этому типу организации генома.

Дрозофила по параметрам интерсперсии резко отличается от видов, имеющих геном типа «ксенопус». *Повторяющиеся* последовательности длиной **5600 пн** чередуются с *уникальными*, длина которых не менее **13 000 пн**.

Интересно отметить, что у *Musca domestica* — вида, близкого *D. melanogaster*, геном устроен по типу «ксенопус». Этот факт прямо указывает на то, что в ходе эволюции возможны очень быстрые преобразования характера чередования последовательностей.

Птицы по параметрам интерсперсии занимают *промежуточное* положение между типом «ксенопус» и типом «дрозофила». Многие виды не могут быть отнесены ни к тому, ни к другому типу.

3. Мобильные элементы генома

3.1 Открытие и классификация мобильных элементов

В начале 40-х гг. американская исследовательница **Барбара Мак - Клинтон** открыла существование гена, который вызывал повышение частоты хромосомных перестроек у *кукурузы*. Среди потомков от скрещивания, в котором *оба родителя* несли такие перестройки, появлялись нестабильные мутации с неожиданно высокой частотой. В 1948 г. она опубликовала результаты исследований этого локуса, вызывающего разрывы хромосом, сделав вывод, что он является совершенно необычным, поскольку может *перемещаться* из одного участка хромосомы в другой. Б. Мак – Клинтон назвала феномен пе-

ремещения *транспозицией*, а сами локусы — *контролирующими элементами* (КЭ).

Свою Нобелевскую премию за открытие мобильных элементов Б. Мак – Клинтон получила в 1983 г., в возрасте 81 года.

Эти элементы характеризуются следующими *свойствами*:

- 1) они могут *перемещаться* из одного сайта в другой;
- 2) их встраивание в данный район влияет на *активность* генов, расположенных рядом;
- 3) утрата КЭ в данном локусе превращает прежде мутабельный локус в стабильный;
- 4) в сайтах, в которых присутствуют КЭ, могут возникать делеции, транслокации, инверсии, а также разрывы хромосом.

Геном кукурузы содержит несколько семейств КЭ. Члены каждого семейства могут быть подразделены на *два класса*:

1. *Автономные* элементы, которые способны перемещаться и вырезаться. Их внедрение ведет к появлению нестабильных аллелей.

2. *Неавтономные* элементы, которые могут быть активированы к транспозиции только определенными автономными элементами (членами того же семейства).

При встраивании автономного элемента в ген последний мутирует, однако мутация эта будет *нестабильной*, так как элемент может выйти из данного гена и переместиться в другой участок генома.

Система **Ac-Ds** у кукурузы была изучена в деталях. *Автономный Ac-элемент* имеет *инвертированные повторы* (IR) на концах. Он содержит единственную единицу транскрипции (5 экзонов и 6 интронов), кодирующую фермент *транспозазу*. *Неавтономные элементы Ds* возникают в результате делеции внутренних участков *Ac-элемента*.

Если растение имеет аллель гена **C** дикого типа, зерно будет иметь *пурпурную окраску*, если **Ac-элемент** индуцировал инсерцию **Ds** в ген **C**, возникает мутантный аллель **c**, и зерно будет *бесцветным*. В ходе развития **Ds-элемента** может *в некоторых клетках* выйти из гена **C**, в результате чего зерна вновь приобретут пурпурную окраску. Таким образом возникает *мозаичность*.

К настоящему времени мобильные элементы открыты у множества видов растений, животных и микроорганизмов.

По механизмам транспозиции *мобильные элементы* делятся на *две основные группы*. Элементы *первого класса* (ретровирусы и ретротранспозоны) перемещаются, используя *обратную транскриптазу*, т. е. на РНК-матрице мобильного элемента синтезируется ДНК. **Обратная транскриптаза**

(ревертаза в русскоязычной литературе) не только ведет синтез нити ДНК на РНК, но и осуществляет синтез второй комплементарной нити ДНК, а РНК-матрица распадается и удаляется. Двунитевая ДНК синтезируется в цитоплазме, а затем перемещается в ядро и может встроиться в геном, образуя **провирус**. Ретротранспозоны составляют как минимум 2 % генома у дрозофилы и более 40 % у некоторых растений.

Ретровирусы и ретротранспозоны, как правило, имеют на концах **прямые длинные концевые повторы LTR** (*long terminal repeats*).

Второй класс элементов объединяет представителей, которые перемещаются в геноме как чистые **ДНК-элементы** и называются **транспозонами**. В этот класс входят транспозоны бактерий (**IS-элементы**), **P** и **hobo** у дрозофилы, **Ac/Ds** у кукурузы. Все они имеют **короткие инвертированные повторы** на концах и кодируют по крайней мере один белок – **транспозазу**. Встречаются также элементы с внутренней делецией, они могут перемещаться только в присутствии полных элементов.

Мобильные элементы часто получают названия, отражающие их способность к **перемещению**: Магеллан, Бигль, **hobo** — бродяга, **gypsy** — цыган, **flea** — блоха, **burdock** — репейник, **jockey** — наездник и т. д. Они отличаются друг от друга по следующим характеристикам:

- 1) **по размерам**: средние размеры — 5 тпн;
- 2) **по числу копий**: от 1 до 120 на геном;
- 3) по наличию и размерам **концевых повторов**: они могут иметь длину 270-840 пн, быть прямыми или обратными;
- 4) **по индукции дупликаций** ДНК-хозяина в сайте встраивания – 4-8 пн.

3.2. Мобильные элементы дрозофилы

Скрещивание определенных линий дрозофилы приводит к образованию потомства с «**дисгенетическими признаками**». Это выражается в появлении у них серии генетических дефектов, таких как мутации, хромосомные aberrации, нарушение расхождения хромосом в мейозе стерильность. Комплекс этих генетических аномалий называется **гибридным дисгенезом**.

Скрещивание между самцом линии **P** (*paternal*) и самкой линии **M** (*maternal*) вызывает дисгенез, а реципрокное скрещивание — нет:



Дисгенез вызывается **фактором Р**, находящимся в хромосомах Р-линии, в линии М нет Р-фактора. Показано, что **Р-фактор активируется** под действием **М-цитоплазмы**, унаследованной по материнской линии. Материнскую М-цитоплазму называют также **М-цитотипом**.

Если хромосома, несущая Р-элементы, попадает в М-цитотип, Р-элементы начинают перемещаться. Любая хромосома Р-самца может вызвать гибридный дисгенез в скрещиваниях с М-самкой. В пределах же одной хромосомы может находиться большое число Р-факторов — от 30 до 50, и в разных линиях локализация их различна.

Р-элемент детально изучен. Он имеет длину 2907 п.н., включает 4 экзона и 3 интрона и ограничен **терминальными повторами** размером 31 п.н.. По существу, это один ген, дающий транскрипт размером 2,7 тпн, кодирующий белок с молекулярной массой 87 кДа — **транспозазу**.

В **половых** клетках все три интрона вырезаются. В **соматических** клетках синтезируется другой **белок**, размером **66 кДа** (он кодируется самостоятельным геном), связывающийся со вторым экзоном, что **препятствует транскрипции** и приводит к **репрессии перемещений транспозона**.

Эффект цитотипа при гибридном дисгенезе у дрозофилы объясняется следующим образом. **Белок 66 кДа**, который репрессирует транспозицию, в большом количестве присутствует **в яйце** самки линии Р. Его достаточно, чтобы полностью предотвратить транспозицию, хотя Р-элементы и присутствуют в хромосомах. В любом скрещивании, в котором принимает участие Р-самка, **транспозаза не синтезируется**.

В том случае, когда самка имеет **М-цитотип**, в яйце не накапливается белок-репрессор и внесение Р-элемента из генома самца **приводит к наработке транспозазы** в зиготе и в клетках зародыша.

Интересно, что линии *D. melanogaster*, выделенные из диких популяций более 30 лет назад, всегда имеют М-цитотип. В последние 10 лет почти все дикие популяции имеют Р-элементы. Полагают, что **повсеместное распространение Р-элемента** связано с его **инвазией** и что **источником его являются какие-то другие виды**.

Кроме Р-элемента у дрозофилы известно **множество** других мобильных элементов. Впервые они были выделены и охарактеризованы в лабораториях Г. П. Георгиева и В. А. Гвоздева в России, а также Дэвида Хогнесса в США в 1975-1976 гг. Около 9% генома дрозофилы приходится на мобильные элементы, которые организованы примерно в 50 семейств.

3.3. Ту-элементы дрожжей

Транспозон Ту ограничен на концах длинными концевыми повторами — **дельта (δ)**. Элементы дельта на 70 % состоят из АТ-последовательностей.

Ту-элемент имеет длину **5,9 тпн** и кодирует **единственную мРНК** длиной 5700 нуклеотидов, старт транскрипции которой находится в *промоторе элемента дельта*. Матричная РНК имеет две открытые *рамки считывания*, т. е. рамки, начинающиеся со стартового кодона и кончающиеся терминирующим кодоном. Эти две рамки называют **ТуА, ТуВ**.

Генетических маркеров у этого транспозона нет, поэтому следить за его перемещениями трудно. Ту-элемент имеет большое сходство с ретровирусами: он так же, как и они, кодирует обратную транскриптазу.

3.4. Транспозоны млекопитающих

У млекопитающих в составе генома обнаружено несколько классов умеренно повторенных последовательностей: **SINE** (*short interspersed nuclear elements*) и **LINE** (*long interspersed nuclear elements*). Элементы **SINE** — это фрагменты длиной **100—300 пн**, чередующиеся с уникальными последовательностями от 1000 до 2000 пн. Элементы **LINE** имеют длину более **5 тпн**, они чередуются с уникальными последовательностями до 35 тпн длиной.

В геноме человека элементы **SINE** широко представлены семейством повторов **Alu**. Члены этого семейства имеют длину 300 пн и повторены в геноме от 300 000 до 500 000 раз. Около **3% генома человека** приходится на долю этих повторов. Наименование **Alu** этот элемент получил, поскольку содержит сайт узнавания *рестриктазой AluI*. Каждая *Alu*-последовательность фланкирована прямыми повторами длиной от 7 до 20 пн. По этой причине полагают, что *Alu*-повторы являются мобильными элементами, скорее всего **ретротранспозонами**.

Одно из семейств элементов **LINE** — это **LINE-1** (или L1-элемент). Полагают, что в геноме человека присутствует 50-100 тыс. копий L1, т. е. он представляет около **5% генома**. Максимальная длина этих элементов составляет **6500 пн**, хотя именно таких элементов в геноме не более 3500. Остальные же копии по аналогии с Ds элементами кукурузы имеют *внутренние делеции* различной длины. Полноразмерные элементы кодируют **обратную транскриптазу**.

3.5. Значение мобильных элементов

Мобильные элементы, присутствующие в геномах, могут вызывать разнообразные генетические события.

1. *Индукция мутаций*

Около 80 % спонтанных мутаций у дрозофилы вызвано инсерциями мобильных элементов. Внедряясь в ген, мобильный элемент может **повредить экзон**. В таком случае ген будет лишен возможности кодировать белок. Попадая в район промоторов или энхансеров, мобильный элемент может **повредить регуляторную зону гена**. Наконец, инсерция в район **интрона** может оказаться **безвредной**, поскольку вся последовательность интрона вместе с мобильным элементом будет вырезана во время процессинга мРНК, а соседние экзоны беспрепятственно сплайсируются.

Разработаны способы целенаправленного получения мутаций у дрозофилы с помощью мобильных **P-элементов**. Получают **гетерозиготу по двум P-элементам**: один из них синтезирует **транспозазу**, но сам не может перемещаться (нет концевых повторов), а второй **способен перемещаться**, но не имеет своей транспозазы.

2. *Изменение активности генов*

Длинные концевые повторы (**LTR**) содержат **промоторы** ретротранспозона, причем как **LTR**, так и сам ретротранспозон содержат **энхансеры** транскрипции. Поэтому перемещение этих сигналов в геноме может изменять регуляцию активности генов. Например, если мобильный элемент оказался около **протоонкогена**, то результатом может быть сверхпродукция белка и злокачественное перерождение клетки.

Ретротранспозон как таковой может **удаляться** за счет кроссинговера между LTR с идентичными последовательностями, в результате чего **сохраняется лишь один LTR** вместе с регуляторными последовательностями на месте внедрения ретротранспозона. Это явление широко распространено в клетках дрожжей. Такие **одинокие LTR** являются частью регуляторных систем дрожжевой клетки.

3. *Формирование хромосомных перестроек*

В результате **кроссинговера** между одинаково ориентированными элементами возникает **делеция** и **дупликация** материала, расположенного между инсерциями. Если инсерции ориентированы в противоположном направлении, возникает **инверсия**.

4. **Формирование теломер**. У дрозофилы отсутствует теломеразная машина, но концы ДНК удлиняются за счет перемещений ретротранспозонов.

5. *Участие в горизонтальном переносе генов*

Инфекционные ретровирусы способны заражать организмы, принадлежащие разным видам, и переносить при этом собственный и чужеродный генетический материал.

Подобный способ передачи генов получил название *горизонтального*, в отличие от *вертикального* наследования генов – *из поколения в поколение*. Например, мобильный элемент дрозофилы – ретротранспозон *gypsy*, как выяснилось, является настоящим ретровирусом: путем инъекции или скармливания вирусных частиц удастся заразить мух, не несущих эти ретротранспозоны.

6. Использование мобильных элементов в генетических исследованиях

Транспозоны, производные *Мю* – *фага* широко применяют в генетических манипуляциях с бактериями.

Транспозоны на основе *P-элемента* используют для трансформации у эукариот, клонирования генов, поиска энхансеров и т. д.

Лекция № 14

Тема лекции: Генетика развития

План лекции:

1. Роль клеточного ядра в развитии
2. Доказательства тотипотентности генома
3. Детерминация
4. Генетика раннего эмбрионального развития дрозофилы

1. Роль клеточного ядра в развитии

Биологов всегда интересовала проблема механизмов индивидуального развития, - как из одной клетки (зиготы) возникает сложнейший организм, состоящий из многих клеток, органов и тканей? Первый вопрос, на который предстояло ответить - какие структуры клетки управляют ее развитием?

Для выяснения роли **ядра** в развитии проводили различные эксперименты. **Г. Геммерлинг** в 1943 г. провел опыты с замещением ядра у водоросли *Acetabularia*. Он использовал два вида этого рода — *A. mediterranea* и *A. crenulata*, различающиеся формой шляпки. Эта водоросль представляет собой крупную одноядерную клетку с длиной стебелька до 6 см. Различные виды ацетабулярии имеют специфическую форму шапочки.

Когда сращивали отрезанный стебелек (без шапочки) одного вида с ризоидом другого, регенерирующая на стебельке шапочка имела форму, свойственную виду, которому принадлежало **ядро**. Такой же результат был получен в том случае, когда извлеченное из ризоида ядро одного вида пересаживали в изолированный стебелек другого вида.

Б. Л. Астауров заметил, что ядро и цитоплазма резко различаются по чувствительности к ионизирующим излучениям. В норме у бабочки шелкопряда в яйцо при оплодотворении проникает несколько спермиев, но с ядром яйца сливается ядро только одного из них, остальные спермин остаются на его периферии и затем распадаются, не участвуя в образовании и развитии зародыша. Подвергая неоплодотворенные яйца рентгеновскому облучению, можно полностью *разрушить их ядра*, не повредив цитоплазму, которая гораздо менее чувствительна к этим воздействиям.

Если затем такие яйца осеменить, то ядра двух спермиев сливаются друг с другом и образуют зиготу. Эта зигота имеет ядро, происходящее исключительно от отца, цитоплазма же целиком материнская. Развивающиеся из таких **андрогенетических** зигот особи шелкопряда всегда были самцами и имели фенотип своих отцов.

2. Доказательства тотипотентности генома

Как, с точки зрения генетика, развивается организм многоклеточного животного? Мы знаем, что существует много специализированных тканей. Возникает вопрос, сохраняются ли в ядре клеток кишечника гены, необходимые, например, для синтеза гемоглобина — белка, характерного для эритроцитов, а в ядре нервной клетки — гены, необходимые для синтеза трипсина?

Если «ненужные» гены *утрачиваются*, то именно эта постоянная утрата различных генов и определяет специализацию клеток, как предположил **А. Вейсман** еще в 1892 г. Противоположная точка зрения сводится к тому, что во всех клетках сохраняются все гены, однако в тех клетках, где их деятельность не нужна, они находятся в *неактивном состоянии*.

Для того чтобы решить, какая из этих гипотез верна, использовали метод *трансплантации ядер*. Впервые в мире в 1941 г. советский эмбриолог **Георгий Викторович Лопашев** разработал метод пересадки ядер в яйцеклетку тритона.

Джон Гёрдон в 1962 г. трансплантировал ядра из специализированных клеток эпителия кишечника головастиков южноафриканской *шпорцевой лягушки* *Xenopus laevis* в неоплодотворенное яйцо этого же вида, из которого предварительно было удалено свое ядро. При этом необходимо было использовать какой-либо ядерный маркер, который позволяет отличить потомков пересаженного ядра от потомков ядра-хозяина, поскольку нельзя быть уверенным, что не произошла случайная ошибка при удалении ядра-хозяина. Маркером в данном случае служило наличие *двух ядрышек* в ядрах клетки-хозяина и *одного* — в пересаживаемых ядрах.

Клетки кишечного эпителия выбрали потому, что они крупные, имеют яркий признак дифференцированности — *кишечные ворсинки*.

В этих экспериментах лишь из 1% яиц, в которые были пересажены ядра эпителия, выросли взрослые лягушки. Таким образом была доказана *тотипотентность* генома любой, даже дифференцированной клетки (т. е. *широкая потенция к развитию*).

В 1997 г. группа ученых из Шотландии под руководством **Вилмута** провели успешную трансплантацию ядер из дифференцированных клеток в яйцеклетку овец и получили знаменитую *овечку Долли*.

