

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)



Кафедра биологии с курсом медицинской генетики

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ
ЗАНЯТИЙ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

КРАСНОДАР-2020 г

ОГЛАВЛЕНИЕ:

| | |
|---|----|
| 1. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ. ОСНОВЫ МИКРОСКОПИИ И ХРОМАТОГРАФИИ. ЭЛЕКТРОННОЕ СТРОЕНИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ И ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТОК (РАСТИТЕЛЬНАЯ И ЖИВОТНАЯ КЛЕТКИ)..... | 4 |
| 2. АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ. ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ, ВТОРИЧНОЙ, ТРЕТИЧНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ..... | 6 |
| 3. ОСОБЕННОСТИ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ОЛИГОМЕРНЫХ СОСТОЯНИЯХ БЕЛКОВ, НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВЫХ И ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСАХ..... | 7 |
| 4. ФИЗИКО – ХИМИЧЕСКИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК. ПОЛИМОРФИЗМ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ И РАЗНООБРАЗИЕ ФОРМ ДНК..... | 9 |
| 5. ВИДЫ РНК. ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТРОЕНИЯ ДВУТЯЖЕВЫХ И ОДНОТЯЖЕВЫХ РНК..... | 10 |
| 6. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ТРНК, РРНК, МРНК..... | 11 |
| 7. ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА С КЛЕТКОЙ - ХОЗЯИНОМ. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ..... | 12 |

| | |
|--|----|
| 8. СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЛАЗМИД. ПОНЯТИЕ О ТРАНСПОЗОНАХ И IS – ЭЛЕМЕНТАХ..... | 14 |
| 9. МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БАКТЕРИЙ. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ..... | 15 |
| 10. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ. МИНИ И МИКРО САТЕЛЛИТЫ. ОНКОГЕНЫ И АНТИОНКОГЕНЫ..... | 19 |
| 11. ПОДВИЖНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ПРОКАРИОТ..... | 22 |
| 12. МЕХАНИЗМ И ЭТАПЫ РЕПЛИКАЦИИ ХРОМОСОМ У ПРОКАРИОТ | 26 |
| 13. МЕХАНИЗМ И ЭТАПЫ РЕПЛИКАЦИИ ХРОМОСОМ У ЭУКАРИОТ.. | 29 |
| 14. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ У ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ..... | 32 |
| 15. ЭТАПЫ И РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ..... | 35 |
| 16. РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ТРАНСЛЯЦИИ..... | 40 |
| 17. РЕПАРАЦИЯ ДНК И АПОПОТОЗ. ИТОГОВЫЙ КОНТРОЛЬ..... | 42 |
| 18. РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА..... | 47 |

ЗАНЯТИЕ 1.

Тема практического занятия: «Методы молекулярной биологии. Основы микроскопии и хроматографии. Электронное строение прокариотической и эукариотической клеток (растительная и животная клетки)»

Учебно - целевые вопросы:

1. Определение предмета "молекулярная биология". Этапы развития. Основные открытия.
2. Современные инструменты молекулярной биологии.
3. Дайте определение хроматографии. Перечислите методы хроматографии, их особенности и преимущества.
4. Виды микроскопии, их характеристика. Устройство биологического исследовательского светового микроскопа. Понятие о разрешающей способности микроскопа.
5. Строение прокариотической и эукариотической клеток, их сходства и различия.

Ключевые слова/ Глоссарий:

Молекулярная биология - раздел биологии, изучающий структуры и процессы, свойственные живым организмам, на уровне молекул.

Органеллы - части тела одноклеточных организмов, выполняющие различные функции.

Прокариоты — микроорганизмы без оформленного ядра и митохондрий, хромосома которых, содержащая генетическую информацию, находится в цитоплазме клетки

Световой микроскоп – оптический прибор, позволяющий получить увеличенное изображение трудноразличимых невооруженным глазом или вообще невидимых объектов

Хроматография - метод разделения смесей веществ, основанный на их многократном перераспределении между двумя контактирующими фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направление движения.

Эукариоты — организмы с оформленным ядром и с более сложной, чем у прокариот, организационной структурой клетки

Аннотация к занятию: Как научное направление, молекулярная биология сформировалась на стыке биохимии и генетики. Данная область науки исследует проявления жизни на неживых структурах или системах с элементарными признаками жизнедеятельности, изучая, каким образом ключевые процессы, характеризующие живую материю, реализуются посредством химических взаимодействий и превращений. Предметом молекулярной биологии являются в основном изучение структуры белков, нуклеиновых кислот и молекулярных комплексов, а также процессы, в которых они участвуют. Все живые организмы по типу составляющих их клеток можно разделить на эукариот и прокариот. У первых геномная ДНК окружена ядерной оболочкой, в то время как у вторых отчетливо выраженное ядро отсутствует. От эукариотических клеток прокариоты отличаются, кроме того, отсутствием митохондрий и хлоропластов, меньшими размерами рибосом, а также весьма ограниченной способностью выделять и поглощать

крупные молекулы. Для проведения исследований в молекулярной биологии широко используют физико-химические методы и биологические эксперименты. Применяют различные виды хроматографии, ультрацентрифугирование, рентгеноструктурный анализ, электронную микроскопию, ЯМР и изотопные индикаторы, синхротронное излучение, дифракцию нейтронов, лазерную технику. В экспериментах широко применяют модельные системы "in vitro" и мутагены.

ЗАНЯТИЕ 2.

Тема практического занятия: «Аминокислотный состав белков. Особенности первичной, вторичной, третичной организации белковой молекулы»

Учебно – целевые вопросы:

1. Определение, классификация и функция белков.
2. Структурная организация белков.
3. Понятие фолдинга, понятие и функции шаперонов.
4. Особенности первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры.
5. Белки и ферменты в промышленности и медицине.
6. Методы исследования аминокислот и белков.

Ключевые слова/Глоссарий:

Гистоны - эволюционно консервативные белки эукариот, участвуют в формировании нуклеосомы.

Гликопротеины - сложные белки, содержащие углеводы.

Глюкогенные аминокислоты - аминокислоты, углеродные скелеты которых метаболизируются до продуктов, способных преобразовываться в глюкозу.

Домены - функционально и стерически обособленные глобулярные участки молекулы белка.

Изоферменты (изозимы) – каталитически сходные формы фермента, различающиеся по своим физико-химическим свойствам.

Конформация белка - высокоупорядоченная пространственная структура, которая способствует выполнению специфических биологических функций.

Нуклеосома - основная структурная единица хроматина.

Протеиногенные аминокислоты - двадцать аминокислот, участвующих в формировании пептидов.

Аннотация к занятию: Белки являются высокомолекулярными органическими соединениями, состоящими из остатков аминокислот. Широкий диапазон выполняемых ими функций напрямую зависит от химической структуры и пространственной формы. При этом, основой белков являются именно α -аминокислоты, общим признаком которых является наличие аминогруппы и карбоксильной группы у α -углеродного атома. Белковая молекула имеет первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуру. Под первичной понимают структуру белка, в виде линейной последовательности аминокислотных остатков, характеризующаяся определенной последовательностью расположения аминокислот в полипептидной цепи. А вторичная, третичная и четвертичная структура обозначают различные уровни организации этой линейной последовательности в пространстве. Функциональные свойства белков определяются их конформацией. Именно уникальность конформации для каждого белка определяется его первичной структурой.

ЗАНЯТИЕ 3.

Тема практического занятия: «Особенности четвертичной структуры белков. Представление об олигомерных состояниях белков, надмолекулярных белковых и ферментных комплексах»

Учебно – целевые вопросы:

1. Особенности четвертичной структуры белков
2. Типы стабилизирующих связей. Олигомерные белки.
3. Понятие о надмолекулярных и ферментативных комплексах
4. Понятие о метаболонах, основная характеристика.

Ключевые слова/ Глоссарий:

Апофермент - белковый компонент сложных ферментов, каталитическая активность которых проявляется при соединении апофермента с коферментом.

Домены - функционально и стерически обособленные глобулярные участки молекулы белка.

Изоферменты – каталитически сходные формы фермента, различающиеся по своим физико-химическим свойствам.

Конформация белка - высокоупорядоченная пространственная структура, которая способствует выполнению специфических биологических функций.

Метаболон — надмолекулярный процесс ферментов, катализирующих последовательные стадии метаболического пути и структурных элементов клетки.

Холофермент - активная или полная форма фермента.

Экзонуклеазы - ферменты, последовательно отщепляющие нуклеотиды с концов полинуклеотидной цепи ДНК или РНК.