Схема опыта была подобна той, которую использовали Дж. Гёрдон и его сотрудники. Маркерами в данном случае служила масть овец. Ооциты выделяли из овец шотландской *черномордой породы*, а донорные клетки были выделены *из вымени* овец *беломордой породы*. После этого с помощью электрического импульса сливали энуклеированный ооцит с целой клеткой-донором. Полученные зиготы помещали в яйцеводы самок, где они начинали

дробиться и развивались в морулы, которые и были пересажены в матки черномордых овец. Из 277 экспериментально полученных зигот только одна прошла все стадии развития вплоть до рождения ягненка, который был *беломордым*.

Позднее овечке Долли был поставлен диагноз – *синдром преждевременного старения*. Это свидетельствует о том, что генетический материал из клетки взрослого организма необратимо запрограммирован на сокращенную продолжительность жизни (ограниченное число клеточных делений).

Существуют планы выращивания клонированных животных, которые могли бы быть источником *органов для пересадки* больным людям. Здесь наиболее привлекательным объектом являются *свиньи*. Планируется в ядре культивируемой клетки свиньи вначале инактивировать гены, ответственные за синтез в клетках полисахаридов, которые организмом человека опознаются в качестве чужих и вызывают иммунный ответ.

В исследованиях *растений* проблема тотипотентности не возникала, так как всем известно, что кусочки листа (т. е. соматические клетки) бегонии дают новые растения с цветами и семенами, точно так же корневые побеги малины ежегодно дают начало новым растениям, а картофель размножается клубнями. Целые растения вырастают и из отдельных клеток, входящих в состав *каллуса*.

3. Детерминация

Детерминация – возникновение *качественных различий* между частями развивающегося организма, которые предопределяют дальнейшую программу развития. Детерминация предшествует дифференцировке и морфогенезу.

Дифференцировка – процесс, в результате которого клетка становится *специализированной*, т.е. приобретает биохимические, морфологические и функциональные особенности (это происходит на протяжении нескольких циклов деления). Необратимый процесс.

Морфогенез – процесс возникновения *новых структур* и изменения их формы в ходе индивидуального развития. Необратимый процесс. На надклеточном уровне начинается с гастрюляции.

Другими словами, *детерминация* – это установление *на генетическом уровне* определенной *стратегии развития* какой-то части эмбриона.

Большой вклад в изучение детерминации внес швейцарский генетик **Эрнст Хадорн**. Известно, что в развитии высших насекомых, в том числе дрозофилы, происходит интересное разделение клеток по их функциям. Клетки *одного типа* начинают дифференцироваться с первых этапов эмбри-

онального развития, из них образуется тело **личинки** насекомого со всеми его органами. Клетки **другого типа** обособлены, они составляют так называемые **имагинальные диски**, или зачатки взрослых органов. Хотя клетки имагинальных дисков находятся в контакте с соседними дифференцирующимися клетками, они пребывают *в эмбриональном состоянии в течение всего личиночного периода*. В это время они делятся.

В процессе **метаморфоза** значительная часть личиночных органов рассасывается (лизирована). Одновременно с этим клетки имагинальных дисков утрачивают свое эмбриональное состояние, они **дифференцируются**, превращаясь в специализированные ткани имаго (взрослой мухи). Из каждого диска образуется **отдельная часть тела** насекомого. Например, для каждой из шести будущих ног существует отдельный диск, голова образуется из трех пар дисков.

Имагинальные диски можно извлечь из тела личинки и пересадить в полость тела другой личинки. Когда личинка-хозяин превращается **в куколку**, трансплантат дифференцируется в соответствующий орган. Например, если трансплантирован *глазной* имагинальный диск, в брюшке куколки и мухи развивается полностью сформировавшийся *глаз*.

Неожиданные результаты были получены после трансплантации имагинальных дисков **сразу во взрослых мух**. Клетки неограниченно делились и разрастались.

Если бы развитие этих имагинальных дисков происходило **в личинке**, то эти клетки прекратили бы деление с началом метаморфоза: под влиянием гормона насекомых **экдизона** они бы начали дифференцироваться в куколке в различные структуры взрослых особей, но в данном случае этого не произошло.

Неограниченный рост этих клеток, пересаженных в брюшко взрослых мух, продолжался **более 6 лет**. Поскольку дрозофила живет около месяца, размножающиеся клетки пересаживали в новую муху через каждые 2 недели. При этом клетки перенесли свыше **160 пересадок**. Хотя трансплантанты жили во взрослых мухах годами, они сохранили свой исходный **эмбриональный характер** и не дифференцировались. Если же извлечь немного трансплантата и ввести в личинку, эти клетки претерпевали метаморфоз и нормально дифференцировались в структуры взрослого организма. При этом если несколько лет назад для трансплантации были взяты имагинальные диски *крыла*, то при обратной трансплантации также формировалось *крыло*. Таким образом, **состояние детерминации может воспроизводиться длительное время без каких-либо изменений**.

Очень редко из клеток *генитального* имагинального диска после длительного размножения в брюшке имаго формировались органы *головы или конечности*, т. е. клетки больше не дифференцировались в соответствии с детерминацией их предков — происходила **трансдетерминация**.

Явление трансдетерминации свидетельствует о том, что **детерминация не сопровождается необратимыми изменениями генов, тем более их потерей**.

Каковы же генетические механизмы детерминации?

4. Генетика раннего эмбрионального развития дрозофилы

Еще в 1950-х гг. предположили, что клетки вырабатывают некие вещества – **морфогены**, которые индуцируют образование определенных частей тела. Предполагали, что эти вещества диффундируют через ткань и их распределение диктует тот или иной путь развития клетки.

По современным представлениям, **морфоген** – это белок (или его информационная РНК), который выделяется в определенном месте организма клеткой или группой клеток, и во время последующей диффузии в ткани образуется *градиент его концентрации*. В каждой клетке или ткани существует свой набор и концентрация морфогенов, т. е. своя информация о последующем развитии.

Лучше всего изучены градиенты морфогенов в развивающемся яйце дрозофилы. Известно, что у дрозофил яйцо созревает в особой камере — **фолликуле**. Эта камера содержит **ооцит** — созревающее яйцо и **15 огромных питающих клеток**, которые синтезируют продукцию и перекачивают ее в ооцит. В них активны **гены с материнским эффектом**, т. е. такие гены, которые функционируют в организме матери еще до оплодотворения яйца сперматозоидом, и их продукты поступают в ооцит. Один из таких генов — ***bicoid (bcd)***. Весь продукт этого гена (и-РНК и белок) синтезируется только у матери и откладывается в яйце.

Этот и ему подобные белки (и-РНК) транспортируются в яйцо из питающих клеток, распределяются по оси яйца, образуя градиенты, характерные для продуктов каждого гена. Продукт гена ***bcd*** в пределах яйца занимает строго определенный участок.

При созревании яйца в организме матери формируются **четыре независимых градиента**:

- 1) передне-задний градиент белков (РНК) гена ***bcd***;
- 2) градиент белка ***nanos***, расположенного в задней части яйца и необходимого для развития **брюшка мухи**;

3) градиент белка *torso*, расположенного на обоих полюсах яйца и необходимого для определения *головной и хвостовой частей тела*;

4) градиент белков дорзо-вентральной системы.

После того как градиенты в яйце созданы, происходит оплодотворение и начинается дробление зародыша, в результате чего образуется *бластула* (однослойная бластодерма). Каждая клетка в ней занимает определенное положение по отношению к градиентам морфогенов. Морфогены начинают взаимодействовать с *регуляторными участками генов* клеток бластулы.

Понятно, что клетка, находящаяся в области локализации морфогена *bcd*, будет испытывать его влияние, и развитие пойдет в определенном направлении. Если же клетка расположена в задней части эмбриона, где этого морфогена нет, но есть другой, она будет развиваться иначе. Таким образом, *набор определенных белков*, накопленных цитоплазмой к данной стадии развития, *активирует* определенный *набор генов*, благодаря чему развитие идет дальше.

Каким образом белковый продукт одного гена может взаимодействовать с другим геном? Как известно, регуляторные части генов содержат специфические группы нуклеотидов (*мотивы*), имеющие сродство к определенным сочетаниям аминокислот (*доменам*) в молекулах белков. Посадка белков на соответствующие мотивы в регуляторных областях генов приводит к транскрипции структурной части гена (если белок является активатором) или блокированию транскрипции (если белок является репрессором).

После образования бластодермы и включения генов ее клеток начинается формирование *сегментального плана строения тела*. Дело в том, что тело взрослой мухи (имаго) состоит из ясно выраженных *сегментов*. В бластодерме сегменты еще четко не выражены и носят название *парасегментов*, которые и дают начало сегментам взрослой мухи.

Сегментный тип организации свойствен не только двукрылым насекомым, но и многим другим животным. Даже у *человека* на некоторых этапах развития выявляются *сомиты* — первичные сегменты тела, на которые разделяется в ходе зародышевого развития *мезодерма*.

Сегменты у дрозофилы формируются в результате действия *25 генов сегментации*. В результате мутаций этих генов изменяется число и расположение сегментов.

После того как завершена сегментация, вступают в действие *гомеозисные* гены — большой класс генов, которые контролируют развитие какой-то части тела из определенного сегмента. Если произойдет гомеозисная мутация, из данного сегмента развивается какая-то другая часть тела. Среди го-

меозисных генов наиболее известны *bithorax-complex* (**BX-C**) и *Antennapedia-complex* (**Ant-C**).

Термин «*гомейозис*» предложил в 1894 г. У. Бэтсон еще до переоткрытия законов Г. Менделя. Он назвал этим словом такое *изменение признаков*, в результате которого «*нечто изменяется в похожесть на что-то другое*». У особи вместо одних частей тела появляются другие, которые в норме должны быть расположены в другом сегменте тела. Первую гомеозисную мутацию — *bithorax* у дрозофилы открыл К. Бриджес в 1915 г. В 1926 г. Е. И. Балкашина открыла вторую мутацию — *Aristapedia*, и еще через 5 лет вновь К. Бриджес открыл *proboscipedia*.

У дрозофилы личинки и имаго имеют ярко выраженные *сегменты*: один головной, три грудных и восемь брюшных. Каждый сегмент имаго содержит уникальный набор дифференцированных структур. Например, *мезоторакальный* сегмент несет пару крыльев и пару ног, *метаторакальный* — пару ног и пару *гальтеров* — особых булавовидных образований, помогающих удерживать равновесие в полете. Характерный набор можно найти и на сегментах личинки.

Американский ученый Эдвард Льюис показал, что мухи эволюционировали из насекомых, имевших *четыре крыла*, а все насекомые, в свою очередь, произошли от членистоногих, имевших *множество ног*. В ходе эволюции у мух должны были сформироваться гены, *подавляющие развитие ног* на брюшных сегментах многоножкаподобных предков, а также подавляющие развитие *второй пары крыльев*. Должна была также появиться группа генов, отвечающих за формирование *новых структур*: гальтеров и брюшных сегментов.

Одним из таких генов оказался **BX-C**. В ходе своих экспериментов Э. Льюис полностью *удалил* ген **BX-C** с помощью небольшой делеции. Без этого гена эмбрион развивается до определенной стадии и затем гибнет.

Погибший эмбрион можно было рассмотреть. Результаты оказались поразительными: у него был один проторакальный сегмент, а *все остальные* — *мезоторакальные*. Если бы этот организм остался жить и вырос во взрослую муху, то она бы имела *10 пар крыльев* и *10 пар ног*. Э. Льюис сделал вывод о том, что функция комплекса генов **BX-C** заключается в *инактивации генов*, формирующих ноги и крылья, и в *развитии новых структур* на брюшных сегментах.

В молекулярно-генетических экспериментах выяснили, что все три гена комплекса **BX-C**, а также ген *Antp* имеют *гомологичные друг другу участки*, т. е. последовательности нуклеотидов в них фактически одинаковы (более 90 % сходства). Последовательность длиной **180 пн**, которая была наиболее

консервативна, назвали *гомеобоксом*, а соответствующий ему фрагмент белковой молекулы длиной **60** аминокислотных остатков — *гомеодоменом*.

К настоящему времени найдены сотни генов, обладающих гомеобоксом: у человека, мышей, птиц, лягушек, червей, жуков. Фактически все представители животного мира, проходящие хотя бы на некоторых этапах развития стадию *сегментированного зародыша*, имеют *гены, обладающие гомеобоксом*. А у дрозофилы обнаружено свыше 20 генов, содержащих в своем составе гомеобокс. 180 пн гомеобокса кодируют фрагмент *полипептида* длиной в 60 аминокислот, который скручен в 4 α -спирали. Одна из них помещается *в большую бороздку ДНК*, опознает последовательность нуклеотидов и связывается с ней. Такими структурными особенностями обладают все белки — *факторы транскрипции*.

Еще один пример гомеозисного гена.

Как мы уже с вами говорили, в развитие глаз у разных животных вовлечено около **2500** генов, и весь каскад генов прямо или опосредованно контролируется одним главным, или *мастер-геном*. Вышеназванные гены развития глаз являются мастер – генами и имеют максимальную гомологию.

Итак, *развитие* — это *процесс последовательного включения* (и выключения) усложняющихся *генных систем*, или *каскадов генов*. При этом продукты одних генов находят специальные посадочные площадки в регуляторных районах других генов, садятся на них и включают (или выключают) эти гены. И так — сплошная последовательность включений и выключений генов.

Нобелевская премия 1995 г. была присуждена **Э. Льюису** с соавторами за открытие генетического контроля раннего эмбрионального развития.

Лекция № 15

Тема лекции: Методы изучения генетики человека

План лекции:

1. Человек как объект генетических исследований
2. Генеалогический метод
3. Близнецовый метод
4. Популяционно – статистический метод
5. Цитогенетический метод. Классификации хромосом
6. Биохимический метод
7. Биологическое и математическое моделирование
8. Дерматоглифика и пальмаскопия

1. Человек как объект генетических исследований

Особенности человека как объекта генетических исследований:

- 1) невозможность произвольного скрещивания;
- 2) позднее половое созревание и редкая смена поколений;
- 3) малое количество потомков;
- 4) невозможность создания одинаковых условий жизни;
- 5) социальное неравенство, которое затрудняет реализацию наследственного потенциала человека;
- 6) сложный кариотип – относительно много хромосом.

Несмотря на указанные трудности, успехи в познании генетики человека очень велики, и в настоящее время человек как объект генетических исследований имеет даже *ряд преимуществ* перед другими объектами.

Генетическая изученность вида во многом зависит от разработки методов *точного диагностирования* признаков. В этом отношении человек имеет преимущество, т. к. у него изучено большое количество разнообразных признаков, в том числе патологических, которые для других организмов неизвестны.

Например, это *морфологические* признаки человека, такие как брахидактилия (короткопалость), альбинизм и другие. Хорошо изучена генетика *групп крови* человека. Большие успехи достигнуты в области изучения *биохимических* признаков, отклонения которых от нормы вызывают болезненные изменения в обмене веществ.

Однако почти все особенности *психической* и *творческой* деятельности человека настолько сложны и настолько сильно обусловлены внешними, в том числе и социальными факторами, что генетический анализ этих

свойств пока трудно осуществим, хотя наследственная их обусловленность не вызывает сомнения.

2. Генеалогический метод

Генеалогический метод ввел в конце XIX в. **Френсис Гальтон**. Он основан на построении родословных и прослеживании в ряду поколений передачи определенного признака.

Этот метод применим, если известны прямые родственники – **предки** обладателя наследственного признака (**пробанда**) по материнской и отцовской линиям в ряду поколений или в том случае, когда известны **потомки** пробанда также в нескольких поколениях.

Принята **система обозначений** в родословных человека, которую предложил **Г. Юст** в 1931 г. Поколения обозначают римскими цифрами, индивидов в данном поколении – арабскими.

Этапы генеалогического анализа:

- 1) сбор данных обо всех родственниках обследуемого (анамнез);
- 2) построение родословной;
- 3) анализ родословной и выработка заключения.

Сложность сбора анамнеза заключается в том, что пробанд должен хорошо знать, по возможности, большинство своих родственников и состояние их здоровья.

Метод позволяет установить:

- 1) является ли данный признак наследственным;
- 2) тип и характер наследования;
- 3) зиготность лиц родословной;
- 4) пенетрантность гена;
- 5) вероятность рождения ребенка с данной наследственной патологией.

Типы наследования:

1. **Аутосомно – доминантный** тип наследования характеризуется следующими признаками:

- 1) больные в каждом поколении;
- 2) больной ребенок у больных родителей;
- 3) болеют в равной степени мужчины и женщины;
- 4) наследование идет по вертикали и по горизонтали;
- 5) вероятность наследования 100%, 75% и 50% (AA×AA, AA×aa, AA×Aa; Aa×Aa; Aa×aa).

Следует подчеркнуть, что вышеперечисленные признаки аутосомно - доминантного типа наследования будут проявляться только *при полном до-*

минирования. Так наследуется у человека полидактилия (шестипалость), брахидактилия, хондродистрофическая карликовость, катаракта, веснушки, курчавые волосы, карий цвет глаз и др. *При неполном доминировании* у гибридов будет проявляться промежуточная форма наследования. *При неполной пенетрантности* гена больные могут быть не в каждом поколении.

2. **Аутосомно – рецессивный** тип наследования характеризуется следующими признаками:

- 1) больные не в каждом поколении;
- 2) у здоровых родителей больной ребенок;
- 3) болеют в равной степени мужчины и женщины;
- 4) наследование идет преимущественно по горизонтали;
- 5) вероятность наследования 25%, 50% и 100%.

Чаще всего вероятность наследования аутосомно – рецессивного типа составляет 25%, так как вследствие тяжести заболевания такие больные либо не доживают до детородного возраста, либо не вступают в брак. Так наследуется у человека **фенилкетонурия**, серповидно – клеточная анемия, альбилизм, рыжие волосы, голубой цвет глаз и др.

3. **Сцепленный с полом рецессивный** тип наследования характеризуется следующими признаками:

- 1) больные не в каждом поколении;
- 2) у здоровых родителей больной ребенок;
- 3) болеют преимущественно мужчины;
- 4) наследование идет в основном по горизонтали;
- 5) вероятность наследования 25% от всех детей и 50% у мальчиков.

Так наследуется у человека **гемофилия**, дальтонизм, наследственная анемия, мышечная дистрофия Дюшенна и др.

4. **Сцепленный с полом доминантный** тип наследования сходен с аутосомно-доминантным, за исключением того, что мужчина передает этот признак всем дочерям (сыновья получают от отца Y-хромосому, они здоровы). Примером такого заболевания является особая форма рахита, устойчивая к лечению витамином D (**витамин D – резистентный рахит**). Мужчины болеют более тяжело. Еще 2 подобных заболевания: **фолликулярный кератоз** (сопровождается полной потерей волос, ресниц, бровей) и **пигментный дерматоз**.

5. **Голандрический** тип наследования характеризуется следующими признаками:

- 1) больные во всех поколениях;
- 2) болеют только мужчины;
- 3) у больного отца больны все его сыновья;

4) вероятность 100% у мальчиков.

Так наследуются у человека *ихтиоз кожи*, обволосение наружных слуховых проходов и средних фаланг пальцев, перепонки между пальцами на ногах и др. Голандрические признаки не имеют существенного значения в наследственной патологии человека. Существуют и патологические мутации, нарушающие формирование семенников и сперматогенез, но они не передаются по наследству (носители их стерильны).

Использование генеалогического метода показало также, что вероятность появления *уродства, мертворождений, ранней смертности* в потомстве *родственных браков* значительно выше, чем в неродственных. Объяснить это можно тем, что родственники имеют одинаковые гены чаще, чем неродственники, а следовательно, в родственных браках чаще возникают *гомозиготные комбинации*, в том числе и по рецессивным генам, определяющим те или иные аномалии.

Вот пример выявления патологического рецессивного признака при родственном браке. От двух родственных браков появилось в одной семье 4 ребенка из 8, а в другой – 2 из 5, страдающих *наследственной амавротической идиотией* (поражение центральной нервной системы). Один из двух общих предков передал рецессивный ген через три поколения каждому из четырех родителей.

Генеалогический метод широко используется и как метод диагностики болезней с наследственной природой, что имеет большое значение для медицины – генетических консультаций, когда заинтересованные в здоровье потомства лица ставят вопрос перед врачом об опасении иметь больное потомство.

3. Близнецовый метод

Близнецовый метод изучения генетики человека введен в медицинскую практику **Ф. Гальтоном** в 1876 г. Он позволяет определить роль генотипа и среды в проявлении признаков.

Близнецами называют одновременно родившихся особей у одноплодных животных (человек, лошадь, крупный рогатый скот и др.).

Различают моно- и дизиготных близнецов. *Монозиготные* (однойяйцевые), *идентичные близнецы* развиваются из одной оплодотворенной яйцеклетки (явление полиэмбрионии). Монозиготные близнецы имеют совершенно одинаковый генотип и, если они отличаются фенотипически, то это обусловлено воздействием факторов внешней среды.

Дизиготные (двухяйцевые, или разнаяйцевые) близнецы развиваются после оплодотворения сперматозоидами нескольких одновременно созрев-

ших яйцеклеток. Близнецы имеют разный генотип, и их фенотипические различия обусловлены как генотипом, так и факторами внешней среды.

Монозиготные близнецы имеют большую степень сходства по признакам, которые определяются в основном генотипом. Например, монозиготные близнецы всегда однополы, у них одинаковые группы крови по разным системам (AB0, Rh, MN и др.), одинаковый цвет глаз, однотипны дерматоглифические показатели на пальцах и ладонях и др.

Процент сходства группы близнецов по изучаемому признаку называется *конкордантностью*, а процент различия – *дискордантностью*. Так как монозиготные близнецы имеют одинаковый генотип, то конкордантность их выше, чем у дизиготных.

Для оценки роли наследственности и среды в развитии того или иного признака используют *формулу Хольцингера*:

$$H = \frac{КМБ\% - КДБ\%}{100\% - КДБ\%};$$

где H – наследуемость признака, КМБ% - конкордантность монозиготных близнецов, КДБ% - конкордантность дизиготных близнецов.

У человека чаще всего встречаются двойни, реже тройни, еще реже – четверни, совсем редко – пятерни. Статистика свидетельствует, что пятерни рождаются примерно один раз на 54 млн родов, шестерни ~ на 5 млрд родов, семерни еще более редки. В среднем частота рождения близнецов близка к 1% и 1/3 из них составляют ОБ.

Для использования близнецов в генетических исследованиях очень важно точно определить *тип близнецов*. Диагностика производится на основании нескольких *критериев*: 1) ОБ обязательно одного пола, РБ могут быть как одного пола, так и разных полов; 2) наличие сходства (конкордантности) у ОБ и несходства (дискордантности) у РБ по многим признакам, в том числе по группам крови; правда, необходимо учитывать, что во время внутриутробной жизни могут возникать нарушения развития, соматические мутации и т. п. у одного из ОБ, что может привести к некоторым отличиям партнеров; 3) решающий, но трудноосуществимый критерий – реципрокная *трансплантация тканей* у ОБ столь же успешна, как и автотрансплантация, у РБ она невозможна в силу иммунологической несовместимости.

Человеческие близнецы – прекрасный материал для разработки общеприкладной и очень важной в практическом отношении проблемы: *о роли наследственности и среды* в развитии признаков.

Пара ОБ имеет тождественный генотип, РБ – разный. Для обоих партнеров одной пары ОБ или РБ внешняя среда может оказаться или одинаковой, или разной.

Сравнение развития **ОБ** в *одинаковой* среде и в *разной* среде открывает возможность судить о влиянии среды на признаки.

Сравнение развития **ОБ** и **РБ** в *одинаковой* среде позволяет выяснить роль наследственности в развитии признаков.

4. Популяционно – статистический метод

Популяционно – статистический метод изучения генетики человека основан на использовании закона Харди – Вайнберга. Он позволяет определять частоту *генов* и *генотипов* в популяциях людей. Например, гомозиготы по гену HbS в России практически не встречаются, а в странах Западной Африки частота их варьирует: от 25% в Камеруне до 40% в Танзании.

Изучение распространения генов среди населения различных географических зон (*генгеография*) дает возможность установить центры происхождения различных этнических групп и их миграции, определить степень риска появления наследственных болезней у отдельных индивидуумов.

5. Цитогенетический метод. Классификации хромосом

Цитогенетический метод основан на микроскопическом исследовании кариотипа. *Этапы метода*: 1) культивирование клеток человека (чаще лимфоцитов) на искусственных питательных средах; 2) стимуляция митозов *фитогемагглютинином* (ФГА); 3) добавление *колхицина* (разрушает нити веретена деления) для остановки митоза на стадии метафазы; 4) обработка клеток гипотоническим раствором, вследствие чего хромосомы рассыпаются и лежат свободно; 5) окрашивание хромосом; 6) изучение под микроскопом и фотографирование; 7) вырезание отдельных хромосом и построение идиограммы.

Совокупность хромосом соматической клетки данного организма, со всеми их морфологическими особенностями, называется *кариотипом*.

Идиограмма – это систематизированный кариотип, в котором хромосомы располагаются по мере убывания их величины. Точно расположить хромосомы по величине удастся далеко не всегда, так как некоторые пары хромосом имеют близкие размеры. Поэтому в 1960 г. была предложена *Денверская* классификация хромосом, которая помимо *размеров* хромосом учитывает их *форму*, положение *центромеры* и наличие *вторичных перетяжек* и *спутников*.

23 пары хромосом человека разбили на 7 *групп* от А до G. Важным параметром является *центромерный индекс* (ЦИ), который отражает отношение (в %) длины короткого плеча к длине всей хромосомы.

К *группе А* относят 1 – 3 пары хромосом. Это большие, метацентрические и субметацентрические хромосомы, их центромерный индекс от 38 до 49.

Группа В (4 и 5 пары). Это большие субметацентрические хромосомы, ЦИ 24 – 30.

Группа С (6 – 12). Хромосомы среднего размера, субметацентрические, ЦИ 27 – 35. К этой группе относят и *X-хромосому*.

Группа D (13 – 15 пары). Хромосомы акроцентрические, сильно отличаются от всех других хромосом человека, ЦИ около 15.

Группа E (16 – 18 пары). Относительно короткие, метацентрические или субметацентрические, ЦИ 26 – 40.

Группа F (19 – 20 пары): две короткие, субметацентрические хромосомы, ЦИ 36 – 46.

Группа G (21 и 22 пары): это маленькие акроцентрические хромосомы, ЦИ 13 – 33. К этой группе относят и *Y-хромосому*.

В основе *Парижской* классификации хромосом человека (1971 г.) лежат методы *дифференциальной окраски*, при которой в каждой хромосоме выявляется характерный только для нее порядок чередования поперечных светлых и темных сегментов.

Различные типы сегментов обозначают по методам, с помощью которых они выявляются наиболее четко. Например, *Q-сегменты* – это участки хромосом, флюоресцирующие после окрашивания *акрихин – ипритом*; *G-сегменты* выявляются при окрашивании красителем *Гимза*. *R-сегменты* окрашиваются после контролируемой *тепловой денатурации* и т. д. Данные методы позволяют четко дифференцировать хромосомы человека внутри групп.

Короткое плечо хромосом обозначают латинской буквой *p*, а *длинное* – *q*. Каждое плечо хромосомы разделяют на *районы*, нумеруемые по порядку от центромеры к теломере. В некоторых коротких плечах выделяют один такой район, а в других (длинных) – до четырех. *Полосы* внутри районов нумеруются по порядку от центромеры. Если локализация гена точно известна, для ее обозначения используют индекс полосы. Например, локализация гена, кодирующего эстеразу D, обозначается **13p14** – четвертая полоса первого района короткого плеча 13^{ой} хромосомы.

Хромосомные aberrации обозначают номером хромосомы, короткого или длинного плеча и избытком (+) или нехваткой (-) генетического материала. Например, *синдром кошачьего крика* обозначают: **5p-**.

6. Биохимический метод

Биохимические методы основаны на изучении активности ферментных систем (либо по активности самого фермента, либо по количеству конечных продуктов реакции, катализируемой данным ферментом). Они позволяют выявлять генные мутации – причины болезней обмена веществ (например, фенилкетонурия, серповидно – клеточная анемия).

С помощью биохимических **нагрузочных тестов** можно выявлять *гетерозиготных носителей* патологических генов, например, фенилкетонурии. Исследуемому человеку вводят внутривенно определенное количество аминокислоты фенилаланина и через равные промежутки времени определяют его концентрацию в крови. Если человек гомозиготен по доминантному гену (AA), то концентрация фенилаланина в крови довольно быстро возвращается к контрольному уровню (определяется до введения фенилаланина), а если он гетерозиготен (Aa), то снижение концентрации фенилаланина идет вдвое медленнее.

Аналогично проводятся тесты, выявляющие предрасположенность к сахарному диабету, гипертонии и другим болезням.

7. Биологическое и математическое моделирование

Биологическое моделирование определенных наследственных аномалий человека можно проводить *на мутантных линиях животных*, имеющих сходные нарушения. Например, у собак встречается гемофилия, обусловленная рецессивным сцепленным с X-хромосомой геном, несращение губы и неба у мышей сходно с аналогичными аномалиями человека, у хомяков и крыс встречаются сахарный диабет, ахондроплазия, мышечная дистрофия и др. Хотя мутантные линии животных не дают точную картину наследственных болезней человека, даже частичное воспроизведение их фрагментов в ряде случаев позволяет изучить механизмы первичного отклонения от нормы. *Закон гомологических рядов Н.И.Вавилова* (виды и роды, генетически близкие, обладают сходными рядами наследственной изменчивости) позволяет с определенными ограничениями экстраполировать экспериментальные данные на человека.

Математическое моделирование – это метод создания и изучения математических моделей. Его применяют для расчетов частот генов в популяциях при различных воздействиях и изменениях окружающей среды. Математические методы широко применяются в тех случаях, когда невозможно использование экспериментальных методов (например, анализ большого количества сцепленных генов у человека).

8. Дерматоглифика и пальмаскопия

Дерматоглифический анализ – это изучение *папиллярных* узоров пальцев, ладоней и стоп. На этих участках кожи имеются крупные дермальные *сосочки*, а покрывающий их эпидермис образует *гребни* и *борозды*. Дерматоглифические узоры обладают высокой степенью индивидуальности и остаются неизменными в течение всей жизни. Поэтому их используют для определения зиготности близнецов, для идентификации личности в криминалистике.

В медико-генетических консультациях дерматоглифический анализ используется в качестве экспресс-метода диагностики некоторых геномных мутаций (болезни Дауна), реже – хромосомных мутаций.

Папиллярные гребни на различных участках гребешковой кожи образуют узоры разного типа и ориентации. Узоры изучают на отпечатках, сделанных на бумаге, после нанесения на кожу типографской краски. На пальцевых подушечках имеются узоры трех типов: *дуги* (A - *arch*), *петли* (L - *loop*) и *завитки* (W - *whorl*). Для большинства узоров характерна *дельта* (трирадиус) – место схождения трех разнонаправленных папиллярных линий.

Дуга представляет собой открытый, *бездельтовый* узор; *петля* – замкнутый с одной стороны, *однодельтовый* узор; *завиток* – полностью замкнутый, *двухдельтовый* узор. Иногда встречаются комбинированные сложные узоры. Количественным показателем узора является *гребневый счет* – число папиллярных линий между дельтой и центром узора. Гребневый счет дугового узора равен нулю.

Пальмаскопия. Узоры, аналогичные пальцевым, имеются и на *ладонях* – в области тенора и гипотенора и на II, III, IV и V межпальцевых промежутках. В межпальцевых промежутках имеются *трирадиусы* (**a, b, c, d**), а вблизи браслетной складки расположен *главный ладонный трирадиус t*. Если соединить трирадиусы **a, d** и **t**, то получим *главный ладонный угол atd*, который в норме не превышает 57° .

На ладони различают три *главные флексорные* (сгибательные) *борозды*: борозда *большого пальца*, *косая* и *поперечная*. Иногда косая борозда сливается с поперечной в одну *четырёхпальцевую* борозду. Частота ее встречаемости в норме не превышает 5%.

Совокупность радиальных петель на IV и V пальцах, четырехпальцевой борозды и главного ладонного угла свыше 60° - 80° свидетельствует о наследственном заболевании.

Лекция № 16

Тема лекции: Наследственные болезни человека

План лекции:

1. Роль наследственности и среды в развитии патологии
2. Хромосомные болезни
3. Генные, или менделевские болезни
 - 3.1 Энзимопатии
 - 3.1.1 Нарушения аминокислотного обмена
 - 3.1.2 Нарушения обмена углеводов
 - 3.1.3 Нарушения липидного обмена
 - 3.1.4 Нарушения свертывающей системы крови
 - 3.2 Гемоглобинопатии
 - 3.3 Коллагеновые болезни
 - 3.4 Системные нарушения развития органов и тканей
4. Мультифакториальные заболевания
5. Болезни с нетрадиционным типом наследования

1. Роль наследственности и среды в развитии патологии

Наследственность и среда могут играть большую или меньшую роль в развитии того или иного порока или заболевания.

С генетической точки зрения, все болезни, в зависимости от относительной значимости факторов наследственности или среды в их развитии, можно подразделить *на 4 группы*).

1. Первая группа – это **наследственные** болезни. Проявление заболевания практически не зависит от среды, которая может только менять выраженность симптомов болезни и тяжесть ее течения. К заболеваниям этой группы относятся хромосомные и генные болезни (болезнь Дауна, гемофилия и др.). Болезнь может проявляться необязательно в детском, но в любом возрасте (например, средний возраст начала *хореи Гентингтона* равен 38-40 годам).

2. Во второй группе болезней *наследственность играет ведущую роль*, но для **пенетрантности** мутантных генов необходим соответствующий **фактор окружающей среды**. К таким заболеваниям относятся, например, подагра, диабет, фармако- и экогенетические болезни. Подобные заболевания развиваются после контактов с проявляющим болезнь внешним фактором, специфическим для каждого мутантного гена. Эти болезни можно отнести к группе болезней *с наследственной предрасположенностью*, или **мультифакториальным** заболеваниям.

3. Болезни третьей группы *развиваются под влиянием факторов среды*, однако частота возникновения и тяжесть течения болезней существенно зависят от **наследственной предрасположенности**. К болезням этой группы относятся атеросклероз, гипертоническая болезнь, туберкулез, язвенная болезнь и др. Они возникают под действием внешних факторов (иногда не одного, а сочетания многих) гораздо чаще у лиц с наследственной предрасположенностью. Как и болезни второй группы, они относятся к болезням с **наследственной предрасположенностью**. Резкой границы между этими группами нет.

4. В происхождении болезней четвертой группы *наследственность не играет никакой роли*. Сюда относится большинство травм, инфекционных болезней, ожогов и т.д. Генетические факторы могут влиять только на *течение* патологических процессов (быстрота выздоровления, скорость восстановительных процессов и т. д.).

Наследственные болезни человека

В 90-х годах XX в. предложена рабочая **классификация** наследственных болезней человека, включающая:

- 1) синдромы, обусловленные хромосомными аномалиями (**хромосомные** болезни);
- 2) болезни, вызванные мутацией отдельного гена (генные, или **менделевские** болезни);
- 3) **мультифакториальные** заболевания (болезни с наследственной предрасположенностью);
- 4) болезни с **нетрадиционным типом наследования**;
- 5) **генетические болезни соматических клеток** (новообразования, старение, аутоиммунные болезни).