Эндонуклеазы - ферменты, гидролизующие фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот.

Аннотация: Четвертичная структура характерна для белков, построенных из двух или более пептидных цепей – олигомерные белки. Они способны взаимодействовать с несколькими лигандами в центрах, удаленных друг от друга. Связывание одного протомера с лигандом изменяет конформацию этого протомера, а также всего олигомера и сродство к другим лигандам. Для белков также характерно образование надмолекулярных и ферментативных комплексов. Одним из элементов пространственной организации ферментов является метаболон – надмолекулярный комплекс, объединяющий ферменты определенного метаболического пути. Метаболонны формируются на подложках, в роли которых могут выступать биологические мембраны, структурные белки мышц и некоторые клеточные структуры.

ЗАНЯТИЕ 4.

Тема практического занятия: «Физико – химические, биологические свойства двойной спирали ДНК. Полиморфизм двойной спирали и разнообразие форм ДНК»

Учебно – целевые вопросы:

1. Макромолекулярная структура ДНК, взаимодействия между гетероциклическими основаниями
2. Понятие полиморфизма двойной спирали
3. Перечислите и охарактеризуйте основные физико – химические и биологические свойства ДНК
4. Сверхспирализация ДНК и её биологическое значение
5. Особенности нуклеотидной последовательности в ДНК эукариот и их функциональное значение

Ключевые слова/Глоссарий:

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов.

Палиндром - последовательность ДНК, которая на одной из цепей читается слева направо и аналогично на другой - справа налево.

Плавление ДНК - денатурация ДНК.

Плаزمида - кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

Ренатурация – восстановление денатурированных комплементарных цепей ДНК с образованием двухцепочечной молекулы.

Топоизомераза - фермент, изменяющий число зацеплений в ДНК.

Аннотация: ДНК является нуклеиновой кислотой, мономерами которой выступают дезоксирибонуклеотиды. Вся информация о структуре, функционировании и развитии отдельных клеток и целостного организма записана в виде нуклеотидных последовательностей ДНК. Существует несколько типов ДНК: А, В, Z, Т-формы. В эукариотических клетках ДНК существует в виде нуклеопротеиновых комплексов, в состав которых входят белки-гистоны. Основные физико-химические свойства ДНК: денатурация, ренатурация, вязкость, поглощение в УФ- свете, а также реакционная способность.

ЗАНЯТИЕ 5.

Тема практического занятия: «Виды РНК. Основные закономерности строения двуцепочечных и одноцепочечных РНК.»

Учебно – целевые вопросы:

1. Основные виды РНК, их функции и локализация в клетке.
2. "Мир РНК", гипотеза о роли РНК в происхождении жизни.
3. Малые ядерные РНК, малые РНК, их функции.
4. Рибозимы. Дезоксирибозимы. Аптамеры, аптамерная технология.
5. Физико-химические свойства РНК.

Ключевые слова/ Глоссарий:

Антикодон - триплет в структуре молекулы тРНК, комплементарно взаимодействующий с кодоном мРНК.

Генотип - совокупность генов организма.

Гетерогенная ядерная (гяРНК) - Продукт транскрипции ядерных генов, осуществляемой РНК-полимеразой II.

Гибридизация - процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих двухцепочечный гибрид РНК – ДНК

Изоакцепторные тРНК - молекулы тРНК, соответствующие одной аминокислоте.

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) — нуклеиновые кислоты, полимеры нуклеотидов, в состав которых входят остаток ортофосфорной кислоты, рибоза и азотистые основания

Аннотация: РНК – это нуклеиновая кислота, мономерами которой являются рибонуклеотиды. В пределах одной молекулы РНК имеется несколько участков, которые комплементарны друг другу, соединенные водородными связями. Азотистые основания, входящие в состав РНК, способны образовывать водородные связи с комплементарными основаниями как ДНК, так и РНК. Благодаря этому возможна передача информации между ДНК, РНК и белками. Все типы РНК образуется в результате

гетерокаталитической реакцией матричного типа. Этот процесс называется транскрипцией и контролируется определенными ферментами – РНК–полимеразами (транскриптазами).

ЗАНЯТИЕ 6.

Тема практического занятия: «Строение и функции тРНК, рРНК, мРНК.»

Учебно – целевые вопросы:

1. Структура и основная характеристика информационной РНК (матричной РНК)
2. Структура и основная характеристика рибосомных РНК.
3. Структура и основная характеристика транспортной РНК.

Ключевые слова/ Глоссарий:

Антикодон - триплет в структуре молекулы тРНК, комплементарно взаимодействующий с кодоном мРНК.

Гетерогенная ядерная (гяРНК) - Продукт транскрипции ядерных генов, осуществляемой РНК-полимеразой II.

Гибридизация - процесс взаимодействия комплементарных цепей РНК и ДНК, образующих двухцепочечный гибрид РНК – ДНК

Изоакцепторные тРНК - молекулы тРНК, соответствующие одной аминокислоте.

Рибонуклеиновые кислоты (РНК) — нуклеиновые кислоты, полимеры нуклеотидов, в состав которых входят остаток ортофосфорной кислоты, рибоза и азотистые основания

Аннотация: В клетках обнаруживается три основных типа РНК, выполняющих различные функции: *информационная*, или *матричная* РНК, основная функция которой заключается в передаче генетической информации от ДНК на рибосомы при биосинтезе белка. В эукариотических клетках иРНК (мРНК) стабилизирована с помощью специфических белков, что делает возможным продолжение биосинтеза белка даже в том случае, если ядро неактивно; *рибосомальная* РНК (рРНК) - входит в состав рибосом, определяет форму большой и малой рибосомных субъединиц, обеспечивает контакт рибосомы с другими типами РНК; *транспортная* РНК (тРНК) - транспортирует аминокислоты к соответствующему участку иРНК в рибосомах. При этом, каждый тип тРНК транспортирует определенную аминокислоту. В клетках имеются и другие типы РНК, выполняющие вспомогательные функции.

ЗАНЯТИЕ 7.

Тема практического занятия: «Типы взаимодействия вируса с клеткой - хозяином. Характеристика некоторых вирусов»

Учебно – целевые вопросы:

1. Происхождение вирусов и их роль в эволюции.
2. Типы генетического материала и механизм его репликации у различных вирусов.
3. Жизненный цикл вируса. Типы взаимодействия вируса с клеткой – хозяином
4. Литический и лизогенный путь инфекции
5. Разнообразие геномов вирусов. ДНК- и РНК - содержащие вирусы.

Ключевые слова/ Глоссарий:

Вирусы – ультрамикрорганизмы исключительно малых размеров, которые не имеют клеточного строения, имеют в своем составе только один тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) и которые не могут репродуцироваться вне живой клетки.

Вирион- внеклеточная, покоящаяся форма вирусной частицы;

Вирулентность – характеристика патогенности микроорганизма, свойственна только грамотрицательным бактериям

Гибридизация вируса – тип изменчивости вирусов, происходящий вследствие объединения геномов двух вирусов под одним капсидом или же заключения генома одного вируса под капсидом другого вируса.

Кросс-реактивация – это тип рекомбинации между двумя вирусами, один из которых является неизменным (интактным), а другой - мутантным инактивированным.

Мутация вируса– стабильное наследуемое изменение в нуклеиновом составе генома вируса, приводящее к внезапно наступающим наследуемым изменениям свойств вируса

Патогенность – потенциальная способность вируса вызывать инфекцию.

Аннотация: Вирусы являются ультрамикроретерогенными системами, состоящие в основном из белков и нуклеиновые кислот, обладающие способностью воспроизводить себе подобных и подвержены изменчивости, что является признаками живых существ. Различают три типа взаимодействия вируса с клеткой: продуктивный, abortивный и интегративный. Основной особенностью вирусного генома является то, что наследственная информация у них может быть записана как на ДНК, так и на РНК. Геном ДНК-содержащих вирусов двухнитевой, исключение составляют парвовирусы, имеющие однонитевую ДНК, несегментированный и проявляет инфекционные свойства. В группе РНК-геномных вирусов выделяют единственное семейство, обладающее онкогенными свойствами -

Retroviridae. Вирусы семейства обычно выделяются из клетки путем почкования без ее повреждения, и способны передаваться из поколения в поколение. В группе ДНК-геномных вирусов онкогенными свойствами обладают семейства Poxviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Papovaviridae и Parvoviridae.

ЗАНЯТИЕ 8.