2. Хромосомные болезни

Хромосомные болезни – это группа заболеваний, вызываемых изменениями **числа** (геномные мутации) или **структуры** (хромосомные aberrации) **хромосом**, видимыми в световой микроскоп.

Хромосомные aberrации и изменения количества хромосом могут возникать на разных этапах онтогенеза. Если они имеются *уже в гаметах родителей*, то эта аномалия будет наблюдаться во всех клетках развивающегося организма (**полный мутант**).

Хромосомные аномалии могут возникать и в процессе эмбрионального развития при дроблении зиготы. В норме каждый бластомер содержит одинаковый набор хромосом, идентичный набору зиготы. Однако в некоторых случаях возможно **нарушение расхождения хромосом**, вследствие чего в

разные бластомеры попадает неодинаковое их количество (один бластомер с моносомией, а другой – с трисомией). При последующем дроблении возникают *две клеточные линии (клоны)*, сохраняющие особенности *аномального кариотипа*. В зависимости от стадии, на которой произошло нарушение, и интенсивности размножения клеток число этих клеточных линий может быть различным. Остальные клетки, ведущие начало от нормальных бластомеров, будут иметь неизмененный кариотип. Такое явление называется *генетическим мозаицизмом*. Мозаичные организмы могут содержать *несколько (2, 3, 4 и более) клеточных клонов* с различными кариотипами. Это явление может сопровождаться патологией всего организма либо отдельных его органов и систем. При незначительном количестве аномальных клеток фенотипические проявления могут не обнаруживаться.

Какие же существуют виды хромосомных болезней? Нарушение *плоидности* у людей представлено единственным синдромом - *триплоидии* (дети погибают в первые часы или дни после рождения).

Синдромы *трисомий* – наиболее частая форма хромосомной патологии у человека.

Полная моносомия, совместимая с жизнью, наблюдается *только по X-хромосоме*.

К *абберациям* хромосом относятся либо *частичные трисомии*, либо *частичные моносомии*, либо *их сочетания*.

Хромосомные болезни встречаются довольно часто. Частота хромосомных болезней у живорожденных детей составляет примерно **2-3 случая на 1000 родившихся**.

Наиболее *специфические проявления* хромосомных заболеваний связаны с дисбалансом по относительно *небольшому фрагменту* хромосомы. Так, фенотипическое проявление синдрома Дауна наблюдается в случае трисомии всего лишь по небольшому сегменту длинного плеча 21-й хромосомы (ген *супероксиддисмутазы I*, он представлен у больных в 3-х копиях). Чем *больше размер* утраченного или дублицированного участка, тем *менее специфична фенотипическая картина* болезни.

Рассмотрим некоторые хромосомные болезни, но при этом не будем касаться нарушений числа *половых хромосом*, поскольку мы изучали их раньше.

Полные трисомии

Наиболее часто у человека встречаются полные трисомии по 13-й, 18-й и 21-й паре хромосом.

1) **Синдром Патау** (синдром трисомии 13) встречается с частотой 1:6000.

Имеются два цитогенетических варианта синдрома Патау: *простая трисомия и робертсоновская транслокация*.

Дети с синдромом Патау рождаются с массой тела значительно ниже нормы (2500 г). У них наблюдается *микроцефалия*, недоразвитие различных отделов ЦНС, низкий скошенный лоб; микрофтальмия, помутнение роговицы, *запавшее переносье*, широкое основание носа, широко расположенные и деформированные ушные раковины. Одним из наиболее типичных признаков является *двухсторонняя расщелина верхней губы и неба*. Отмечаются полидактилия, синдактилия. Часто встречаются пороки сердца, поджелудочной железы, почек.

Дети с синдромом Патау живут недолго: 95% больных умирают до года, более трех лет живут лишь единицы. Все выжившие дети с синдромом Патау – глубокие идиоты.

2) *Синдром Эдвардса* (синдром трисомии 18) встречается с частотой примерно 1:7000. Дети с трисомией 18 чаще рождаются у пожилых матерей. Для женщин старше 45-ти лет риск родить больного ребенка составляет 0,7%.

Цитогенетически синдром Эдвардса представлен *простой трисомией*, значительно реже встречаются *мозаичные формы* и как исключение – *транслокационные*.

Синдром Эдвардса у девочек встречается значительно чаще, чем у мальчиков, что связано, возможно, с большей жизнестойкостью женского организма. Дети с трисомией 18 рождаются со значительно сниженным весом (около 2200 г), хотя сроки беременности нормальные или даже увеличены.

Наиболее часто у больных отмечаются аномалии черепа и лица: *ступенеобразное западание лобных костей* в области родничка, нижняя челюсть и отверстие рта маленькие, глазные щели узкие и короткие. Наблюдается аномальное развитие стопы: пятка резко выступает, свод провисает (*стопа-качалка*); характерны пороки сердца, недоразвитие мозга.

При дерматоглифическом анализе обнаруживают четырехпальцевую борозду, увеличение числа дуг на пальцах, слабо выраженный узор на мизинцах.

Продолжительность жизни детей с синдромом Эдвардса невелика: 60% детей умирают до 3 месяцев; до года доживает лишь 1 ребенок из 10.

3) *Синдром Дауна* (синдром трисомии 21) – самая частая форма хромосомной патологии у человека – **1:900**. Достоверно установлено, что дети с синдромом Дауна чаще рождаются у *пожилых родителей*. Если возраст отца свыше 46 лет, а матери – 41 – 46 лет, то вероятность рождения больного ребенка с синдромом Дауна возрастает до 4 %.

Наиболее распространенными цитогенетическими формами синдрома Дауна являются *простая трисомия*, *транслокационная форма* и *мозаицизм*. За возникновение фенотипических проявлений синдрома Дауна отвечает лишь небольшой участок длинного плеча 21-й хромосомы (21q+), и каким бы образом он ни был удвоен, развивается типичная клиническая картина.

Дети с синдромом Дауна рождаются с несколько сниженным весом (3167 г). Для больных характерна округлой формы *голова с уплощенным затылком*, лоб скошен, узкий, лицо плоское. Типичен *эпикант*, плоская спинка носа, *косой разрез глазных щелей*, *пятна Брушфильда* (светлые пятна на радужке), *толстые губы*, *утолщенный язык* с глубокими бороздами, выступающий изо рта, маленькие недоразвитые низко расположенные ушные раковины, недоразвитая нижняя челюсть, высокое небо, неправильный рост зубов, короткая шея.

Из пороков внутренних органов наиболее типичны пороки сердечно-сосудистой системы и органов пищеварения (атрезии и стенозы различных отделов). У детей младшего возраста резко выражена мышечная гипотония, а у детей старшего возраста часто обнаруживается катаракта. Для детей с синдромом Дауна характерна *умственная отсталость*: в основном это имбецильность (65-90%), дебильность и идиотия диагностируются примерно в равном соотношении.

Дерматоглифические особенности при болезни Дауна: четырехпальцевая борозда (у 45% больных) и главный ладонный угол свыше 57°.

Продолжительность жизни при синдроме Дауна значительно ниже (36 лет), чем у здоровых людей.

Пример частичных моносомий

Синдром «кошачьего крика» (5p-) обусловлен делецией короткого плеча 5-ой хромосомы. Дети с этим синдромом рождаются у родителей обычного возраста. Популяционная частота синдрома примерно 1:45000.

Наиболее характерными симптомами являются специфический *плач* («*кошачий крик*»), умственное и физическое недоразвитие, микроцефалия, низко расположенные деформированные ушные раковины, *лунообразной формы лицо*, эпикант, *антимонголоидный разрез* глаз, атрофия зрительного нерва.

Наиболее постоянный признак – «*кошачий крик*» – обусловлен изменениями *гортани*: сужением, мягкостью хрящей, отечностью или необычной складчатостью слизистой.

Продолжительность жизни пациентов снижена, только 14% больных переживают возраст 10 лет.

3. Генные, или менделевские болезни

К указанным заболеваниям относятся *моногенно* обусловленные патологические состояния, наследуемые в соответствии с законами Менделя.

При изучении белковых продуктов мутантных генов выделяют *две группы мутаций*. Первая группа связана с *качественными* изменениями белковых молекул, т.е. наличием у больных аномальных белков (например, аномальных гемоглобинов), что обусловлено мутациями *структурных генов*.

Другая группа заболеваний характеризуется *количественными* изменениями содержания нормального белка в клетке (повышением или понижением), что обусловлено, чаще всего, мутациями *регуляторных генов*. В зависимости от функций продуктов соответствующих генов генные болезни подразделяют на наследственные нарушения ферментных систем (энзимопатии), дефекты белков крови (гемоглобинопатии), коллагеновые болезни и системные нарушения развития органов и тканей.

3.1 Энзимопатии

При *энзимопатиях (или ферментопатиях)* вещества, накапливающиеся в результате отсутствия или снижения активности ферментов, либо сами оказывают токсическое действие, либо включаются в цепи вторичных обменных процессов, в результате которых образуются токсические продукты. В настоящее время описано около 3 тыс. наследственных болезней обмена веществ. Общая частота генных болезней в популяциях людей составляет 2-4%.

3.1.1 Нарушения аминокислотного обмена

Наиболее часто встречаются среди них *фенилкетонурия* и *альбинизм*.

1) *Фенилкетонурия* встречается в человеческих популяциях с относительно высокой частотой – **1:10000**. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

В норме аминокислота фенилаланин с помощью фермента *фенилаланингидроксилазы* превращается в аминокислоту – тирозин, который в свою очередь под действием фермента *тирозиныазы* может превращаться в *меланин (пигмент)*. При нарушении активности этих ферментов развиваются два наследственных заболевания: фенилкетонурия и альбинизм.

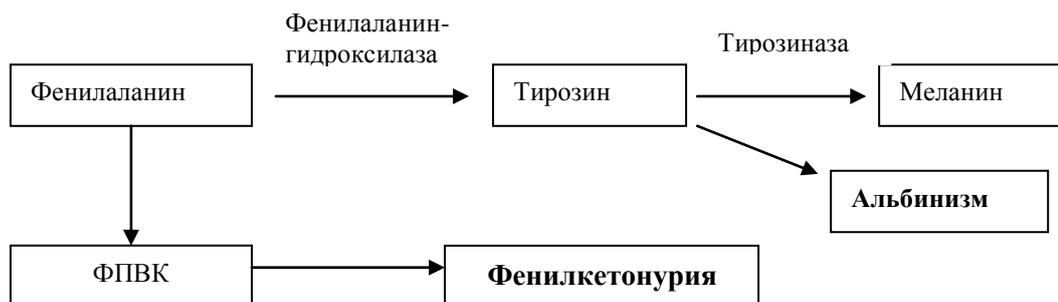


Рис. – Схема нормального обмена фенилаланина и его нарушений

Фенилаланин принадлежит к числу незаменимых аминокислот. Только часть ФА используется для синтеза белков; основное количество этой аминокислоты окисляется до тирозина. Если не активен фермент фенилаланингидроксилаза, то ФА не превращается в тирозин, а накапливается в сыворотке крови в больших количествах и превращается в **фенилпировиноградную кислоту (ФПВК)**, выделяющуюся с *мочой и потом*, вследствие чего от больных исходит «**мышинный**» запах.

Дети с фенилкетонурией рождаются здоровыми, но в первые же недели жизни у них появляются признаки заболевания. ФПВК является **нейротропным** ядом, при ее избытке развиваются повышенная возбудимость, повышенный тонус мышц, судорожные припадки. Позже присоединяются нарушения высшей нервной деятельности, **умственная отсталость**, микроцефалия. У больных наблюдается **слабая пигментация** вследствие нарушения синтеза меланина. Ген фенилаланингидроксилазы картирован в длинном плече 12 хромосомы и секвенирован.

Диагностика заболевания осуществляется биохимическими методами: еще до развития клинической картины наблюдается выделение ФПВК с мочой, а в крови определяется высокое содержание фенилаланина. Эффективным методом лечения является **диетотерапия** – снижение содержания в пище ребенка фенилаланина. Для предотвращения необратимых поражений мозга лечение необходимо начинать с первых недель жизни, проводить до 7-10 лет и постоянно следить за содержанием фенилаланина в крови. Мозг *взрослого человека устойчив* к высоким концентрациям ФПВК.

2) **Альбинизм** встречается в разных популяциях с частотой от 1:5000 до 1:25000. Он наследуется по аутосомно-рецессивному типу. В основе этого заболевания лежит мутация гена, при которой нарушается активность фермента **тирозины**, превращающего аминокислоту тирозин в пигмент меланин.

Основными клиническими проявлениями альбинизма являются отсутствие меланина в клетках кожи (*молочно-белый ее цвет*), волосах (очень светлые волосы), радужной оболочке глаза и повышенная чувствительность к УФ-облучению, которое вызывает **воспалительные заболевания кожи**. У больных на коже отсутствуют какие-либо пигментные пятна, **снижена острота зрения**. Фенотипические признаки выражены уже у новорожденного. Лечение не разработано.

3.1.2 Нарушения обмена углеводов

1) **Мукополисахаридозы** – это группа наследственных дефектов расщепления **полисахаридов** с аутосомно-рецессивным типом наследования. Популяционная частота их не установлена.

Для них характерна недостаточность **лизосомальных ферментов**. В результате патологические продукты обмена откладываются в соединительной ткани, в печени, селезенке, роговице и в клетках центральной нервной системы.

Первые сведения о мукополисахаридозах появились в 1900 г. Еще раньше это заболевание было известно под названием **«гаргулизм»**, поскольку черты лица у больных были сходными с таковыми у фигур, украшавших средневековые **готические соборы** и служивших выпуском для ливневых вод (лежащие статуи, антропоморфные демоны, или **гаргульи**).

При мукополисахаридозах поражаются опорно-двигательный аппарат, внутренние органы, глаза, нервная система.

Характерны следующие симптомы: замедление роста, короткая шея, деформация костей, снижение интеллекта, **грубые черты лица с крупными губами и языком**, пупочные и паховые грыжи, пороки сердца, нарушение психического развития с отставанием от нормы.

Больные погибают в возрасте до 10 лет. Диагностика основана на изучении содержания кислых мукополисахаридов в сыворотке крови.

2) **Гликогеновая болезнь** связана с нарушением синтеза и разложения **гликогена** – животного крахмала. Гликоген образуется из глюкозы при голодании; в норме он снова превращается в глюкозу и усваивается организмом. При нарушении этих процессов у человека развиваются тяжелые заболевания – различные типы **гликогенозов**. К ним относится, в частности, болезнь Гирке.

При **болезни Гирке** гликоген не превращается в глюкозу, т.к. отсутствует фермент **глюко-6-фосфатаза**, регулирующий уровень глюкозы в крови. В результате у больного развивается **гипогликемия**, в печени, почках и слизистой кишечника **накапливается гликоген**. Болезнь Гирке наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Сразу после рождения проявляются гипогликемические судороги и увеличение печени. С 1-го года жизни отмечается задержка роста. Характерен вид больного: большая голова, **«кукольное лицо»**, короткая шея, **выступающий живот**. Кроме того, отмечаются носовые кровотечения, задержка физического и полового развития, мышечная гипотония. **Интеллект при этом нормальный**.

В качестве лечения используется диетотерапия: частый прием пищи, *повышение содержания углеводов* и ограничение жиров в диете.

3.1.3 Нарушения липидного обмена

В число липидов входят холестерин, фосфолипиды, сфинголипиды и др. При наследственных заболеваниях они откладываются в клетках разных тканей или накапливаются в крови.

Примеры наследственных болезней обмена липидов (липидозов)

1) *Болезнь Ниманна-Пика* вызвана снижением активности фермента **сфингомиелиназы**. В результате происходит **накопление сфингомиелина** в клетках мозга, печени, селезенки, ретикуло-эндотелиальной системы.

Болезнь проявляется в раннем возрасте. У ребенка увеличиваются в размерах лимфатические узлы, **живот, печень, селезенка**; отмечаются рвота, отказ от пищи, мышечная слабость. На сетчатке глаза обнаруживается пятно вишневого цвета (симптом «*вишневой косточки*»). Поражение нервной системы ведет к *отставанию нервно-психического развития, глухоте, слепоте*. Резко снижается устойчивость к инфекционным заболеваниям. Дети погибают в раннем возрасте.

Наследование болезни – аутосомно-рецессивное. Ген сфингомиелиназы картирован на хромосоме 11.

Диагностика болезни Ниманна-Пика основана на выявлении в плазме крови повышенного содержания сфингомиелина. В крови выявляются большие *зернистые пенистые клетки Пика*.

2) *Амавротическая идиотия (болезнь Тея-Сакса)* вызвана отложением в клетках мозга, печени, селезенки и других органов липида *ганглиозида*. Причина – снижение активности фермента *гексозаминидазы А*. В результате происходит разрушение аксонов нервных клеток. Болезнь встречается редко – **1:300.000**; только у *евреев - ашкенази* значительно чаще – **1:3600**.

Заболевание проявляется в первые месяцы жизни. Ребенок становится вялым, малоподвижным, безразличным к окружающим. Задержка психического развития постепенно приводит к *идиотии*. Отмечается мышечная гипотония, судороги, симптом «*вишневой косточки*» на сетчатке глаза. К концу первого года жизни наступает *слепота* вследствие атрофии зрительных нервов. Позднее развивается *полная обездвиженность*. Смерть наступает в 3-4 года.

Тип наследования болезни – аутосомно-рецессивный. Ген локализован на длинном плече 15-й хромосомы.

3.1.4 Нарушения свертывающей системы крови

1) **Гемофилия А** – тяжелое наследственное заболевание, обусловленное дефектом **VIII фактора** свертывания крови. Встречается с частотой **1:6500** мальчиков. Тип наследования – сцепленный с полом, рецессивный. Ген расположен в длинном плече X-хромосомы (Xq28).