Тема практического занятия: «Строение бактериальных плазмид. Понятие о транспозонах и IS – элементах.»

Учебно – целевые вопросы:

1. Строение и функции бактериальных плазмид
2. Характеристика транспозонов и IS – элементов
3. Механизмы перемещения мобильных элементов бактерий
4. Генетическая изменчивость бактерий

Ключевые слова/ Глоссарий:

IS-элементы — это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами.

Геном –совокупность наследственного материала, содержащегося в клетке организма.

Плазмида — кольцевая молекула ДНК, расположенная вне хромосомы и способная к самостоятельной репликации.

Транспозоны — это сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие структурные гены, т. е. гены, обеспечивающие синтез молекул, обладающих специфическим биологическим свойством, например токсичностью, или обеспечивающих устойчивость к антибиотикам.

Аннотация: Бактериальный геном состоит из генетических элементов, способных к самостоятельной репликации - репликонов. Репликонами являются бактериальная хромосома и плазмиды. Плазмиды бактерий представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК. Они кодируют не основные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, но придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия существования. В состав бактериального генома, как в бактериальную хромосому, так и в плазмиды, входят подвижные генетические элементы. К подвижным генетическим элементам относятся вставочные последовательности и транспозоны. Известно несколько разновидностей IS-элементов, которые различаются по размерам и по типам и количеству инвертированных повторов. Отличительной особенностью IS-элементов является наличие на концах вставочной последовательности инвертированных повторов.

ЗАНЯТИЕ 9.

Тема практического занятия: «Механизмы перемещения мобильных элементов бактерий. Генетическая изменчивость бактерий»

Учебно - целевые вопросы:

1. Дайте определение понятию «Мобильные генетические элементы». Какие виды мобильных генетических элементов выделяют для бактерий?
2. Какие существуют механизмы перемещения мобильных элементов бактерий? Дайте характеристику каждого из них.
3. Виды и особенности генетической изменчивости бактерий.
4. Дайте определение понятию «Генотипическая рекомбинация». Какие механизмы лежат в основе генотипических рекомбинаций?

5. Роль генетической изменчивости бактерий в генной инженерии?

Ключевые слова/ Глоссарий:

Наследственность – способность живых организмов сохранять определенные признаки на протяжении многих поколений.

Изменчивость – приобретение новых признаков, отличающих их от других поколений под влиянием факторов внешней среды. Наука, изучающая наследственность и изменчивость, называется генетикой.

Фенотип – общий комплекс морфологических и физиологических свойств каждого индивидуума, и служит внешним проявлением генотипа.

Генотип – общая сумма генов, которыми обладает клетка. Он определяет целую группу свойств организма, специфичных для данного вида.

Транспозиции - перемещение небольших участков генетического материала в пределах одной хромосомы или между разными хромосомами. Транспозиции происходят при участии особых подвижных или мигрирующих генетических элементов.

Мутации— наследуемые изменения генетического материала, которые происходят на разных уровнях: геномном уровне, хромосомном уровне, генном уровне.

Аннотация: Мобильными генетическими элементами (МГЭ) называют подвижные фрагменты генома клетки, способные к самостоятельным перемещениям внутри генома. Подвижные (мобильные) генетические элементы встречаются у всех живых систем – от бактерий до высших эукариот, включая человека. Перемещение фрагментов генетического материала играет важную роль в эволюции, являясь одним из источников генетической изменчивости. При этом перемещения и изменчивость часто

нужны для нормальной жизнедеятельности, но могут причинять вред организму. Транспозоны - это разновидность мобильных генетических элементов, которые содержат в своем составе один или несколько структурных генов и гены, ответственные за перемещение. Транспозоны обозначают как Tn с числовым индексом, например, Tn 4556. Их размер больше IS-элементов и составляет 2 500–7 000 п.о. На обоих концах Tn находятся прямые или инвертированные повторы, по которым транспозаза распознает их и вырезает. В зависимости от структуры выделяют два класса транспозонов: сборные и комплексные. Транспозоны участвуют в регуляции активности генов, инактивируя или активируя их. Осуществляют горизонтальный перенос генов, например, вирулентности или резистентности, обуславливая распространение устойчивости к антибиотикам среди микроорганизмов. Транспозиция происходит двумя путями: 1) консервативным: покидая один участок, IS-элемент встраивается в другой; 2) репликативным: синтезируется копия, которая встраивается в другой участок генома. Встраивание, как правило, осуществляется в участках, богатых A/T.

Геном бактерий характеризуется пластичностью, или способностью изменяться. Выделяют следующие виды изменчивости: *Фенотипическая изменчивость* – общие свойства организма, служащие внешним проявлением генотипа и не передающиеся по наследству. Фенотипическая изменчивость возникает под воздействием различных факторов при росте и размножении микроорганизмов на питательных средах. Эти изменения не наследуются и утрачиваются с прекращением действия вызвавшего их фактора. Например, у бактерий наблюдается изменение типа колоний, которые они образуют при росте на питательных средах. Одни колонии гладкие, округлой формы, с ровными краями, блестящие, однородные. Это S – формы. Другие колонии шероховатые, тусклые, непрозрачные, с неровными краями, неправильных очертаний. Это – R-формы. Эти формы могут переходить друг в друга и

обратно. Образование различных форм колоний у одного и того же вида бактерий называется диссоциацией (расщепление). Культура бактерий, размножаясь на питательных средах, вырабатывает определенные ферменты, позволяющие ей усваивать питательные вещества. Если питательное вещество находится в среде, то появляется и фермент. Приспосабливаясь к разным жизненным условиям, микроб может расти и размножаться на различных питательных средах. *Генотипическая изменчивость* - это общая сумма генов клетки, определяющая специфические свойства организма и передающиеся по наследству. Наследственная информация заключена в хромосоме и генах, которые передаются из родительской клетки в дочерние. Химическая природа генов – нуклеиновые кислоты. Основной структурой, хранящей информацию и передающая её, является ДНК. Эта информация может меняться в результате генотипической изменчивости. При этом обязательно происходит изменение генов в хромосоме. Генотипическая изменчивость может возникать в результате мутаций и генотипических рекомбинаций. Изменение молекулы ДНК влечет за собой и изменение информации, которая в ней содержится. В результате чего у микроорганизмов появляются новые свойства, передающиеся по наследству. Мутации могут быть спонтанными, когда их причины неизвестны, и индуцированными, когда их причины известны. Мутации возникают под воздействием различных физических и химических факторов, излучения. Все это ведет к появлению потомства клетки с новыми свойствами.

ЗАНЯТИЕ 10.

Тема практического занятия: «Регуляторные элементы генов, кодирующих белки. Мини и микро - сателлиты. Онкогены и антионкогены»

Учебно – целевые вопросы:

1. Дайте определение «Гены», «Генетический код».
2. Перечислите виды генов. Регуляторные элементы генов, регулирующие белки.
3. Укажите основные отличия сателлитов от микро- и минисателлитов.
4. Перечислите способы выделения микро- и минисателлитов.
5. Что такое «Тандемные повторы»?
6. Онкогены и антионкогены. Определение и характеристика.

Ключевые слова/Глоссарий:

Генетический код — это система записи информации о последовательности расположения аминокислот в белках с помощью последовательного расположения нуклеотидов в и-РНК.

Промотор — последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической, или осмысленной, транскрипции.

Интрон — участок ДНК, который является частью гена, но не содержит информации о последовательности аминокислот белка.

Инсуляторы — последовательности ДНК, особые регуляторные элементы, которые обладают способностью блокировать сигналы, исходящие от окружения.

Сайленсеры - регуляторные генетические элементы, благодаря которым ослабляется или блокируется транскрипция некоторых вирусных и эукариотических генов.

Энхансер — небольшой участок ДНК, способный связываться с факторами транскрипции, при этом увеличивая уровень транскрипции гена или группы генов.

Микросателлиты— варьирующие локусы в ядерной ДНК и ДНК органелл (митохондрий и пластид), состоящие из повторяющихся фрагментов длиной от 1 до 6 пар нуклеотидов.

Онкогены - это активированные вследствие мутаций или по другим причинам клеточные протоонкогены, продукты которых стимулируют одну из стадий раковой прогрессии клетки, действуя доминантным образом, или гены онкогенных вирусов, вызывающие малигнизацию клеток и образование раковых опухолей.

Антионкогены - гены, активность которых препятствует развитию опухолей. Являются антагонистами онкогенов.