Заболевание распознается на 2-3 году жизни, а в тяжелых случаях – при рождении (кровотечения из пупочного канатика, под- и внутрикожные кровоизлияния). Для заболевания характерен **гематомный тип** кровоточивости. Преобладают *кровоизлияния в крупные суставы* конечностей (коленные, локтевые, голеностопные), подкожные, внутри- и межмышечные гематомы, кровотечения при травмах и хирургических вмешательствах, наличие крови в моче. Поступление крови в полость суставов приводит к развитию *стойкой тугоподвижности* из-за развития соединительной ткани в суставах.

2) **Гемофилия В** – тяжелое наследственное заболевание, обусловленное снижением активности **IX фактора** свертываемости крови. Популяционная частота не установлена. Тип наследования – сцепленный с полом, рецессивный. Ген картирован – Xq27. Клинические проявления заболевания сходны с таковыми при гемофилии А. Диагностика основывается на исследовании соответствующих факторов свертываемости крови. При лечении вводят недостающие факторы свертывания крови.

На этом заканчиваются примеры ферментопатий.

3.2 Гемоглобинопатии

Гемоглобинопатии – заболевания, связанные с нарушением структуры молекулы **гемоглобина**. Нормальный гемоглобин человека (HbA) состоит из двух α -цепей и двух β -цепей. Гены глобинов у человека образуют мультигенное семейство и расположены на хромосомах в виде *двух кластеров*.

Мутантные формы Hb имеют *одиночные замены аминокислот*, в основе которых лежит замена одного азотистого основания другим.

1) Наиболее известной формой подобных заболеваний является **серповидноклеточная анемия**. Это заболевание впервые обнаружил в 1910 г. **Дж. Херрик** у студента-негра, страдавшего тяжелой формой анемии. В крови больного он выявил эритроциты необычной серповидной формы. Оказалось, что это заболевание – нередкое явление у американских негров.

В 1946 г. Нобелевский лауреат **Л. Полинг** с коллегами показали, что гемоглобины нормальных и серповидноклеточных эритроцитов различаются по подвижности в электрическом поле и растворимости. Затем было установлено, что в случае серповидноклеточной анемии происходит **замена глутаминовой кислоты** на **валин** в шестой паре нуклеотидов гена, кодирующего

β -цепь гемоглобина. У гетерозигот измененный гемоглобин составляет 20-45%, у гомозигот – 60-99% общего гемоглобина.

При данной патологии отмечают бледность кожи и слизистых оболочек, желтушность, увеличение печени. Отмечаются шумы в области сердца.

Гетерозиготные носители HbS в обычных условиях клинически здоровы. У **гомозигот** с раннего возраста развивается хроническая **гипоксия** и **анемия**, обусловленные слабой способностью HbS переносить кислород и преждевременным гемолизом и распадом эритроцитов. HbS часто обнаруживается у населения регионов, эндемичных по **тропической малярии**, так как даже гетерозиготы по HbS **невосприимчивы к малярии**.

3.3 Коллагеновые болезни

В основе возникновения этих заболеваний лежат генетические дефекты биосинтеза и распада **коллагена** – важнейшего структурного компонента соединительной ткани. К этой группе относят болезнь Марфана и ряд других заболеваний.

Синдром Марфана («паучьи пальцы») характеризуется системным поражением **соединительной ткани**. Наследуется по аутосомно-доминантному типу. Впервые синдром был описан **В. Марфаном** в 1886 г. Причина болезни – мутация в гене, ответственном за синтез белка **фибрилина**. Блокирование его синтеза приводит к **повышенной растяжимости соединительной ткани**.

Для больных характерны: **высокий рост**, длинные **паучьи пальцы**, деформация грудной клетки (воронкообразная, килевидная, уплощенная), плоскостопие. Имеют место бедренные и паховые грыжи, недоразвитие мышц, ухудшение зрения вплоть до отслойки сетчатки, **гетерохромия (разное окрашивание участков радужки)**; подвывих хрусталика, катаракта, косоглазие.

Помимо этого для синдрома Марфана характерны врожденные пороки сердца, аневризма аорты. Отмечаются расстройства органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и мочевыводящей системы. Лечение симптоматическое.

Частота синдрома Марфана в популяции равна 1:15.000. Синдромом Марфана страдали президент США **Авраам Линкольн**, великий итальянский скрипач и композитор **Никколо Паганини**, великий датский писатель **Ганс Христиан Андерсен**, поэт **Корней Чуковский**, террорист **Усама бен Ладен**.

3.4 Системные нарушения развития органов и тканей

1) **Муковисцидоз** обусловлен генной мутацией в 7-ой хромосоме (7q21-q31), приводящей к нарушению транспорта хлоридов через мембраны эпите-

лиальных клеток. Тип наследования – аутосомно-рецессивный. Популяционная частота заболевания – 1:2500.

Это одно из самых распространенных наследственных заболеваний. Муковисцидоз представляет собой *множественные поражения желез внешней секреции*, проявляющиеся выделением *секретов повышенной вязкости*, что ведет к застойным обтурационным изменениям в легких, поджелудочной железе и кишечнике с последующим воспалением и склерозом.

Легочные проявления болезни возникают на 1-2 году жизни, это пневмонии и бронхиты. *Кишечные проявления* связаны с нарушением активности ферментов поджелудочной железы. Гнилостные процессы в кишечнике приводят к вздутию живота, появлению обильного жирного стула с резким гнилостным запахом. Иногда наблюдается кишечная непроходимость.

Диагностика основана на клинической картине и изучении активности ферментов поджелудочной железы.

2) *Ахондроплазия (хондродистрофия)* обусловлена генной мутацией, вызывающей отклонения в активности некоторых ферментов (*5-нуклеотидазы, глюкозо-6-фосфатазы*). Тип наследования аутосомно-доминантный. Популяционная частота 1:100.000. 80% случаев болезни обусловлены *новыми* мутациями. Ген картирован – 4p14-p16.

При ахондроплазии наблюдается *аномальный рост и развитие хрящевой ткани*, чаще всего в эпифизах трубчатых костей и основании черепа, результатом чего является резкое *недоразвитие костей в длину*. Характерными признаками заболевания являются *низкий рост* (120-130 см у взрослых) при сохранении нормальной длины туловища, большой череп *с выступающим затылком*, западающая переносица. Конечности укорочены в основном за счет проксимальных отделов бедренной и плечевой костей, кисти широкие и короткие. Дети отстают в моторном развитии, интеллект, как правило, нормальный.

3) *Миодистрофия Дюшенна* – тяжелое наследственное заболевание с повышенной активностью в плазме крови ряда мышечных ферментов, особенно *креатинкиназы*. Встречается с частотой 1:3500 новорожденных мальчиков. Наследование сцеплено с полом, рецессивное. Ген картирован в области Xp21 и детально изучен.

Характерно раннее, в возрасте 3-5 лет, начало заболевания: нарастающая *слабость в мышцах* бедер и таза с постепенным переходом процесса на икроножные мышцы, мышцы верхнего плечевого пояса, спины, живота и др. Появляется *утиная походка*. Заболевание неуклонно прогрессирует, дети оказываются прикованными к постели с 10-11-летнего возраста.

Наблюдается *псевдогипертрофия* икроножных и ягодичных мышц за счет замещения мышечной ткани соединительной и жировой. Часто развивается *сгибательная мышечная контрактура* суставов конечностей вследствие атрофии мышц.

Несколько снижаются умственные способности. Продолжительность жизни больных 20-35 лет. Смерть обычно наступает от легочной инфекции или сердечной недостаточности из-за дистрофии сердечной мышцы.

4. Мультифакториальные заболевания

Эта группа болезней отличается от генных болезней тем, что для своего проявления нуждается в действии *факторов внешней среды*. Среди них также различают *моногенные*, при которых наследственная предрасположенность обусловлена одним патологически измененным геном, и *полигенные*. Последние определяются многими генами, которые будучи *в нормальном состоянии*, но при определенном взаимодействии между собой и с факторами среды создают предрасположенность к появлению заболевания.

Моногенных заболеваний с наследственным предрасположением немного. К ним относятся наследственно обусловленные *патологические реакции* на действие различных веществ (лекарственных препаратов, пищевых добавок), в основе которых лежит наследственная недостаточность некоторых ферментов. Например, это наследственно обусловленная *непереносимость сульфаниламидных препаратов*, проявляющаяся в гемолизе эритроцитов, повышении температуры при применении общих анестезирующих средств.

Известна *непереносимость* у ряда людей *молочного сахара – лактозы*. Гены непереносимости лактозы широко распространены среди азиатского населения (до 95-100%) и среди американских негров и индейцев (до 70-75%). Ряд лиц не переносит *жирной пищи* и в раннем возрасте страдает атеросклерозом, что повышает риск инфаркта миокарда. У некоторых людей употребление в пищу *сыра и шоколада* провоцирует *мигрень*. Отмечены специфические реакции людей на *алкоголь, консерванты и пищевые красители*.

К болезням с наследственной предрасположенностью, обусловленной *многими* генетическими и внешними факторами, относятся такие заболевания как *сахарный диабет, шизофрения*. Этим заболеваниям присущ *семейный характер*, и участие наследственных факторов в их возникновении не вызывает сомнения.

Нередко предрасположенность к ряду заболеваний наблюдается у людей с *определенным сочетанием нормальных генов*. Так, у людей со *II (A)*

группой крови чаще наблюдается рак желудка и кишечника, матки, яичников и молочной железы. У людей с *I (0) группой крови* чаще встречается язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки.

5. Болезни с нетрадиционным типом наследования

В последние годы стало очевидным, что далеко не все случаи наследственной патологии у человека можно рассматривать как результат менделирующих генных мутаций, хромосомных аномалий или как мультифакториальные заболевания.

В настоящее время описано достаточно много *заболеваний с нетрадиционным типом наследования*. К ним относятся, например, митохондриальные болезни и болезни экспансии тринуклеотидных повторов.

Митохондриальные болезни

В конце 80-х годов XX века получены убедительные доказательства связи некоторых наследственных заболеваний человека с мутациями митохондриальной ДНК.

Например, при определенных *точковых мутациях*, приводящих к замене консервативных аминокислот в *собственных белках митохондрий*, возникает *пигментный ретинит*, при котором наступает *двусторонняя потеря зрения*. Выраженность клинических признаков у больных *коррелирует с количеством мутантной мтДНК*, которое у разных больных может варьировать от 5 до 100% всей мтДНК.

Известны также болезни, вызванные *снижением числа копий мтДНК до 1-2% от нормы*, что приводит к развитию миопатий, нефропатий, печеночной недостаточности и т.д. вследствие ослабления синтеза белков, кодируемых мтДНК.

Изменения в ДНК митохондрий всегда сопровождаются нарушением *клеточного дыхания*. Это и определяет симптоматику митохондриальных болезней.

Болезни экспансии тринуклеотидных повторов

Феномен экспансии числа тринуклеотидных повторов был впервые обнаружен при исследовании *синдрома Мартина – Белла*, или синдрома *фрагильной (ломкой) X- хромосомы*, основным проявлением которого является *умственная отсталость*. Синдром характеризуется широкой распространенностью (1:1000) и необычным характером наследования.

Лишь у 80% мужчин-носителей мутантного локуса имеются клинические и цитогенетические признаки заболевания. 20% мужчин – *носителей* клинически здоровы, их *дочери* тоже здоровы, но от этих дочерей рождаются *больные внуки*.

Такое явление названо *антиципацией* (упреждением), когда имеет место более *тяжелое проявление* заболевания в *последующих поколениях*.

В основе этого явления лежит многократное *увеличение повторов тринуклеотида ЦГГ*. В норме число повторов колеблется от 5 до 50. *Премутация* – неэкспрессируемая форма – характеризуется увеличением числа повторов *до 50-200*. Возрастание числа повторов тринуклеотида ЦГГ *свыше 200* приводит к *клинической манифестации* заболеваний и к цитогенетическому проявлению ломкой X-хромосомы.

Интересно, что переход от состояния премутации к полной мутации происходит в организме матери, в процессе *женского гаметогенеза*, причем *экспансия* ЦГГ-повторов значительно *выше* при передаче *от матери к сыну*, чем от матери к дочери.

Увеличение числа тринуклеотидных повторов и связанное с этим проявление антиципации обнаружено и при других заболеваниях. Например, при аутосомно-доминантном заболевании – *хорее Гентингтона* – также выявляется четкая корреляция между числом *ЦАГ-повторов* и возрастом начала заболевания. Но, в отличие от синдрома ломкой X-хромосомы, в данном случае более тяжелое течение заболевания обнаруживается у *потомков пораженных отцов*, т. е. экспансия числа тринуклеотидных повторов происходит в процессе *мужского гаметогенеза*.

Таким образом, в настоящее время описан новый класс наследственных болезней (около десяти), при которых проявляется *феномен антиципации с материнским* или *отцовским эффектом*.

Лекция № 17

Тема лекции: Генетика рака. Диагностика, профилактика и лечение наследственных болезней

План лекции:

1. Генетика рака
 - 1.1 Признаки злокачественных опухолей
 - 1.2 Причины возникновения опухолей
 - 1.3 Онкогены
 - 1.4 Онкосупрессоры
2. Диагностика наследственных болезней
3. Медико-генетическое консультирование
4. Принципы лечения наследственных заболеваний
5. Генотерапия

1. Генетика рака

1.1 Признаки злокачественных опухолей

Известно *два типа* опухолей. *Доброкачественной* опухоль называется, если она растет очень медленно и не выходит за пределы своей ткани, т.е. не внедряется в подлежащие или соседние ткани.

Доброкачественная опухоль *не содержит кровеносных сосудов*, поэтому из-за недостатка снабжения, хотя клетки непрерывно растут и размножаются, этот процесс уравнивается отмиранием более старых клеток. В итоге опухоль не растет.

Главным признаком *злокачественной* опухоли является ее выход за пределы данной ткани (*инвазия*). Связано это с тем, что в опухоль начинают врастать сосуды. Получая обильное питание, опухоль растет. Если она врастет в подлежащую ткань, происходит инвазия (внедрение) опухолевых клеток через базальную мембрану. *Инвазия* – первый признак злокачественности.

Если опухолевые клетки отрываются от основного очага, разносятся лимфой или кровью по организму, оседают в других, отдаленных органах (чаще всего в лимфатических узлах, печени, легких) и образуют там *вторичные очаги опухолевого роста*, говорят о *метастазировании*, т.е. распространении опухоли по всему организму.

Инвазия и *метастазирование* являются конкретными проявлениями *автономности* опухоли, т. е. ее независимости от окружающих тканей. В нормальном развитии соседствующие ткани влияют друг на друга и никогда не выходят за границы своих территорий. Злокачественные опухоли «не чув-

ствуют» этих влияний. Они инвазируют на чужие территории и способны расти в чуждом окружении. Способность к метастазированию – это способность не столько к отрыву и распространению, сколько именно к росту *на чужих территориях и в чуждом микроокружении*.

Следующим неотъемлемым свойством злокачественной опухоли является *бессмертие ее клеток*. Нормальные клетки смертны, их жизненный цикл включает запрограммированную смерть – *апоптоз*. Будучи высаженными в культуру, они погибают, пройдя определенное число циклов деления. Клетки опухоли не знают предела для размножения ни в организме, ни вне его.

Очень важным и обязательным признаком злокачественной опухоли является ее *моноклональность*. Злокачественная опухоль развивается из одной генетически измененной клетки. В этом смысле она представляет собой *клон*, т.е. потомство генетически однородных клеток, возникших из одной клетки.

В процессе развития опухоли у ее клеток постепенно *исчезают признаки исходной ткани*, т. к. они зачастую являются мишенью для воздействия со стороны организма или соседних тканей. Однако признаки ткани, из которой развилась опухоль, *все же никогда не утрачиваются полностью*. Это важная особенность опухоли, позволяющая точно определить, в каком органе и из каких клеток она возникла и к какому лечению вероятнее всего будет чувствительна.

1.2 Причины возникновения опухолей

Хорошо известны *факторы* (воздействия), которые вызывают опухоли. Это химические, физические и биологические факторы. Однако значительная часть опухолей возникает *спонтанно*, т.е. без видимой связи с индустрирующими агентами.

1. *Химические* факторы. Это *канцерогенные* вещества, весьма разнообразные – от таких простых, как четыреххлористый углерод (CCl_4), до весьма сложных, таких как метилхолантрен или бензантрацен. Чаще всего они вызывают мутации, стимулирующие размножение клеток-предшественниц опухоли.

К канцерогенным веществам примыкают вещества, способствующие росту и делению возникших одиночных опухолевых клеток – это так называемые *промоторы канцерогенеза*. Эти вещества являются чрезвычайно важным компонентом химического канцерогенеза, т. к. одиночные опухолевые клетки, находясь в окружении нормальной ткани, как правило, не могут преодолеть ее сдерживающего влияния и годами способны сохраняться в ла-

тентном состоянии, не проявляясь в виде опухоли. Промоторы снимают это влияние, что внешне выглядит как сильный канцерогенный эффект.

Канцерогенные вещества и промоторы являются причиной многих опухолей человека, например, *каменноугольный деготь* и содержащийся в нем *форболовый эфир* (промотор канцерогенеза) вызывает так называемый «*рак трубочистов*», анилин вызывает у работников красильного производства рак мочевого пузыря, курение – рак легких.

2. **Физические** факторы, или *лучевой канцерогенез*. Это одна из форм канцерогенеза, сопровождавшего первых радиологов, работавших *с радием* и лучами *Рентгена* без какой-либо защиты от облучения. Обычно это был рак кожи. Наиболее частыми при общем облучении организма являются *лейкозы*, т. е. различные формы рака крови.