Минисателлиты— варьирующие локусы в ядерной ДНК и ДНК органелл (митохондрий и пластид), состоящие из повторяющихся фрагментов длиной от 6 до 100 пар нуклеотидов.

Аннотация: Кодирование наследственной информации происходит с помощью генетического кода, который универсален для всех организмов и отличается лишь чередованием нуклеотидов, образующих гены, и кодирующих белки конкретных организмов. По функциональным особенностям выделяют две группы генов: структурные и регуляторные. Регуляторными называют гены, деятельность которых влияет на экспрессию других генов – структурных. Таким образом, белковые продукты структурных генов оказываются своего рода целевыми, а регуляторных – вспомогательными. В пределах с мих генов в структурном отношении можно выделить следующие составные части: кодирующая часть, где зашифрована информация о белках – область экзонов; обширные многочисленные области, расположенные между генами, большинство которых не кодирует ни один белок – интроны, характерные для генов эукариотических организмов. Несмотря на то, что интроны не кодируют белки, с них тоже может считываться РНК. Отдельную структурную группу

составляют регуляторные зоны генов, которые представлены такими последовательностями ДНК, как промоторы, энхансеры, сайленсеры и инсуляторы. В эукариотических геномах представлено большое разнообразие различных регулярных структур. Значимую их часть составляют тандемные повторы. Тандемным повтором называют последовательность нуклеотидов, которую можно представить, как некое слово, повторяющееся одно за другим без делеций и вставок, но с возможными ошибками. Микро- и минисателлиты в эукариотических геномах представлено большое разнообразие различных регулярных структур. Значимую их часть составляют тандемные повторы с длиной периода (длины нуклеотида) от 2 до ~ 6 называют микросателлиты, а тандемные повторы с длиной периода (длины нуклеотида) от 6 до ~ 100 называют минисателлиты. Онкогеном называется ген, который в норме оказывает активирующее влияние на процессы пролиферации и/или препятствует клеточной гибели, активируется в опухолях, проявляет трансформирующие свойства в экспериментах по трансфекции. Онкогены необходимы для нормального функционирования (обновления) тканей, их работа находится под строгим контролем сигнальных систем организма. Соматическая мутация в онкогене приводит к независимости клетки от внешних регулирующих влияний, т.е. клеточный клон, находясь в условиях аутоstimуляции, приобретает способность к неконтролируемому размножению. Генетические повреждения в онкогенах могут возникать вследствие случайного мутационного процесса, однако вероятность мутаций существенно повышается при увеличении канцерогенной нагрузки. Антионкогеном (супрессорным геном) называется ген, который в норме оказывает инактивирующее влияние на процессы пролиферации и/или способствует клеточной гибели, инактивируется в опухолях, осуществляет реверсию злокачественного фенотипа в экспериментах по трансфекции. К концу 1980-х годов было установлено, что практически каждая опухоль содержит множественные мутации в антионкогенах, выражающиеся как в виде делеций, так и в форме

микромутаций. Вероятно, инактивирующие повреждения супрессорных генов встречаются существенно чаще, чем активирующие мутации в онкогенах, что соответствует бытовой логике «ломать – не строить». В целом открытие антионкогенов послужило очень заметным этапом в истории молекулярной онкологии, добавив целостности и логичности к имеющимся до этих воззрений.

ЗАНЯТИЕ 11.

Тема практического занятия: «Подвижные генетические элементы прокариот»

Учебно – целевые вопросы:

1. Подвижные элементы прокариот. Определение. Виды.
2. Функции подвижных генетических элементов прокариот.
3. Дать сравнительную характеристику подвижным генетическим элементам прокариот.

Ключевые слова/ Глоссарий:

Прокариоты – это одноклеточные живые организмы без оформленного клеточного ядра.

Эукариоты — домен (надцарство) живых организмов, клетки которых содержат ядро.

Мобильные (подвижные) генетические элементы — участки ДНК, способные к транспозиции, или случайному перемещению, из одного места в другое.

Транспозаза — это фермент, связывающий одноцепочечную ДНК и встраивающий последнюю в геномную ДНК.

Аннотация: Мобильные (подвижные) генетические элементы (прыгающие гены) — участки ДНК, способные к транспозиции, или случайному перемещению, из одного места в другое: в пределах одной молекулы ДНК, из одной ДНК в другую. Транспозиция обеспечивается ферментом — транспозазой. Ген, кодирующий этот фермент, входит в состав всех мобильных генетических элементов. Транспозаза обладает эндонуклеазной и лигазной функцией: она разрезает ДНК по краям мобильного генетического элемента (эндонуклеазная функция) и сшивает его с разрывом ДНК в новом месте (лигазная функция). В некоторых случаях транспозиция сопровождается удвоением мобильных генетических элементов и перемещением копии в другое место. IS-ЭЛЕМЕНТЫ. Это разновидность мобильных генетических элементов, которые не несут в своем составе структурные гены, а только гены, отвечающие за перемещение. Многообразие IS-элементов обозначают цифровыми индексами: IS 1, IS 6010. Их размер меньше, чем транспозонов и составляет от 700 до 1800 п.о., но описаны IS-элементы более крупных и мелких размеров — 5700 и 200 п.о. Центральную часть IS-элемента занимает ген, кодирующий транспозазу; некоторые IS-элементы несут промоторы или репрессоры генов, или их части. На обоих концах IS-элемента находятся повторяющиеся последовательности, или палиндромы, размером 10–40 п.о., по которым транспозаза распознает его и вырезает. В геноме бактерий присутствует, как правило, небольшое количество их копий: в геноме *E. coli* IS 1 встречается в 6–10 копиях, а IS 2 — 5 копиях. Транспозиция происходит двумя путями: 1) консервативным: покидая один участок, IS-элемент встраивается в другой; 2) репликативным: синтезируется копия, которая встраивается в другой участок генома. Встраивание, как правило, осуществляется в участках, богатых А/Т. Значение IS-элементов:

1. Участвуют в мутационной изменчивости микроорганизмов — инсерциях и делециях. Инсерция IS-элементов в бактериальную ДНК

приводит к синтезу неполноценного белка. При встраивании некоторых IS-элементов по обоим их концам происходит удвоение небольшого участка хромосомы размером 5–9 п.о. С меньшей частотой (10^{-3} – 10^{-4}) IS-элементы приводят к делециям в прилегающих генах: покидая ДНК, IS 4 вырезает участки хромосомальной ДНК по обоим своим концам.

2. Являются генетическими маркерами вида или рода бактерий. Некоторые IS-последовательности специфичны для определенных видов микроорганизмов, что позволяет по их наличию осуществлять видовую идентификацию бактерий.

3. Являются местом распознавания и встраивания плазмид и генноинженерных векторов. Плазмиды и генно-инженерные векторы встраиваются в бактериальную хромосому в области IS-последовательностей.

4. Участвуют в регуляции функций генов — активации или репрессии, т. е. несут в своем составе промоторы или репрессоры генов или их компоненты. Например, формирование резистентности к метронидазолу у анаэробных микроорганизмов связано с активацией молчащих *nim* A, B, C, D, E генов в результате встраивания IS-элементов, несущих промоторы этих генов.

ТРАНСПОЗОНЫ. Это разновидность мобильных генетических элементов, которые содержат в своем составе один или несколько структурных генов и гены, ответственные за перемещение. Транспозоны обозначают как Tn с числовым индексом, например, Tn 4556. Их размер больше IS-элементов и составляет 2 500–7 000 п.о. На обоих концах Tn находятся прямые или инвертированные повторы, по которым транспозаза распознает их и вырезает. В зависимости от структуры выделяют два класса транспозонов:

1. Сборные (Tn 5, 9, 10, 903 и 1681). Состоят из фенотипического модуля (гены резистентности) и двух располагающихся по краям IS-элементов, ориентированных в одном или противоположных направлениях. IS-элементы обеспечивают перемещение транспозонов, но могут покидать его и перемещаться самостоятельно. Tn 10, имеющий по краям две копии IS 10, подвергается переносу с частотой 10^{-7} . Этот транспозон встраивается, преимущественно, в участках с последовательностью ГЦТНАГЦ (при встраивании этот участок удваивается) и, как правило, полностью безошибочно вырезается, но в некоторых случаях в процессе эксцизии может захватывать из бактериальной хромосомы дополнительно 50 п.о.

2. Комплексные (Tn 1, 3, 4, 7, 501 и 551). Состоят из фенотипического модуля (гены резистентности) и располагающихся по краям не прямых повторов размером 30–40 п.о. Функционируют как единое и неделимое целое. Частота транспозиций комплексных транспозонов составляет 10^{-4} – 10^{-6} . Большинство из них при встраивании проявляют сайтспецифичность: Tn 7, например, имеет только один участок встраивания в хромосому *E. coli*. Некоторые транспозоны (Tn 3) обеспечивают «иммунитет» клетки к встраиванию идентичных транспозонов. Бактериофаг μ , или мутатор, также относится к комплексным транспозонам. Этот самый сложно организованный транспозон содержит 38 000 п.о., и на его концах находятся инвертированные повторы размером 11 п.о. Он не имеет определенного сайта встраивания в бактериальную ДНК, в процессе вырезания из нее обычно захватывает участок, равный 10 % своего размера. Бактериофаг μ часто используют в генетических исследованиях, т. к. в естественных условиях он не входит в состав бактериальных геномов и потому легко проводить его детекцию. Перенос транспозонов осуществляется консервативным или репликативным механизмом. Консервативный перенос происходит путем вырезания транспозона из одного участка и транспозицией в другой без увеличения количества копий, при этом участок ДНК, откуда вырезается

транспозон, утрачивает свои функции. При репликативном способе переноса синтезированная копия транспозона перемещается в новое место, при этом механизме увеличивается количество копий.

ИНТЕГРОНЫ. Отвечают за сайтспецифическую рекомбинацию.

Интегроны — мелкие генетические элементы, содержащие промотор и ген тирозиновой рекомбиназы — *int*. Рекомбиназа распознает в бактериальной хромосоме сайт *att I* и обеспечивает встраивание в него. Не содержат гены, отвечающие за транспозицию. Способны соединяться с кассетами генов, кодирующими резистентность и другие признаки, при этом генетические кассеты должны содержать обеспечивающие подвижность гены и элемент размером 59 п.о.

ЗАНЯТИЕ 12.

Тема практического занятия: «Механизм и этапы репликации хромосом у прокариот»

Учебно – целевые вопросы:

1. Репликация. Определение. Виды.
2. Механизм и этапы репликации хромосом у прокариот.
3. Отличия репликации прокариот и эукариот.
4. Биологическая роль репликации.
5. Что такое «Фрагменты Оказаки»?

Ключевые слова/Глоссарий:

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — макромолекула, которая содержится в клетках всех живых организмов и играют важную роль в кодировании, прочтении, регуляции и выражении генов.

Репликация — процесс биосинтеза молекул дезоксирибонуклеиновых кислот, в результате которого из одной молекулы образуются две дочерние, полностью идентичные материнской.

ДНК - полимеразы (ДНК-зависимые ДНК-полимеразы) - ферменты класса трансфераз, катализируют синтез дезоксирибонуклеиновых кислот, используя в качестве матрицы одну из цепей двойной спирали ДНК.

Аннотация: Репликация — процесс биосинтеза молекул дезоксирибонуклеиновых кислот, в результате которого из одной молекулы образуются две дочерние, полностью идентичные материнской.

Способы репликации:

1. θ -тип. Репликативный глазок расширяется в противоположных направлениях вдоль кольцевой молекулы ДНК. При этом образуется промежуточная структура, напоминающая греческую букву θ . Характерен для прокариот и некоторых вирусов.
2. σ -тип (механизм «катящегося кольца»). Репликация начинается с разрыва фосфодиэфирной связи в одной из цепей родительской кольцевой молекулы. ДНКП присоединяется к свободному 3' —концу и наращивает новую цепь. Промежуточная структура имеет форму буквы σ . Этот тип репликации обнаружен у некоторых вирусов, в частности, у бактериофага лямбда.
3. Репликация линейных молекул с образованием нескольких репликативных вилок, движущихся друг к другу. Характерна для всех эукариот и вирусов с линейными молекулами ДНК.

Механизм и этапы репликации у прокариот:

1. Инициация.

Репликация начинается в строго определенных участках ДНК – точках начала репликации. Здесь находятся специфические последовательности нуклеотидов – ДНК-боксы, распознаваемые инициаторным белком, с которым связываются впоследствии другие ферменты репликации. Поскольку синтез ДНК происходит только на одноцепочечной матрице, ему должно предшествовать обязательное разделение двух цепей ДНК, т.е. подготовка матрицы, которая включает в себя следующие процессы:

- ДНК-геликазы расплетают двойную спираль ДНК с использованием энергии АТФ. Участок начала расхождения цепей называется репликативной вилкой из-за характерной Y-образной формы.
- ДНК-топоизомеразы снимают топологическое напряжение (суперспирализацию) при раскручивании ДНК. Для этого фермент сначала разрывает цепь ДНК, затем ковалентно присоединяется к разорванному концу. Эта связь обладает значительной энергией, поэтому реакция обратима и не требует дополнительных энергетических затрат. Обнаружено 2 типа топоизомераз: топоизомераза I (вносит одностебельные разрывы) и топоизомераза II (вносит двустебельные разрывы в ДНК).
- SSB-белки (от англ. single-strand DNA-binding proteins) связываются с одноцепочечными участками и стабилизируют расплетенный дуплекс, препятствуя образованию шпилек.

Когда ДНК-матрица готова, необходимо к каждой из цепей материнской молекулы ДНК достроить из имеющихся в клетке

дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP) комплементарную цепь.

Ферменты, катализирующие детерминируемую ДНК-матрицей реакцию присоединения дезоксирибонуклеотидов, называются ДНК-полимеразами (ДНКП).

2. Элонгация (удлинение цепи).

Комплекс ферментов репликации, называемый реплисомой, движется вдоль молекулы ДНК-матрицы, расплетая ее и наращивая комплементарные цепи ДНК.

3. Терминация (окончание репликации).

В ДНК имеются сайты терминации репликации, содержащие специфические последовательности, с которыми связываются терминаторные белки, препятствующие дальнейшему продвижению репликативной вилки. Синтез ДНК заканчивается.

Скорость репликации у прокариот составляет 500 нуклеотидов /сек.

ЗАНЯТИЕ 13.

Тема практического занятия: «Механизм и этапы репликации хромосом у эукариот»

Учебно – целевые вопросы:

1. Механизм и этапы репликации хромосом у эукариот.
2. Особенности репликации хромосом у эукариот.
3. Дать определение «Репликационная вилка», перечислить основные ферменты, которые участвуют в репарации хромосом эукариот.

Ключевые слова/ Глоссарий:

Промотор — последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала транскрипции. Промотор играет одну из ключевых ролей в процессе инициации транскрипции.

Элонгация - процесс, следующий за началом (инициацией) транскрипции или трансляции, и заключающийся, соответственно, в наращивании (удлинении) цепи новообразующейся РНК на матрице ДНК или полипептидной цепи на мРНК в рибосомах.

Трансляция — процесс синтеза белков из аминокислот, катализируемой рибосомой на матрице матричной (информационной) РНК (мРНК или иРНК). Трансляция является одной из стадий процесса биосинтеза белков, в свою очередь части процесса экспрессии генов.

Аннотация: У эукариот ДНК представлена длинными линейными молекулами с различным уровнем компактизации, скорость репликации составляет несколько тысяч пар нуклеотидов в минуту (у прокариот – 30000 пар нуклеотидов в минуту). Чтобы обеспечить синтез целой молекулы, нужен определенный период времени (в клетках человека 7×10^9 п.н. реплицируются в течение 8-9 часов). Репликация начинается одновременно во многих точках *ori* (46 молекул ДНК клетки человека содержат от 105 до 106 репликационных).

У эукариот репликация происходит только в периоде S клеточного цикла и носит асинхронный характер. Эухроматиновые участки реплицируются раньше – в начале S - периода, гетерохроматиновые участки – в конце S-периода. Особенность репликации у эукариот состоит в том, что 5'-конец новой цепи короче в связи с отсутствием возможного синтеза последнего фрагмента Оказаки. Это могло бы привести в последующих поколениях молекул к укорочению хромосом и, как следствие, к потере генетической информации, содержащейся на их концах. Для предупреждения потерь концевых последовательностей ДНК на концах хромосом существует специальная структура (теломера), имеющая собственный механизм синтеза. Теломерные участки хромосом реплицируются с помощью специального механизма, с участием фермента теломеразы. Теломераза представляет собой белок, обладающий функцией обратной транскрипции и содержащий в качестве матрицы РНК.