3. **Биологические** факторы. К ним относятся *опухолеродные вирусы*. Это могут быть ДНК-содержащие вирусы или РНК-содержащие ретровирусы. Все они обладают уникальной способностью к интеграции с геномом клетки-хозяина.

Первый опухолеродный (*онкогенный*) вирус открыл в 1910 г. **Пейтон Раус** у кур, за что был удостоен Нобелевской премии в 1966 г. Инъекции бесклеточного фильтрата из саркомы вызывали новые опухоли. Инфицирующим агентом является РНК-содержащий ретровирус (*вирус саркомы Рауса*), т. е. вирус, на молекуле РНК которого с помощью обратной транскриптазы синтезируется ДНК, которая встраивается в геном клетки-хозяина.

4. **Наследственная предрасположенность** к возникновению рака. Существуют определенные сочетания аллелей, которые способствуют возникновению рака. Существуют определенные сочетания аллелей, которые способствуют возникновению рака под действием первых 3-х факторов. Так, известны *семейные формы* рака.

В некоторых случаях это *результат селекции*. Так, у мышей путем отбора получены *чистые линии* со 100% вероятностью возникновения определенных форм злокачественных образований – лейкозов, рака молочных желез и рака легких. В первых двух случаях имеет место сочетание генотипа животных и вируса, а в случае наследственного рака легких речь идет о сочетании генотипа животного и канцерогенного воздействия.

Непосредственной причиной возникновения опухолей являются мутации генов, контролирующих нормальное протекание клеточного деления.

1.3 Онкогены

Гены, вызывающие рак, были названы *онкогенами*. В 1981 г. был выделен первый онкоген из вируса саркомы кур – *v-src*.

Вирус саркомы Рауса нетипичен для *ретровирусов*, несущих онкогены, поскольку в нем сохраняются все *три гена*, необходимые для жизненного цикла самого вируса: *gag, pol* и *env*. У других онкогенных вирусов один или два этих гена частично или полностью потеряны в обмен на приобретение трансформирующего онкогена. Поэтому частицы онкогенного вируса могут формироваться только в клетке, одновременно инфицированной нормальным *вирусом-помощником*, который компенсирует отсутствующие функции, но не способен вызывать опухоль.

Геномы нормальных клеток позвоночных содержат фрагменты ДНК, которые похожи на ген *src*, входящий в состав вируса саркомы Рауса, но не идентичны ему. Поэтому вирусные и геномные последовательности называются несколько по-разному: *v-src* – *вирусные (онкогены)*, *c-src* – *клеточные (протоонкогены)*. Интроны, которые присутствовали в *c-src*, сплайсированы в *v-src*.

Позднее было найдено свыше 100 вирусных онкогенов (например, *тус, ras* и др.) и соответствующих им протоонкогенов.

Эти гены регулируют *нормальное поведение клетки*: ее ответы на *регулирующие воздействия*: ростовые факторы, гормоны и т. д.

Чтобы клетка начала расти и размножаться, нужны специальные сигналы, вырабатываемые чаще всего другими клетками, а иногда и самой клеткой. Это обычно белковые молекулы, называемые *факторами роста*. Их синтез строго регулируется, но если происходит нарушение регуляции, то факторы могут накапливаться в больших количествах. Они начинают сигнализировать клетке о необходимости расти и делиться. Поэтому гены, кодирующие *факторы роста*, могут выступать *в роли онкогенов*.

Чтобы фактор подействовал, необходим *рецептор* на поверхности клетки-мишени. Когда фактор присоединяется к рецептору, последний *активируется*, например, приобретает способность к *фосфорилированию* определенных белков. В результате каких-то *повреждений рецепторы* могут стать активными даже при отсутствии своего фактора роста и будут *непрерывно передавать сигнал* о необходимости начинать рост. Таким образом, в результате мутации *ген рецептора становится онкогеном*.

Передача сигнала для роста клетки не ограничивается факторами роста и их рецепторами. В передаче такого сигнала участвует много других белков-*посредников*, и сам процесс часто идет путем фосфорилирования одним белком второго, вторым – третьего и т.д. Гены, кодирующие синтез этих *посредников*, могут выступать в роли онкогенов.

В передаче сигнала участвуют также белки – *рецепторы гормонов*, находящиеся в цитоплазме. Их гены тоже могут быть онкогенами.

Цепи передачи сигналов заканчиваются в *клеточном ядре*. Там происходит активация **факторов транскрипции**, т.е. белков, связывающихся с регуляторными участками определенных генов и активирующих их транскрипцию. Под действием факторов транскрипции на соответствующих генах происходит синтез матричных РНК, а на матрице последних – белков. Это те белки, которые нужны для роста и размножения клеток. Таким образом, гены, кодирующие **факторы транскрипции**, также могут стать онкогенами.

Очевидно, вирусы в цикле своего развития осуществляют **захват** вышеперечисленных *генов хозяина* и последние выступают уже в роли вирусных *онкогенов*.

Известны различные пути **активирования** протоонкогенов. Как правило, действие различных канцерогенных факторов приводит к постоянной активности протоонкогена. Так, **хромосомные транслокации** могут перенести протоонкоген в *новое положение* – под контроль постоянно активного промотора. В результате этого переноса протоонкоген начинает работать непрерывно, не давая клетке выйти из цикла делений (*мус*), или посылая непрерывные сигналы с мембраны в ядро (*ras*), или приводя к синтезу ростовых факторов. При *хронической миелогенной лейкемии* происходит транслокация между длинными плечами 9 и 22 хромосом. Ген *bcr* соединяется с геном *abl* тирозиновой протеинкиназы, последняя начинает работать непрерывно (**Филадельфийская транслокация**).

Некоторые опухолевые вирусы *сами по себе не содержат онкогена*, но, встраиваясь в хромосому рядом с протоонкогеном, активируют его, вызывая непрерывную экспрессию, – это **«вставочный»** канцерогенез.

Канцерогены вызывают мутации в различных генах, в том числе и в *протоонкогенах*. Эти мутации могут вести либо к нарушению регуляции протоонкогена, и тогда он выходит из-под контроля, либо к изменению свойств белка, кодируемого этим онкогеном.

1.4 Онкосупрессоры

Наряду с онкогенами существует еще одна важная группа генов-**супрессоров** опухолей, продукты которых не дают клетке превратиться в раковую.

Известно, что один из 20 тыс. детей имеет предрасположенность к **ретинобластOME** – опухоли, возникающей в детстве из предшественников клеток сетчатки глаза. Известны две формы заболевания: *наследственная* и *ненаследственная*. В первом случае *множественные* опухоли обычно воз-

никают независимо *в обоих глазах*. При ненаследственной форме возникает только одна опухоль и только *в одном глазу*.

Предположили, что у больных с наследственной формой утрачена активность гена-супрессора опухолеобразования в одной из хромосом. Поэтому *гетерозиготы* по мутации данного гена являются генетически предрасположенными к раку. Первая же соматическая мутация этого локуса делает данную клетку *гомозиготой* по мутации, и начинает развиваться опухоль. Таким образом, ретинобластома возникает по *двухударному механизму*: одна мутация происходит в генеративных клетках, другая – в соматических.

Этот ген, отсутствие активности которого у человека является критическим фактором в развитии ретинобластомы, называется **Rb**. У детей-гомозигот по нормальному аллелю гена **Rb** опухоль возникает очень редко, только вследствие случайного мутирования этого гена *в обеих хромосомах* одной клетки.

Позднее было установлено, что потеря активности гена **Rb** вызывает и другие формы опухолей, *не только ретинобластоме*.

Ген **Rb** был клонирован в 1986 г., он занимает в геноме 180 тпн и кодирует белок с молекулярной массой 110 кДа. Ген активно функционирует в большинстве нормальных клеток тела, и его продукт действует как один из главных *«тормозов»* деления клетки, её участия *в митотическом цикле*.

Размножаясь, клетки проходят несколько фаз клеточного цикла. Важнейшие фазы – это деление клеток, или митоз (M); фаза, предшествующая синтезу ДНК (G_1); фаза репликации ДНК (S); следующая за ней фаза подготовки к делению (G_2) и снова митоз (M). Кроме того, клетки могут переходить из G_1 не в S, а в фазу G_0 . Переход из одной фазы клеточного цикла в другую – это строго регулируемый процесс.

На определенных этапах клеточного цикла существуют так называемые *«точки проверки»* (*checkpoints*), в которых специальные белки определяют, все ли в клетке в порядке и готова ли она к переходу в следующую фазу цикла. Например, если в клетке повреждена ДНК, сигнал об этом блокирует переход в следующую фазу. Такая система проверок требует большого числа специальных белков.

Разрешение на переход клетки из одной фазы в другую дают белки из семейства *циклинов*. Они связываются со специальными ферментами, фосфорилирующими белки, – *циклин-зависимыми киназами* (**ЦЗК**, или **Cdk**). Только находясь в комплексе с циклинами, **ЦЗК** начинают фосфорилировать свои белки-мишени, а это в свою очередь активирует гены, продукты которых нужны на следующей фазе цикла.

Таким образом, *1-й тип онкосупрессоров* – это гены циклинов или ЦЗК.

Другой тип онкосупрессоров – это гены контроля перехода клетки к *апоптозу*. Примером является ген - супрессор опухолеобразования *p53* (*p – protein*, молекулярная масса 53 кДа). С *мутантными аллелями этого гена*, а их к настоящему времени выделено свыше **3400**, связывают развитие примерно **50 %** всех типов опухолей у человека. Действие гена p53 определяется его участием в контроле событий запрограммированной гибели клеток – *апоптоза*.

К канцерогенезу ведут также мутации в генах, ответственных за *репарацию ДНК*. Это *онкосупрессоры 3-его типа*. Известно несколько наследственных заболеваний, связанных с нарушением систем репарации, например, *пигментная ксеродерма*.

Пигментная ксеродерма – это группа аутосомно-рецессивных заболеваний, для которых типичны фоточувствительность кожи и глаз, пигментация кожи, раннее развитие рака кожи, катаракты, различные неврологические нарушения, включая умственную отсталость. Существует *не менее 4 генов*, вызывающих пигментную ксеродерму, в том числе гены, кодирующие *геликазу* и *эндонуклеазу*. Мутации в этих генах ведут к нарушению *эксцизионной репарации*.

Нарушение репарации ДНК ведет к *повышению частоты мутаций* в делящихся клетках. Эти мутации *могут затрагивать протонкогены*, следствием чего является высокая частота онкологических заболеваний у лиц с указанными синдромами.

И, наконец, существует еще один *уникальный механизм* онкогенеза. Ни одна клетка не может размножаться бесконечно, т. к. существует *физиологический порог размножения*. Обычно такой порог составляет 50-60 клеточных делений, после которых клетка стареет и теряет способность к размножению.

Механизм *старения* клеток был открыт отечественным ученым **А.М. Аловниковым**, который показал, что во время подготовки клетки к митозу, во время S-фазы, когда происходит репликация ДНК, каждая хромосома *укорачивается*, так как репликация не может дойти до конца теломеры. Когда *теломера* укорачивается до критической величины, клетка получает сигнал, что она постарела, и перестает делиться.

В раковой клетке, как предположил А.М. Аловников, синтезируется фермент, который называется *теломеразой*. Теломераза обеспечивает полноту репликации ДНК, и ее теломерный конец не укорачивается. Теломераза практически не присутствует в нормальных клетках, но зато почти всегда

выявляется в раковых клетках. Механизм ее индукции в канцерогенезе все еще остается неясным.

В заключение необходимо отметить, что формирование многих опухолей является **многоступенчатым процессом**, включающим накопление мутаций по ряду генов.

С возрастом вероятность заболеть раком резко возрастает. В течение 2-3 последних десятилетий жизни в клетке происходит накопление 6-7 разных мутаций (в том числе переход каких-то из них в гомозиготную форму, выключение обеих копий гена *p53* и т.д.), чтобы рак развился.

2. Диагностика наследственных болезней

Используются экспресс-методы и методы пренатальной диагностики.

Экспресс-методы – это быстрые предварительные методы диагностики наследственной патологии у человека в постнатальный период.

1) Микробиологический **ингибиторный тест Гатри** позволяет выявлять некоторые биохимические нарушения у новорожденных. Из пятки новорожденного берут каплю крови на **диски** фильтровальной бумаги, которые помещают на агаровую культуру *B. subtilis*. Последнюю выращивают на минимальной питательной среде, содержащей **антиметаболит** искомой аминокислоты (например, фенилаланина). Антиметаболит должен одновременно тормозить рост микробов. При наличии в крови младенца большого количества фенилаланина разрушается антиметаболит, и микробы начинают бурно расти. Меняя антиметаболиты, с помощью этого теста можно диагностировать наличие в крови определенных аминокислот и углеводов (лейцина, гистидина, фруктозы, галатозы и др.).

2) **Химические** экспресс-методы используют простые **цветные реакции** для быстрой предварительной диагностики наследственных болезней обмена веществ. Например, для предварительной диагностики фенилкетонурии новорожденным в пеленки заворачивают полоску **фильтровальной бумаги**, смоченной 10% раствором $FeCl_3$. При наличии в моче фенилпировиноградной кислоты наблюдается зеленое окрашивание фильтровальной бумаги. Для окончательной постановки диагноза используют биохимические методы, дающие более точные результаты.

3) Выявление **X- и Y-полового хроматина**. Для выявления X- и Y-хроматина чаще всего используется соскоб клеток слизистой оболочки щеки (буккальный эпителий) и разные способы окраски.

4) **Дерматоглифический анализ** (см. лекцию №16).

Пренатальная диагностика связана с решением ряда биологических и этических проблем до рождения ребенка, так как при этом речь идет не об

излечении болезни, а об ее предупреждении до формирования клинической картины чаще путем *изгнания плода*.

Показания для пренатальной диагностики:

- 1) в семье точно установлено наследственное заболевание;
- 2) возраст матери старше 35 лет, отца – старше 40 лет;
- 3) наличие в анамнезе женщины спонтанных аборт, мертворождений, детей с пороками развития;
- 4) проживание супругов в зоне повышенного радиационного фона, с тератогенными воздействиями и др.

Методы, применяемые для пренатальной диагностики, делят на *непрямые*, когда объектом исследования является беременная женщина, и *прямые*, когда исследуется сам плод.

К *непрямым* методам относят генеалогические, цитогенетические, биохимические.

Прямые методы исследования плода бывают 2-х типов: неинвазивные и инвазивные. *Неинвазивные* – это ультразвуковые, электрокардиографические и др.

Инвазивные методы предполагают получение материала из самого *плода* для дальнейших генетических исследований. Известно 3 метода.

1) *Хорионбиопсия* – взятие эпителия ворсинок *хориона* для исследования через канал шейки матки под контролем УЗИ между 8-й и 12-й неделями беременности. Полученную ткань используют для цитогенетических и биохимических исследований и анализа ДНК. С помощью этого метода можно выявлять все виды мутаций (генные, хромосомные и геномные).

2) *Амниоцентез* – получение *амниотической жидкости* и клеток плода для последующего анализа. Пункцию проводят в конце первого, начале второго триместра беременности (13-22 недели) через брюшину в амбулаторных условиях под контролем ультразвукового обследования. Стерильным одноразовым шприцем набирают 10-20 мл амниотической жидкости. Жидкость используют для биохимических методов исследования (выявляют генные мутации), а клетки – для цитогенетического анализа, исследования ДНК и выявления X- и Y-хроматина (диагностируют геномные и хромосомные мутации). Осложнения при этом методе исследования не превышают 1%.

3) *Фетоскопия* – осмотр плода фиброоптическим *эндоскопом*, введенным в амниотическую полость через переднюю стенку матки. Метод позволяет осмотреть плод, пуповину, плаценту и произвести биопсию. Метод сопровождается высоким риском прерывания беременности и технически сложен, поэтому имеет ограниченное применение.

3. Медико-генетическое консультирование

Это отрасль профилактической медицины, главной целью которой является предупреждение рождения детей с наследственной патологией. Впервые в мире еще в 30-х годах XX века русский врач и генетик **С.Н. Давиденков** проводил генетическое консультирование и разработал методику консультирования семей с наследственными заболеваниями (1934).

Цель генетической консультации – установление степени генетического **риска** в обследуемой семье и разъяснение супругам в доступной форме медико-генетического заключения.

Под **генетическим риском** понимают вероятность проявления определенной аномалии у самого пациента (пробанда) или его родственников, которая выражается в процентах (от 0 до 100%). Общий риск появления генетически обусловленной аномалии для популяций европейцев составляет 3-5% (генетический груз), поэтому риск, который *не превышает 5%*, расценивается как **низкий**. Генетический риск *до 10%* называют **повышенным в легкой степени**, *до 20%* - **повышенным в средней степени** и *свыше 20%* - **высоким**.

С генетической точки зрения можно пренебречь риском до 10% и не считать его противопоказанием к деторождению даже тогда, когда нет возможности пренатальной диагностики. Генетический риск более 10% расценивается как противопоказание к деторождению, т.е. как показание к прерыванию беременности, если семья не хочет подвергаться риску.

Степень генетического риска далеко не всегда соответствует *степени тяжести ожидаемого страдания*. Например, **полидактилия** (аутосомно-доминантный тип наследования, с высокой степенью генетического риска – не менее 50%) может быть легко устранена хирургической операцией, и человек может вести нормальный образ жизни, в то время как **фенилкетонурия**, риск повторения которой у детей гетерозиготных родителей составляет 25%, представляет собой тяжелое заболевание, плохо поддающееся лечению. Степень страдания во втором случае с точки зрения **медицинских** и **социальных последствий** для больного и его семьи расценивается как тяжелое.

4. Принципы лечения наследственных заболеваний

Можно выделить три подхода к лечению наследственных болезней и болезней с наследственной предрасположенностью: симптоматическое, патогенетическое и этиологическое.