На первом этапе происходит присоединение теломеразы к концу лидирующей цепи в области теломера. В дальнейшем фермент удлиняет цепь, используя в качестве матрицы молекулу РНК. Процесс удлинения 3'-конца повторяется многократно. В последующем ДНК-полимераза

синтезирует отстающую комплементарную цепь. Этапы репликации: инициация; элонгация; исключение праймеров; терминация. Инициация репликации: Синтез ДНК у эукариот происходит в синтетический период интерфазы жизненного цикла. Инициацию контролируют специальные сигнальные белковые молекулы – факторы роста. Синтез новых одноцепочечных молекул ДНК может происходить только при расхождении родительских цепей. Репликация начинается со строго определенного участка ДНК – сайт инициации репликации. Репликон – это участок ДНК, который содержит сайт инициации репликации и реплицируется после начала синтеза ДНК с этого сайта. Геномы бактерий, как правило, представляют собой один репликон, это значит, что репликация всего генома является следствием всего одного акта инициации репликации. Геномы эукариот (а также их отдельные хромосомы) состоят из большого числа самостоятельных репликонов, это значительно сокращает суммарное время репликации отдельной хромосомы.

Репликация начинается в сайте инициации репликации с расплетания двойной спирали ДНК, при этом формируется *репликационная вилка*. В каждом сайте может формироваться одна или две репликационные вилки в зависимости от того, является ли репликация одно- или двунаправленной. Более распространена двунаправленная репликация. Ферменты (хеликаза, топоизомераза) и ДНК-связывающие белки расплетают ДНК, удерживают матрицу в разведённом состоянии и вращают молекулу ДНК.

Элонгация осуществляется ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами. Правильность репликации обеспечивается точным соответствием комплементарных пар оснований и активностью ДНК-полимеразы, способной распознать и исправить ошибку.

Синтез происходит в направлении от 5' к 3' концу растущей цепи. ДНК-полимераза синтезирует дочернюю цепь ДНК последовательно присоединяя

нуклеотиды к 3'-концу растущей цепи. Синтезируемая цепь всегда антипараллельна матричной цепи. У эукариот 5 ДНК полимераз. Иницирует репликацию ДНК-полимераза альфа, которая комплементарна определенному сайту одноцепочечной ДНК. Она синтезирует короткий РНК-праймер, который служит праймером для синтеза ДНК. Для того чтобы ДНК-полимераза могла начать синтез необходимо наличие уже готового фрагмента ДНК или РНК, комплементарного матрице и содержащего свободную 3'-ОН-группу. Этот фрагмент называется затравкой. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат свободные нуклеотиды, имеющиеся в цитоплазме клеток. И далее синтезирует фрагмент цепи ДНК из 50 нуклеотидов. Далее синтез продолжается ДНК-полимеразой гамма. В каждой репликативной вилке идет одновременно синтез двух новых цепей.

Синтез дочерних молекул, на разных цепях материнской молекулы, идёт в разных направлениях и с разной скоростью. Кроме того, на одной цепи новая молекула собирается непрерывно, на другой – фрагментарно.

После завершения процесса фрагменты новой молекулы ДНК, которая синтезировалась короткими фрагментами (фрагментами Оказаки) сшиваются ферментом ДНК-лигазой.

ЗАНЯТИЕ 14.

Тема практического занятия: «Регуляция транскрипции у прокариот и эукариот»

Учебно – целевые вопросы:

1. Опишите регуляцию транскрипции у прокариот.
2. Опишите регуляцию транскрипции у эукариот.

3. Сравнительная характеристика регуляции транскрипции у прокариот и эукариот.

4. Биологическая роль регуляции транскрипции у прокариот и эукариот.

Ключевые слова/Глоссарий:

Оперон — функциональная единица организации генетического материала прокариот (бактерий и архей), в которой цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующих совместно или последовательно работающих белки, объединяются под одним (или несколькими) промоторами.

Конституитивные гены – это гены, обеспечивающие основные жизненные функции клетки, "гены домашнего хозяйства". Эти гены работают в клетке всегда, независимо от ее активности и условий.

Ген-регулятор – ген, регулирующий работу оперона, но не входящий в его состав. Он синтезирует белок-регулятор (чаще называемый белок-репрессор), который может быть в активной или неактивной форме.

Ген оператор – функциональный ген, который позволяет или не позволяет считывать информацию со структурных генов.

Аннотация: Регуляция биосинтеза белка у прокариот осуществляется на уровне изменения скорости синтеза мРНК. В настоящее время принята теория оперона, сформулированная Франсуа Жакобом и Жаком Моно. Предложены две схемы регуляции скорости транскрипции: по механизму индукции (лактозный оперон) и по механизму репрессии (триптофановый оперон). Первый в целом отвечает за катаболизм лактозы.

На основании наблюдений была предложена схема регуляции оперона по механизму индукции:

1. При отсутствии лактозы активный белок-репрессор связывается с оператором и блокирует синтез мРНК, кодирующей ферменты катаболизма лактозы. В результате эти ферменты не образуются.

2. Если глюкозы нет, а лактоза есть, то последняя связывается с белком-репрессором и ингибирует его, не давая ему связаться с геном-оператором и препятствовать работе РНК-полимеразы. Это позволяет РНК-полимеразе считывать информацию, отвечающую за синтез ферментов катаболизма лактозы, и синтезировать мРНК. Таким образом, лактоза является индуктором транскрипции.

Триптофановый оперон: триптофановый оперон в целом отвечает за синтез триптофана.

Функционирование триптофанового оперона в некотором смысле противоположно лактозному. Регуляция осуществляется по механизму репрессии.

1. В отличие от лактозного оперона, белок-репрессор синтезируется в неактивном состоянии и не может заблокировать транскрипцию генов, кодирующих ферменты синтеза триптофана. Синтез этой аминокислоты будет в клетке продолжаться до тех пор, пока в питательной среде не появится триптофан.

2. Триптофан соединяется с белком-репрессором и активирует его. Далее такой активный комплекс присоединяется к гену-оператору и блокирует транскрипцию. Таким образом, при наличии триптофана в среде прекращается его внутриклеточный синтез, экономятся ресурсы и энергия бактериальной клетки. В этом случае триптофан является репрессором транскрипции. Существенное усложнение эукариотических организмов повлекло за собой появление новых способов регуляции активности транскрипции: Амплификация – это увеличение количества генов, точнее

многократное копирование одного гена. Естественно, все полученные копии равнозначны и одинаково активно обеспечивают транскрипцию.

Энхансеры – это участки ДНК в 10-20 пар оснований, способные значительно усиливать экспрессию генов той же ДНК. В отличие от промоторов они значительно удалены от транскрипционного участка и могут располагаться от него в любом направлении (к 5'-концу или к 3'-концу). Сами энхансеры не кодируют какие-либо белки, но способны связываться с регуляторными белками (подавляющими транскрипцию).

Сайленсеры – участки ДНК, в принципе схожие с энхансерами, но они способны замедлять транскрипцию генов, связываясь с регуляторными белками (которые ее активируют).

Перестройка генов. К подобным процессам относится кроссинговер – обмен участками гомологичных хромосом, и более сложный процесс – сайт-специфичная рекомбинация, которая изменяет положение и порядок нуклеотидных последовательностей в геноме.

Процессинг мРНК – некоторые пре-мРНК подвергаются разным вариантам сплайсинга (альтернативный сплайсинг) в результате чего образуются разные мРНК, и соответственно, белки с разной функцией.

Изменение стабильности мРНК – чем выше продолжительность жизни мРНК в цитозоле клетки, тем больше синтезируется соответствующего белка.

ЗАНЯТИЕ 15.

Тема практического занятия: «Этапы и регуляция трансляции»

Учебно – целевые вопросы:

1. Трансляция. Определение.
2. Основные этапы и механизмы трансляции.
3. Ферменты, участвующие в трансляции.
4. Регуляция трансляции. Виды.
5. Биологическая роль регуляции трансляции.

Ключевые слова/Глоссарий:

Гуанозинтрифосфорная кислота — (ГТФ, GTP) это пуриновый нуклеотид. Биологическая роль ГТФ является субстратом для синтеза РНК в процессе транскрипции.

Факторы инициации— белки, которые обеспечивают инициацию трансляции — синтеза полипептидной цепи. Факторы инициации трансляции присоединяются к малой субъединице рибосомы.

Аминоацильный центр (А-центр) – место связывания очередной а-тРНК.

Аннотация: Трансляция— осуществляемый рибосомой процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК (иРНК, мРНК), реализация генетической информации

После переноса информации с ДНК на матричную РНК начинается синтез белков. Каждая зрелая мРНК несет информацию только об одной полипептидной цепи. Если клетке необходимы другие белки, то необходимо транскрибировать мРНК с иных участков ДНК.

Биосинтез белков или трансляция происходит на рибосомах, внутриклеточных белоксинтезирующих органеллах, и включает 5 ключевых элементов:

- матрица – матричная РНК,
- растущая цепь – полипептид,

- субстрат для синтеза – 20 протеиногенных аминокислот,
- источник энергии – ГТФ,
- рибосомальные белки, рРНК и белковые факторы.

Выделяют три основных стадии трансляции: инициация, элонгация, терминация.

Инициация:

Для инициации необходимы мРНК, ГТФ, малая и большая субъединицы рибосомы, три белковых фактора инициации (ИФ-1, ИФ-2, ИФ-3), метионин и тРНК для метионина.

В начале этой стадии формируются два тройных комплекса:

- первый комплекс – мРНК + малая субъединица + ИФ-3,
- второй комплекс – метионил-тРНК + ИФ-2 + ГТФ.

После формирования тройные комплексы объединяются с большой субъединицей рибосомы. В этом процессе активно участвуют белковые факторы инициации, источником энергии служит ГТФ. После сборки комплекса иницирующая метионил-тРНК связывается с первым кодоном АУГ матричной РНК и располагается в П-центре (пептидильный центр) большой субъединицы. А-центр (аминоацильный центр) остается свободным, он будет задействован на стадии элонгации для связывания аминоксил-тРНК.

Элонгация:

Для этой стадии необходимы все 20 аминокислот, тРНК для всех аминокислот, белковые факторы элонгации, ГТФ. Удлинение цепи происходит со скоростью примерно 20 аминокислот в секунду.

Элонгация представляет собой циклический процесс. Первый цикл (и следующие циклы) элонгации включает три шага:

1. Присоединение аминоацил-тРНК (еще второй) к кодону мРНК (еще второму), аминокислота при этом встраивается в А-центр рибосомы. Источником энергии служит ГТФ.

2. Фермент пептидилтрансфераза осуществляет перенос метионина с метионил-тРНК (в П-центре) на вторую аминоацил-тРНК (в А-центре) с образованием пептидной связи между метионином и второй аминокислотой. При этом уже активированная СООН-группа метионина связывается со свободной NH₂-группой второй аминокислоты. Здесь источником энергии служит макроэргическая связь между аминокислотой и тРНК.

3. Фермент транслоказа перемещает мРНК относительно рибосомы таким образом, что первый кодон АУГ оказывается вне рибосомы, второй кодон (на рисунке) становится напротив П-центра, напротив А-центра оказывается третий кодон (на рисунке). Для этих процессов необходима затрата энергии ГТФ. Так как вместе с мРНК перемещаются закрепленные на ней тРНК, то иницирующая первая тРНК выходит из рибосомы, вторая тРНК с дипептидом помещается в П-центр.

Второе повторение цикла – начинается с присоединения третьей аминоацил-тРНК к третьему кодону мРНК, аминокислота-3 становится в А-центр. Далее трансферазная реакция повторяется и образуется трипептид, занимающий А-центр, после чего он смещается в П-центр в транслоказной реакции.

Терминация:

Синтез белка продолжается до тех пор, пока рибосома не достигнет на мРНК особых терминирующих кодонов – стоп-кодонов УАА, УАГ, УГА. Данные триплеты не кодируют ни одной из аминокислот, их также называют нонсенс-кодонами. При вхождении этих кодонов внутрь рибосомы происходит активация белковых факторов терминации, которые последовательно катализируют:

Гидролитическое отщепление полипептида от конечной тРНК.

Отделение от П-центра последней, уже пустой, тРНК.

Диссоциацию рибосомы.

Источником энергии для завершения трансляции является ГТФ.

Реакции стадии терминации

Полирибосомы

По причине того, что продолжительность жизни матричной РНК невелика, перед клеткой стоит задача использовать ее максимально эффективно, т.е. получить максимальное количество "белковых копий". Для достижения этой цели на каждой мРНК может располагаться не одна, а несколько рибосом, встающих последовательно друг за другом и синтезирующих пептидные цепи. Такие образования называются полирибосомы.

Регуляция биосинтеза белка – принципиальный атрибут любой живой клетки. Регуляция необходима для поддержания баланса разнообразных белков в клетке или организме, для изменения этого баланса в меняющихся условиях окружающей или внутриорганизменной среды, для обеспечения смены белков в процессах клеточной дифференцировки и развития организма, для адекватного ответа на специфические внешние сигналы или неблагоприятные воздействия. Синтез белков в клетке регулируется на трех уровнях: 1) путем изменения активности генов, то есть через тотальную или избирательную модуляцию продукции мРНК на матрице ДНК (уровень транскрипции); 2) путем изменения активности мРНК в ее трансляции рибосомами (уровень трансляции); 3) путем деградации мРНК посредством ее тотального или избирательного расщепления рибонуклеазами.

Существуют три основных способа, как регулировать трансляцию. Первый способ – позитивная регуляция на основе сродства мРНК к

инициирующей рибосоме и факторам инициации (дискриминация мРНК). Второй способ – негативная регуляция с помощью белков-репрессоров, которые, связываясь с мРНК, блокируют инициацию (трансляционная репрессия). Этими двумя способами регулируются индивидуальные мРНК, то есть трансляция каждой мРНК может специфически контролироваться независимо от других мРНК клетки. Третий способ – тотальная регуляция трансляции всей совокупности мРНК клетки посредством модификации факторов инициации. При наличии общих черт регуляции на уровне трансляции у прокариотических (бактерии) и эукариотических (животные, растения, грибы и простейшие) организмов эти два надцарства живых существ обладают также только им свойственными путями или способами регуляции, обусловленными спецификой их мРНК и их аппарата инициации трансляции.

ЗАНЯТИЕ 16.

Тема практического занятия: «Репрограммирование трансляции»

Учебно – целевые вопросы:

1. Репрограммирование трансляции. Определение.
2. Механизм репрограммирования трансляции.
3. Биологическая роль процесса репрограммирования трансляции.

Ключевые слова/Глоссарий:

Трансляция— осуществляемый рибосомой процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК (иРНК, мРНК), реализация генетической информации.

Сплайсинг — процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК.

мРНК – матричная РНК составляет 3% от всей РНК клетки. Это короткоживущая молекула с молекулярной массой, колеблющейся в широких пределах и достигающей до $14 \cdot 10^6$ кДа. Функцией мРНК является перенос информации с молекулы ДНК на молекулу белка.

Нуклеотид – это мономерная единица, образующая более сложные соединения – нуклеиновые кислоты, без которых невозможна передача генетической информации, ее хранение и воспроизведения.

Аннотация: В последние годы были вскрыты возможности динамического репрограммирования трансляции, в результате чего по ходу трансляции может изменяться первичная структура синтезируемого белка. Таким образом, мРНК может служить матрицей для синтеза различных по структуре белков. Оказывается, что клетки и поражающие их вирусы с малым числом генов способны «экономно» использовать свой генетический потенциал не только путем альтернативного сплайсинга, но и за счет перепрограммирования (перекодирования) мРНК.

Изменение рамки считывания (т. е. перепрограммирование трансляции в отношении порядка считывания кодонов мРНК) обычно происходит на один – два нуклеотида в разных направлениях: в сторону 5/-конца мРНК (-1 нуклеотид) или в сторону 3/-конца (+1, +2 нуклеотида). Так происходит в том случае, когда кодирующие (транслируемые) области некоторых мРНК оказываются «испорчены» присутствием в их составе терминирующих кодонов. Однако такие мРНК все же могут транслироваться за счет изменения рамки считывания, для чего необходимо наличие определенных сигналов в транслируемой области.

Сдвиг рамки считывания на (-1) при трансляции РНК ретровирусов происходит в области особой гептануклеотидной последовательности перед шпильчатой структурой. У бактерий при трансляции мРНК, кодирующей

белковый фактор терминации RF2, сдвиг рамки на +1 также зависит от окружения терминирующего кодона UGA.

В других случаях рибосомы в ходе трансляции могут совершать «прыжки», обходя терминирующий кодон и пропуская значительную часть кодирующей последовательности мРНК, имеющую обычно особую петельную структуру. Так, при трансляции мРНК фага T4 рибосома переходит с кодона GGA (кодирует Gly) на кодон GGA, отстоящий от первого на 50 нуклеотидов, обходя таким образом терминирующий кодон UAG и следующую за ним петлеобразную область мРНК.