1. **Симптоматическое** лечение применяют при всех наследственных болезнях: при болях – анальгетики, при психических заболеваниях – успокаивающие, при муковисцидозе – вещества, разжижающие слизь, при воспалительных процессах – антибиотики и т.п. При врожденных пороках развития широко применяется хирургическое лечение.

2. **Патогенетическое** лечение в настоящее время интенсивно разрабатывается для болезней обмена веществ, обусловленных генными мутациями. Оно может проводиться по следующим направлениям.

Коррекция обмена: ограничение или исключение неметаболизируемого вещества из пищи (фенилаланина) и освобождение от продуктов обмена путем усиленного их выведения, плазмафереза или гемосорбции (фенилпирувиноградной кислоты).

Метаболическая ингибция применяется в тех случаях, когда надо снизить интенсивность синтеза накапливаемого при наследственной болезни вещества (например, мочевой кислоты при подагре).

Заместительная терапия применяется при отсутствии (или недостаточном уровне) синтеза нормальных ферментов у больного, например, введение тироксина при гипотиреозе, гормона роста при карликовости, инсулина – при диабете, некоторых коферментов и ферментов – при ферментопатиях.

3. **Этиологическое** лечение является оптимальным, поскольку устраняет причину заболевания и радикально его излечивает. Для этиологического лечения применяются методы генотерапии, которая в настоящее время бурно развивается.

5. Генотерапия

Генотерапия – это совокупность методов лечения, основанных на переносе генетического материала в организм человека.

Основных подходов три:

- 1) доставка «нормального» гена в клетку;
- 2) «выключение» мутантного гена;
- 3) «исправление» патологического аллеля.

Методы генной терапии разрабатывались удивительно быстро. Первый **протокол** генной терапии у человека был составлен в 1987 г., а с 1990 г. уже началась генная терапия больных. Осуществление генотерапии возможно *двумя основными путями*: через трансгенез **изолированных** из организма соматических клеток в условиях *in vitro* (*ex vivo*) или через **прямой трансгенез** клеток в организме (*in vivo*).

Трансгенез (перенос генетического материала) *ex vivo* направлен на соматические клетки-мишени, **заранее выделенные** из организма (например, при резекции печени, пункции костного мозга; культура лимфоцитов, культура фибробластов).

Для **введения ДНК** в клетки человека разработаны многие методы: **химические** (обработка фосфатом кальция, диметилсульфоксидом); **физические** (микроинъекции, электропорация, бомбардировка частицами золота); **вирусные** (использование ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов). Многие «невирусные» методы малоэффективны (за исключением электропорации и лазерной микроинъекции). Наиболее эффективными переносчиками ДНК в клетки являются «природные шприцы» – вирусы.

Вирусные векторы более эффективно переносят встроенные в них генетические конструкции в клетки-мишени, при этом **ретровирусные** векторы инфицируют *делящиеся клетки* и *интегрируются* случайным образом в их геном вместе со встроенными генетическими конструкциями, а **аденовирусные** векторы, напротив, трансфицируют *неделяющиеся клетки* и *не встраиваются в их геном*. **Аденоассоциированные** вирусные векторы неслучайным образом встраиваются в *определенный район хромосомы 19*.

Все вирусы, кроме аденоассоциированного вируса, когда их используют в качестве векторов, подвергают генетической модификации, чтобы они утратили *способность к самостоятельной репликации* в клетке-хозяине, но сохранили способность *инфицировать* эти клетки.

Вирусные векторы обладают в большей или меньшей степени выраженным **тропизмом** к определенной ткани, что может быть использовано для направленной доставки генотерапевтической конструкции. Так, аденовирус тропен к эпителию дыхательных путей, вирус герпеса – к нейронам ЦНС.

Известны также «**псевдовирусные**» частицы: пэгилированные липосомы, поликатионы, всевозможные наночастицы. Совершенствование «невирусных» методов будет продолжаться, чтобы со временем полностью исключить введение «лишнего» генетического материала.

Трансгенез считается успешным, если **не менее 5%** всех обработанных клеток приобретут вводимый генетический материал.

Конечная процедура генотерапии *ex vivo* – это **реимплантация** трансгенных клеток. Она может быть **органотропной** (печеночные клетки вводятся через воротную вену) или **эктопической** (клетки костного мозга вводятся через вену).

Прямой трансгенез (in vivo) осуществляется следующим образом. Создается рекомбинантный генетический вектор с заданным геном, необходи-

мым для лечения. Его вводят в организм, после чего в клетках-мишенях происходит трансгенез.

Приведем конкретный пример генотерапии наследственного заболевания у людей.

Недостаточность аденозиндезаминазы. Девочка 4 лет (США) страдала редкой наследственной болезнью – первичным иммунодефицитом (тяжелая комбинированная форма), обусловленным мутацией в гене *аденозиндезаминазы (АДА)*. Все 4 года девочка жила в стерильном боксе. (Пациенты с этим заболеванием не переносят никаких контактов с любой инфекцией из-за тотального *отсутствия иммунитета*).

Лимфоциты больной заранее были отделены от остальных элементов крови, *Т-лимфоциты* стимулированы к росту. Затем в условиях *in vitro* в них был введен *ген АДА* с помощью *ретровирусного вектора*. Приготовленные таким образом «генно-инженерные» лимфоциты были возвращены в кровоток.

Это событие произошло **14 сентября 1990 г.**, и дата считается «днем рождения» реальной генной терапии. Лечение этой больной было успешным. Общее количество лимфоцитов возросло до нормального уровня, а количество АДА-белка в Т-клетках увеличилось **до 25% от нормы**; этого количества оказалось достаточно для лечебного эффекта. В течение 6 месяцев перед очередным курсом лечения число «генно-инженерных» лимфоцитов и АДА-фермента в клетках оставалось постоянным. Из стерильного бокса девочку перевезли домой.

Рак. Необычайно быстрый прогресс в изучении генома человека и методов генной инженерии позволяет развивать генную терапию не только для моногенно наследуемых болезней, но также и для таких мультифакториальных болезней как рак. В настоящее время применяются следующие методические подходы к *генотерапии рака*.

1. **Повышение иммуногенности опухоли** путем вставки цитокиновых генов, генов, кодирующих антигены главного комплекса гистосовместимости и др.

2. Введение **маркирующих генов**, которые могут обеспечивать выявление сохранившихся после операции или разрастающихся опухолей.

3. Целенаправленное **выключение онкогенов** с использованием **антисмысловой РНК**.

Эра генотерапии уже началась, и нет сомнений в том, что наследственные болезни и рак будут побеждены. Это вопрос времени.

Лекция № 18

Тема лекции: Генетические основы селекции

План лекции:

1. Селекция как процесс и как наука
2. Центры происхождения культурных растений и одомашнивания животных
3. Классификация типов скрещивания
4. Родственное скрещивание (инбридинг)
5. Неродственное скрещивание (аутбридинг)
6. Отдаленная гибридизация
7. Гетерозис
8. Искусственный отбор
 - 8.1 Массовый отбор
 - 8.2 Индивидуальный отбор
 - 8.3 Комбинационная селекция
9. Современные методы селекции

1. Селекция как процесс и как наука

Термин «*селекция*» происходит от латинского слова *selectio* – отбор. Говоря о селекции, имеют в виду *два значения* – процесс и науку.

1. *Процесс* – практическая деятельность по созданию сортов растений, пород животных, штаммов полезных микроорганизмов.

2. *Наука селекция* разрабатывает теорию и методы создания сортов растений, пород животных и штаммов полезных микроорганизмов.

Теоретическая база селекции – генетика. Итогом селекционного процесса являются сорт, порода, штамм.

Породой, сортом или *штаммом* называют *популяцию* организмов, искусственно *созданную или отобранную* человеком и стабильно наследующую определенный *комплекс признаков*. Популяция должна быть генотипически и фенотипически *однородной*, т. е. все особи внутри породы, сорта и штамма должны иметь сходные, наследственно закрепленные свойства: продуктивность, определенный комплекс физиологических и морфологических свойств, а также *однотипную реакцию* на факторы внешней среды.

Как наука селекция базируется на учении об *искусственном отборе*, которое разработал **Ч. Дарвин**. Он проанализировал огромный материал по одомашниванию животных и введению в культуру растений и на этой основе создал учение.

По **Н. И. Вавилову**, селекция представляет собой «*эволюцию, направляемую волей человека*».

Одомашнивание – первый этап селекции. Культурные растения и домашние животные произошли от диких предков. Этот процесс называют **одомашниванием**, или **доместикацией**. Он начался примерно 10 тыс. лет назад, с переходом человека к оседлому образу жизни. На самых ранних этапах одомашнивания искусственный отбор был **бессознательным**.

Советский генетик **Д. К. Беляев** предположил, а затем со своими коллегами экспериментально показал, что **отбор по поведению** был одним из важнейших факторов резкого **повышения изменчивости** на начальных этапах одомашнивания животных. Выяснилось, что селекция по поведению (толерантность к человеку) не ограничивается изменением самого поведения. **Параллельно** изменяются многие жизненно важные функции и процессы. Происходит перестройка такой строго стабилизированной системы организма, как **репродуктивная**. Например, у селекционируемых по поведению лисиц наблюдается переход от однократного в году размножения к двукратному, изменяется характер линьки, появляется большое количество морфологических признаков, очень похожих на те, что известны для других одомашненных животных (окраска тела, форма ушей, хвоста и т. д.). **Громадное разнообразие**, закономерно возникающее на первом этапе одомашнивания животных, **послужило основой** для создания пород животных, резко отличающихся как от диких предков, так и друг от друга.

На первых же этапах введения в культуру **злаковых растений** человек отбирал только те, которые были способны сохранить семена в колосе, т. е. **не осыпались**, как это характерно для «дикарей».

Из громадного числа видов лишь очень ограниченное их число введено в культуру и одомашнено. Из **250 тыс.** видов **высших растений** человек использует для своих целей порядка **3 тыс.** видов и только **150** видов ввел в культуру, причем некоторые из них совсем недавно. Так, сахарную свеклу стали возделывать только в XIX в., а мяту – в XX в. Из многих **тысяч видов позвоночных животных** человек одомашнил только около **20 видов**.

2. Центры происхождения культурных растений и одомашнивания животных

Важнейший раздел селекции как науки – учение *об исходном материале*. Фактически он разработан выдающимся советским генетиком и селекционером **Н. И. Вавиловым** и подробно изложен в его работе «Центры происхождения культурных растений».

Любая селекционная программа начинается с подбора исходного материала. Решая проблему исходного материала, Н. И. Вавилов обследовал земной шар и выявил территории с **наибольшим генетическим разнообразием** культивируемых растений и их диких сородичей. В результате было найдено

8 районов с максимальным генетическим разнообразием растений, которые Н. И. Вавилов считал центрами их происхождения.

У **картофеля** максимум генетического разнообразия связан с **Южной Америкой**, у **кукурузы** – с **Центральной Америкой**, у **ячменя** – с **Африкой** (**Абиссинский центр**).

Индийский очаг – родина **риса**, цитрусовых; **среднеазиатский** – родина **мягкой пшеницы, гороха, бобов** и других культур; **китайский** – родина многих злаков и бобовых (**просо, гречиха, соя**). **Переднеазиатский** очаг включает большое разнообразие видов пшениц и форм **ржи**; здесь находится мировой потенциал **плодоводства**. Многие овощи (**капуста** и др.) были введены в культуру в **Средиземноморье**.

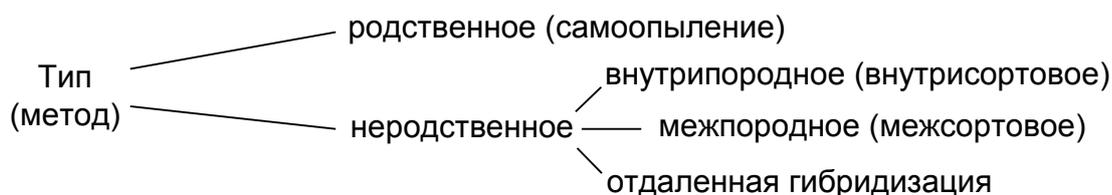
Наряду с открытием мировых центров происхождения культурных растений Н. И. Вавилов и его сотрудники собрали некогда самую крупную в мире **коллекцию растений** в ленинградском ВИРе (около **300 тыс.** единиц хранения), которая используется до настоящего времени в качестве исходного материала для селекции новых сортов в нашей стране.

Центры происхождения **животных** – это **места древних цивилизаций**. В **индонезийско-индокитайском центре** впервые, по-видимому, были одомашнены **собака, свинья, куры, гуси, утки**. Причем собака, большинство пород которой происходит от волка, – одно из наиболее древних домашних животных.

В **Передней Азии**, как полагают, были одомашнены **овцы**, их предок – дикий баран **муфлон**. В **Малой Азии** одомашнены **козы**. Одомашнивание **тура**, ныне исчезнувшего вида, произошло, вероятно, в нескольких областях **Евразии**. В результате возникли многочисленные породы крупного рогатого скота. Предки домашней **лошади** – **тарпаны**, также исчезнувшие, были одомашнены в степях **Причерноморья**.

3. Классификация типов скрещивания и методов разведения

В селекции применяют следующие типы скрещиваний:



Прежде всего следует выделить **родственное скрещивание**, или **инбридинг** (в животноводстве), и самоопыление, или **инциухт** (в растениеводстве). Однако во избежание путаницы можно пользоваться одним термином – инбридинг.

Неродственное скрещивание (аутбридинг) делится на *внутрипородное*, или внутрисортное, *межпородное*, или межсортное, и *отдаленную гибридизацию*.

Применение той или иной системы скрещивания зависит от характера исходного материала, и стоящей перед селекционером задачи.

4. Родственное скрещивание (инбридинг)

Родственным скрещиванием (или разведением в животноводстве) называют скрещивание особей, имеющих *близкую степень родства*: брат – сестра, отец – дочь, мать – сын, двоюродные братья и сестры и т. д. У растений наиболее тесная форма инбридинга осуществляется при самоопылении.

При самоопылении гетерозиготных растений с каждым поколением в популяции увеличивается доля гомозигот. Этот процесс падения частоты гетерозигот описывается формулой $(1/2)^n$, где n – число поколений самоопыления. Для шестого поколения самоопыления доля гетерозигот составит $(1/2)^6$, или $1/64$.

Депрессия при инбридинге. Поскольку животные и растения несут в гетерозиготном состоянии вредные рецессивные мутации, то естественно, что при инбридинге, вызывающем гомозиготизацию, часто происходит *депрессия* – *понижение жизнеспособности*, урожайности, устойчивости к заболеваниям и т. п. Доказательством этому могут служить данные Д. Джонса (1924 г.) по влиянию инбридинга в течение 15 поколений на урожайность зерна и высоту растений у кукурузы. Приведенные по двум линиям данные показывают, что исходные формы фенотипически были одинаковы. Применение принудительного самоопыления в обеих линиях привело к одинаковому снижению урожайности и высоты растений. При этом в одной из линий депрессия наступила *скорее*, чем в другой.

В опыте Джонса с кукурузой средняя жизнеспособность уменьшается от поколения к поколению, пока не будет достигнут *инбредный минимум*. При достижении этой стадии, обычно в результате инбридинга на протяжении *примерно 10 поколений*, жизнеспособность падает до самого низкого уровня, поэтому продолжение инбридинга *не вызывает дальнейшего ухудшения*.

При изучении растений, выживших ко времени достижения инбредного минимума, обнаруживается, что разные линии угнетены в различной степени и сильно отличаются одна от другой по плодовитости и внешним признакам. Следовательно, инбридинг вызывает *дифференциацию* исходной популяции. Материал, достигший инбредного минимума, состоит из ряда различных *константных линий*. Причина дифференциации и константности инбред-

ных линий, так же как и чистых линий у самоопыляющихся растений, одна и та же – **гомозиготность**.

Опыты по *инбридингу* в большом масштабе проводили также на *животных* – крысах, морских свинках, дрозофиле. Поскольку у животных возможность самооплодотворения исключена, то наиболее эффективным является скрещивание братьев и сестер, так называемое **спаривание сибсов**. Если спаривание сибсов повторяется на протяжении нескольких поколений, то оно постепенно приводит к инбредному минимуму такого же типа, как и у растений. Но при спаривании сибсов для получения полной гомозиготности необходимо большее число поколений, чем при самоопылении.

У *человека* супружеские отношения между родителями и детьми или между братьями и сестрами называются **кровосмешением**, или **инцестом**. Для здоровья потомства инбридинг, как правило, крайне вреден (одно из немногих исключений - **Клеопатра VII**), поэтому в большинстве религий и у многих этносов существует запрет на подобные браки.

Однако известно, что в природе существуют виды, для которых самооплодотворение является нормой, и при этом они не только не вымирают, а, наоборот, процветают. Сюда относится ячмень, пшеница, горох, фасоль, овес, табак и др.

*Каким же образом можно объяснить тот факт, что инбридинг может быть и полезным, и вредным? В процессе инбридинга депрессию вызывают переходящие в гомозиготное состояние мутантные гены, понижающие жизнеспособность организмов или имеющие летальный эффект. Но среди мутаций могут быть не только вредные, понижающие жизнеспособность, но и повышающие ее. Отсюда следует, что не всегда при близкородственном размножении животных или растений может наступать депрессия. Напротив, могут быть выделены линии с повышенной жизнеспособностью и продуктивностью. Так, в опытах **Е. Кинга на крысах** при тесном инбридинге в течение **25 поколений** в одной из линий наблюдалось **повышение жизнеспособности и плодовитости животных**.*

Естественный отбор в природе и искусственный – в селекции способствуют при инбридинге **выделению линий с комплексами признаков, обеспечивающих высокую жизнеспособность**.