ЗАНЯТИЕ 17.

Тема практического занятия: «Репарация ДНК и апоптоз. Итоговый контроль»

Учебно – целевые вопросы:

1. Репарация ДНК. Определение, виды.
2. Механизмы репарации.
3. Апоптоз. Определение, механизм процесса апоптоза.
4. Биологическая роль репарации ДНК.
5. Биологическая роль апоптоза.

Ключевые слова/Глоссарий:

Апоптоз — регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной.

Каспазы — протеолитические ферменты, относящихся к семейству цистеиновых протеаз, расщепляющих белки исключительно после аспартата.

Каспазы играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах.

Репарация — особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК.

Аннотация: Процесс восстановления исходной нативной структуры ДНК называют репарацией ДНК, или генетической репарацией, а системы, участвующие в нем – репарационными. Репарация ДНК - один из важнейших генетических процессов в клетке, обеспечивающих её жизнедеятельность и сохранение вида в целом.

Главный поставщик ошибок в нуклеотидной последовательности – репликация ДНК. Длина её молекулы у человека составляет более 3 млрд. нуклеотидов. Нарушения в первичной структуре ДНК могут быть обусловлены: ошибками спаривания (основание в матричной цепи ДНК в течение короткого времени может находиться в другой таутомерной форме, позволяющей присоединить в комплементарной цепи неверное основание: наиболее частая ошибка такого типа - встраивание аденина вместо цитозина с образованием пары AG, спонтанным отщеплением основания от цепи ДНК (например, депуринизация - отщепление пуринов), дезаминированием цитозина (и, как результат – превращением его в урацил), . присоединением метильных или этильных групп к основаниям (это приводит к изменению свойств основания и, как результат, к образованию неверной пары).

Поврежденная ДНК могут индуцироваться внешними воздействиями: ультрафиолетом, рентгеновскими лучами, химическими соединениями и т.д.

Воздействие рентгеновского излучения, может вызывать одноцепочные разрывы. Более жесткое излучение, такое как, α -частицы, приводит к образованию двуцепочечных разрывов ДНК.

Классификация репарации ДНК:

1. По отношению к процессу репликации различают:

А) дорепликативную репарацию - протекает в G1 периоде клеточного цикла (пример - фотореактивационная репарация, эксцизионная репарация)

Б) пострепликативную репарацию (осуществляется с помощью механизмов, участвующих в процессах рекомбинации и репликации ДНК).

2 По характеру протекающих процессов

А) Фотореактивация. В 1949 г. А. Кельнер и в 1950 г. Р. Дульбекко установили, что жизнеспособность актиномицетов и бактерий, подвергнутых УФО в летальных дозах, восстанавливается, если затем воздействовать на них видимым светом. Явление было названо фотореактивацией.

Б) Эксцизионная репарация ДНК Существуют системы генетической репарации, при действии которых поврежденные участки вырезаются из цепи ДНК, отсюда происходит и термин «эксцизионная репарация» (англ. Excision - вырезание). Общая схема эксцизионной репарации, включает несколько этапов:

1. Узнавание повреждения УФ-эндонуклеазой

2. Инцизия (надрезание) цепи ДНК этим ферментом по обе стороны от повреждения;

3. Эксцизия (вырезание и удаление) фрагмента ДНК, содержащего повреждение, происходит при участии геликазы фермента, расплетающего молекулу ДНК для высвобождения концов после первичных надрезов;

4. Ресинтез, в ходе которого ДНК-полимераза заполняет образовавшийся дефект в ДНК благодаря своей 5-3-полимеразной активности. Другими словами – ДНК-полимераза проводит синтез недостающего участка ДНК в соответствии с принципом комплементарности.

5. ДНК-лигаза ковалентно присоединяет вновь синтезированный участок ДНК к ранее синтезированной ДНК. В целом,

эксцизионная репарация обычно распознает нарушения вторичной структуры ДНК (двойной спирали) и ликвидирует их.

В) Исправление ошибок спаривания (мисмэтч-репарация) как конкретный вариант эксцизионной репарации Мисмэтч-репарация исправляет ошибки, возникающие в результате нарушения комплементарности пар А-Т или Г-Ц в дочерней цепи при включении в них некомплемментарных нуклеотидов. Особенность данного механизма, состоит в том, что он способен отличить «старую» цепь ДНК от «новой» и исправить именно вновь синтезированную. В основе данного феномена лежит то важное свойство, что материнская цепь несёт в последовательностях GATC аденины с присоединенными к ним сразу после окончания репликации метильными группами. Вследствии этого во время следующего цикла репликации материнская и дочерняя цепи становятся структурно различными, так как до окончания данного цикла дочерняя цепь остаётся неметирированной. Именно в этот временной промежуток и должны быть исправлены ошибки спаривания оснований.

Г) SOS-Репарация. Существуют системы генетической репарации, при которых точность синтеза невысока. Они являются индуцибельными, и, очевидно, обусловлены необходимостью синтеза ДНК даже на матрице, содержащей повреждения. При этом синтез ДНК на матрице, оставшейся неповрежденной, будет сопровождаться большим количеством ошибок. Хотя такая ДНК и содержит значительное количество ошибок, поврежденные клетки действительно «спасаются» на каком-то этапе, если только жизненно важные функции не оказались безнадежно нарушенными. В связи со спасательными функциями этой системы репарации ДНК она была названа SOS - репарацией.

Апоптоз — это активный процесс с характерными морфологическими изменениями, проявляющимися в конденсации хроматина, фрагментации ядерной ДНК, сморщивании клетки, «вспенивании» плазматической

мембраны, а также в формировании окруженных мембраной фрагментов (апоптотных телец).

На молекулярном уровне происходит активация протеаз (каспаз) и ДНКаз, приводящая к разрушению специфических белков и нарушению целостности хромосом. Затем апоптотные клетки фагоцитируются, что позволяет избежать воспаления.

Апоптоз регулируют два главных механизма: внутренний, в котором центральную роль играет митохондрия, и внешний, в котором стартовой точкой являются рецепторы плазматической мембраны. В обоих механизмах определяющее значение имеет активация каспаз. Каспазы — группа цистеинзависимых аспарат-специфичных протеаз. При активации каждая молекула каспаз разрезается и высвобождает малую и большую субъединицы. Две большие и две малые формируют тетрамерный активный фермент.

При внешнем механизме апоптоза на поверхности клетки активируется рецептор гибели (например, Fas), который связывается со своим лигандом, что запускает тримеризацию самого рецептора и приводит к присоединению к нему с внутриклеточного конца адапторной молекулы (например, FADD). К такому сигнальному комплексу (DISC) присоединяется прокаспаза-8, и происходит ее активация. Активная каспаза в свою очередь разрезает и активирует эффекторные каспазы, например, каспазу-3. Разнообразные стимулы (оксидативный стресс, повреждение ДНК и ингибирование киназ) могут индуцировать внутренние пути апоптоза. Во внутреннем механизме различные апоптоз-индуцирующие сигналы прямо или опосредовано изменяют проницаемость митохондриальной мембраны.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

| п/№ | Наименование | Автор (ы) | Год, место издания |
|-----|--------------|-----------|--------------------|
|-----|--------------|-----------|--------------------|

| | | | |
|----------|---|--|--|
| 1 | Биология: учебник: в 2 т./ под ред. В.Н. Ярыгина/ | В.Н.Ярыгин, В.В.Глинкина, И.Н.Волков, В.В.Синельщикова, Г.В.Черных | 2011. М.: ГЭОТАР-Медиа. -. Т.1,2.-736 с. |
| 2 | Биология В 2-х кн., Кн.1 | Под ред. Ярыгина В.Н. | 2003 М.:Высшая школа |
| 3 | Биология В 2-х кн., Кн.2 | Под ред. Ярыгина В.Н. | 2003 М.:Высшая школа |
| 4 | Биохимия и молекулярная биология : учеб. пособ. для студ. технол. и биол. спец. | Белясова Н. А. | 2004. Минск : Кн. Дом, - 416 с. |
| 5 | Молекулярная биология : учебное пособие | Мушкамбаров Н. Н.; Кузнецов С. Л. | 2003 М. : МИА, - 535 с. |
| 6 | Биохимия и молекулярная биология | Эллиот В., Эллиот Д. под ред. А. И. Арчакова и др. | 2000 М. : Материк- альфа,-366с. |
| 7 | Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот: учебник / | Агол В. И. и др. ; под ред. А. С. Спирина. -., | 1990 М. : Высш. школа- 352 с. |