Очевидно, в ходе эволюции растений-самоопылителей и происходил такой процесс выделения и сохранения генотипов с наиболее благоприятным сочетанием генов. В селекции этот процесс чрезвычайно труден, так как число вредных рецессивных мутаций значительно превышает число полезных. Итак, вреден не сам по себе инбридинг, а последствия гомозиготизации вредных мутаций.

В чем состоит *практическое значение* инбридинга?

Популяция гетерозиготных организмов с помощью инбридинга может быть *разложена* на генетически различающиеся линии. Инбридинг позволяет *выделить* из популяции группы организмов с отдельными, необходимыми для селекции свойствами. При инбридинге в каждой линии увеличивается число гомозигот. Поэтому особи внутри линий оказываются *более однородны* по генотипу и надежнее передают свои свойства потомству.

5. Неродственное скрещивание (аутбридинг)

Скрещивание неродственных организмов называют *аутбридингом*. При этом могут скрещиваться организмы, принадлежащие к одной и той же породе или сорту (внутрипородное или внутрисортное скрещивание), к разным породам или сортам (межпородное или межсортное скрещивание) или к разным видам, родам (отдаленная гибридизация).

При скрещивании неродственных особей *вредные рецессивные мутации*, находящиеся в гомозиготном состоянии, перейдут в *гетерозиготное состояние* и не будут оказывать влияние на жизнеспособность гибридного организма. Действительно, весь опыт практики сельского хозяйства показывает, что при скрещивании неродственных организмов внутри одного и того же вида *гибриды первого поколения* часто оказываются *более жизнеспособными и устойчивыми* к заболеваниям, имеют *повышенную плодовитость*.

Неродственное скрещивание служит важным методом селекции и разведения. Путем этого скрещивания производят *объединение* разных наследственных свойств в одном гибридном организме. С его помощью *комбинируют* различные ценные признаки для создания новой породы или сорта.

6. Отдаленная гибридизация

Отдаленной гибридизацией называют скрещивание форм, относящихся к разным видам и родам.

Отдаленная гибридизация, как правило, *осуществляется с трудом*. Причины этого связаны с наличием механизмов вторичной (репродуктивной) *изоляции* – презиготических и постзиготических.

Методы преодоления нескрещиваемости. Для преодоления барьера нескрещиваемости растений **И. В. Мичурин** разработал **несколько методов**: предварительные прививки в целях вегетативного сближения тканей, метод посредника, опыление смесью пыльцы.

Предварительная прививка одного вида растений на другой, изменяя химический состав тканей, в том числе и генеративных органов, может спо-

способствовать скрещиваемости видов, так как в этом случае увеличивается вероятность прорастания пыльцевых трубок в пестике материнского растения.

Например, Мичурин прививал *черенки рябины в крону* взрослого дерева *груши*. При цветении привоя пыльцу груши наносили на кастрированные цветки рябины и, наоборот, *пыльцу рябины на цветки груши*. Подобным методом удается получить гибриды между обычно не скрещиваемыми видами.

Суть *метода посредника* состоит в том, чтобы преодолеть нескрещиваемость двух видов с помощью *третьего вида*. Мичурин намеревался создать *персик*, который мог бы выращиваться в средней полосе России. Для этого он попытался провести гибридизацию *персика* с холодоустойчивым *монгольским миндалем бобовником*, однако это не удалось. Тогда он скрестил *монгольский миндаль* с полукультурным *персиком Давида*. Полученный гибрид был назван *посредником*. Затем гибридные растения скрещивались с персиком.

Смесь пыльцы разных сортов и видов растений также может способствовать скрещиваемости видов, поскольку *пыльцевые трубки* с различными генотипами могут взаимно *стимулировать друг друга*, создавая в пестике условия, благоприятствующие росту трубок.

Стерильность отдаленных гибридов. Существенным препятствием применению отдаленной гибридизации в селекции является обычная для гибридов *стерильность*, которая может быть следствием *нарушения конъюгации хромосом в мейозе*, результатом чего является образование *гамет с несбалансированным набором хромосом*.

У растений для преодоления стерильности отдаленных гибридов используется метод получения *амфидиплоидов*, который разработал Г. Д. Карпеченко в 1927 г.

У отдаленных гибридов животных часто один пол бывает фертильным, а другой стерильным. Например, у *гибридов яка (Phoephagus grunniens)* с *крупным рогатым скотом (Bos taurus)* самки плодовиты, а самцы бесплодны. В этом случае можно применять *возвратное скрещивание* гибридных самок с одним из исходных видов.

Наибольшее значение отдаленная гибридизация получила в селекции растений, и прежде всего *вегетативно размножаемых*. Как правило, генотипы *диких видов* при скрещивании их с культурными формами привносят в гибриды первого поколения *иммунность и устойчивость* к различного рода заболеваниям, суровым условиям жизни. Соответствующие гены *дикого типа* в большинстве своем *доминантны*.

Отдаленную гибридизацию применяли для селекции зерновых культур **Н. В. Цицин** (создал гибрид озимой *пшеницы с пыреем*, 70 ц/га, неполегающий), **В. Е. Писарев** (амфидиплоид пшеницы и ржи - *тритикале*) и другие генетики и селекционеры.

Примеры отдаленной гибридизации у *животных*: гибридизация *тонкорунных овец* с диким бараном *архаром*. В результате многолетней селекции **Н. Н. Бутариным** в 30-е годы была создана тонкорунная порода *архаро-меринос*, приспособленная к *высокогорным пастбищным условиям*.

В США на основе скрещивания *крупного рогатого скота* с зебу была создана порода *санта-гертруда* с выдающимися *мясными качествами*, приспособленная к пастбищному содержанию в *засушливых районах*.

7. Гетерозис

Гетерозис, или *гибридная сила* – это явление превосходства гибридов 1-го поколения по сравнению с исходными родительскими формами. Оно проявляется по многим признакам при скрещивании разных видов, рас, пород животных и сортов растений, а также инбредных линий.

Термин «*гетерозис*» ввел в 1914 г. американский генетик и кукурузовод **Дж. Шелл**. Хотя эффект гетерозиса известен с древнейших времен, его природа до начала XX в. была неясна. Глубокий научный анализ явления гетерозиса стал возможен только после открытия основных генетических закономерностей.

Межлинейные гибриды кукурузы. В начале XX века **Дж. Шелл** показал, что при скрещивании некоторых инбредных линий кукурузы получают гибридные растения, более урожайные по зерну и вегетативной массе, чем исходные линии и сорта.

Сейчас посев гибридными семенами стал *основным приемом производства кукурузы*. Для получения гибридных семян сначала создают большое количество *инбредных линий* из лучших сортов, отвечающих требованиям данного климатического района. Инбредная линия создается *в течение 5 – 7 лет путем самоопыления*. При отборе линий оцениваются качества, которые необходимо получить у будущего гибридного потомства. Значительная часть линий (*около 99%*) *бракуется* из-за тех или иных отрицательных свойств.

Далее получают *межлинейные гибриды* первого поколения и оценивают их по эффекту гетерозиса, отбирают линии, дающие лучшие комбинации, и затем размножают их в больших масштабах для *производства гибридных семян*. Чтобы найти *пару* линий, дающих при скрещивании *высокий эф-*

фект гетерозиса, необходимо проверить **несколько тысяч** гибридных комбинаций.

При получении *гибридных семян* для производственных целей *исходные линии*, дающие при скрещивании наибольший эффект гетерозиса, высевают **рядами**, чередуя *материнские и отцовские формы*. Для обеспечения опыления между ними разработана схема производства гибридных семян с использованием **цитоплазматической мужской стерильности**, что позволило значительно сократить затраты труда на *удаление метелок* с растений материнской линии. Так получают **простые межлинейные гибриды** кукурузы.

В настоящее время в практике сельского хозяйства простые межлинейные гибриды кукурузы не используются, так как затраты на получение таких семян не окупаются. Теперь широко используют семена **двойных межлинейных гибридов**. Последние получают путем *скрещивания двух простых гибридов*, проявляющих гетерозис.

Тройные и двойные гибриды получают в два этапа: 1) получение простого гибрида; 2) использование простого *гибрида* в качестве материнской формы для тройного или двойного, в качестве отцовских форм которых выступают *линия* и простой *гибрид* соответственно.

О наличии *гетерозиса* *следует говорить лишь в том случае*, когда межлинейный гибрид **превосходит** не только *исходные линии*, но и *сорта или породы*, от которых произошли эти линии.

Применение цитоплазматической мужской стерильности. Возникает вопрос, как получить гибридные семена, например, у кукурузы, сахарной свеклы, риса, томатов, если в пределах одного растения или даже одного цветка расположены женские и мужские элементы системы размножения и всегда присутствует возможность самоопыления. В этих случаях избежать процесса самоопыления можно только двумя путями: на материнских формах удалить вручную мужские элементы цветка, продуцирующие пыльцу; *сделать мужские соцветия стерильными*. Этот путь очень трудоемок, поэтому генетики начали поиск систем, определяющих мужскую стерильность растений.

В 1929 г. ученик Н. И. Вавилова отечественный селекционер и генетик **Михаил Иванович Хаджинов** нашел в посевах кукурузы растения с мужской стерильностью, которые ничем не отличались от нормальных, только были полностью стерильными, т. е. не продуцировали пыльцу. Это явление – *цитоплазматическая мужская стерильность* (ЦМС) – было изучено и широко использовано для получения гибридных семян у кукурузы, а затем и у многих других видов.

Схему использования ЦМС в селекции разработал в 30-х годах **М. Родс**. Было установлено, что только взаимодействие генов плазмиды (фенотип цитоплазмы S) и рецессивных генов ядра (rf) обуславливает мужскую стерильность.

При использовании гетерозиса у растений организовано семеноводство в специальных хозяйствах, где получают только семена первого поколения и продают их хозяйствам, фермерам и т. д. Так как урожайность гетерозисных гибридов значительно (на 20-30%) выше исходных сортов, то затраты на семеноводство гибридных семян с лихвой окупаются. Внедрение гетерозисных гибридов кукурузы, по оценке американских специалистов, принесло чистый доход в сотни миллиардов долларов. Гетерозис используется также при выращивании сахарной свеклы, риса, томатов и других видов.

Аналогичным образом получают гибриды и у животных. В настоящее время в *птицеводстве* и в *свиноводстве* широко используется скрещивание инбредных линий, происходящих из одной или разных пород.

8. Искусственный отбор

В селекции выделяют два основных типа отбора – *массовый отбор* и *индивидуальный отбор*.

8.1. Массовый отбор

Массовый отбор проводится по внешним, фенотипическим признакам в популяциях растений и животных. Например, перед нами *поле люцерны*, на котором произрастает 1000 растений. Внимательно обследовав каждое растение с учетом продуктивности по семенам и зеленой массе при уборке, мы отобрали 50 лучших по всем показателям.

Объединив семена этих отобранных 50 растений, на следующий год закладываем новое поле, на котором ожидаем получить улучшенную по продуктивности и другим признакам популяцию люцерны – этого замечательного высокобелкового кормового растения.

Если мы добились улучшения, то можем считать, что *массовый отбор по внешним признакам* был эффективен. Однако этот тип отбора имеет существенные недостатки, так как мы не всегда по внешним признакам можем определить лучший генотип.

8.2. Индивидуальный отбор

По-настоящему революционным этапом в развитии селекции было открытие и введение в процесс создания сортов растений и пород животных

индивидуального отбора. Это произошло в середине XIX в., когда знаменитый французский селекционер **Ж. Вильморен** изложил основные принципы этого типа отбора, главным из которых была оценка отбираемых растений или животных *по потомству*.

Вернемся к тому же примеру с полем люцерны. Отобрав из тысячи 50 лучших по внешним признакам растений, в случае индивидуального отбора мы не станем объединять их семена, а посеём в следующем году семена каждого из 50 растений отдельно и тем самым оценим по всем признакам *каждое* из отобранных растений *по потомству*. Таким образом оценивают генотип отобранного растения, а не только его фенотипические показатели. Если каждое отобранное из популяции по выдающимся показателям растение или животное *сохраняет* свои показатели и в потомстве, индивидуальный отбор продолжается и в последующих поколениях.

Преимущество индивидуального отбора над массовым заключается в точности оценки *генотипа* при анализе индивидуальных потомков. *Массовый отбор* может быть эффективен, когда особи выделяются *по качественным*, просто наследуемым признакам (белый или красный цветок, рогатое или безрогое животное). Но при отборе особей *по количественным признакам*, сложно наследуемым (количество зерен в колосе пшеницы, жирность молока коровы), где нужна предельно точная оценка генотипа, как показала практика, наиболее эффективен *индивидуальный отбор*.

8.3. Комбинационная селекция

Использование индивидуального отбора открыло эру комбинационной селекции, где основным элементом является *скрещивание* форм растений и животных, отличающихся по отдельным признакам или по их комплексам.

Вслед за этим в расщепляющейся гибридной популяции в течение ряда поколений идет *индивидуальный отбор* рекомбинантных гомозиготных форм с новыми сочетаниями генов, возникших в процессе скрещивания разных форм и перекомбинирования их генов в процессе мейоза.

Осознание и определение целей комбинационной селекции стало возможным только после переоткрытия законов Г. Менделя и разработки хромосомной теории наследственности Т. Моргана.

Рассмотрим упрощенную *схему комбинационной селекции* для самоопыляющихся растений, например, для пшеницы (см. табл.).

Таблица - Схема комбинационной селекции для пшеницы

Первый этап – скрещивание между собой двух форм	P - родители
Получение гибридов первого поколения	F₁ – гибриды первого поколения
Второй этап – самоопыление и оценка потомства от гибридов первого поколения, повторяющаяся со второго до восьмого поколения	F₂ – потомство гибридов второго поколения F₈ – потомство гибридов третьего поколения
Третий этап – отбор лучших потомков, их оценка и испытания на урожай и другие признаки	F_g – лучшие потомки
Заключительный этап – лучшее потомство становится новым сортом	

Почему ведется отбор до восьмого поколения? При самоопылении к **8-му поколению** достигается почти **100%-ный уровень гомозиготности**. Конечная цель отбора во многих селекционных программах – получение максимально гомозиготных форм. Все этапы селекционного процесса, вплоть до создания сорта, занимают **более 10 лет**. Это длительная и трудоемкая работа, далеко не всегда заканчивающаяся успехом.

Для того, чтобы новый сорт растений стал достоянием практики, он должен пройти **государственные испытания**. Для сравнения в эти испытания берутся лучшие уже используемые сорта, породы, штаммы, и если вновь созданные значительно превышают существующие стандарты, то только после этого принимается решение об их внедрении в практику. Они получают названия или номера, селекционерам выдаются авторские свидетельства. На этом селекционный процесс заканчивается.

9. Современные методы селекции

Наибольшее применение эти методы получили в селекции растений.

- 1. Генная инженерия.** Под генной инженерией обычно понимают создание *in vitro* генетических конструкций с заданным набором генов и перенос их от одного вида живых организмов (бактерий, животных, растений) в другой вид, часто очень далекий по своему происхождению.

2. Вторым относительно новым методом клеточной селекции у растений, уже давшим огромный эффект, является **метод гаплоидов**. Напомним, что гаплоидами называются организмы с уменьшенным вдвое числом хромосом, у которых в ядрах клеток из каждой пары гомологичных хромосом, присутствует только одна хромосома. Например, если у кукурузы диплоидные растения имеют 20 хромосом, то гаплоидные – всего 10 хромосом. Гаметы, в том числе и мужские (пыльцевые зерна), имеют гаплоидный набор хромосом. Этот факт и был использован для получения гибридных растений.

Сейчас разработана методика **проращивания пыльцевых зерен** на искусственных питательных средах в пробирках и получения из них полноценных гаплоидных растений. Какое это имеет отношение к селекции? При классической селекции получают гибриды, а затем проводят гомозиготизацию до восьмого поколения для получения стабильных нерасщепляющихся форм. На создание сорта таким методом уходит более **10 лет**. С помощью гаплоидов этот **срок можно сократить в 2-3 раза**. Для этого получают гибриды, берут из них пыльцу, на питательных средах в пробирках регенерируют из нее гаплоидные растения, а затем удваивают в них число хромосом и сразу получают полностью гомозиготные диплоидные растения. Вся эта процедура занимает 2 – 3 года.

Остается только оценить полученные диплоидные растения и затем размножить лучшие.

3. **Хромосомная инженерия** связана с замещением (заменой) отдельных хромосом у растений или добавлением новых.

Используется методика **замены** отдельных хромосом одного вида (например, пшеницы) на хромосомы другого вида, близкого по своему происхождению (например, ржи). В научной литературе принято вместо слов «замена хромосом» употреблять «замещение хромосом». Поэтому полученные таким путем формы называются **замещенными линиями**.

Другой методический прием состоит во введении (внедрении) в геном определенного вида или сорта какой-либо **дополнительной** пары хромосом другого вида растений, которые определяют развитие признака, отсутствующего у первого вида. Если такое введение пары дополнительных хромосом удастся осуществить, то полученные формы называют **дополненными линиями**.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пос.- Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2010.
2. Биология: Учеб.: в 2 кн. / Под ред. В.Н. Ярыгина.- М.: Высш. шк., 2011
3. Генетика. Учебник для вузов / Под ред. академика РАМН В.И.Иванова. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006.
4. Клаг У.С., Каммингс М.Р. Основы генетики. М.: Техносфера, 2007.
5. Заяц, Р.Г. Общая и медицинская генетика. Лекции и задачи / Р.Г. Заяц, В.Э. Бутвиловский, И.В. Рачковская, В.В. Давыдов. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2002. – 320 с.
6. Рувинский, А.О. Общая биология /А.О. Рувинский, Л.В. Высоцкая, С.М. Глаголев и др. – М.: Просвещение, 1993. – 544 с.
7. Ридли, М. Геном: автобиография вида в 23 главах / М.Ридли. – М.: Эксмо, 2008.