

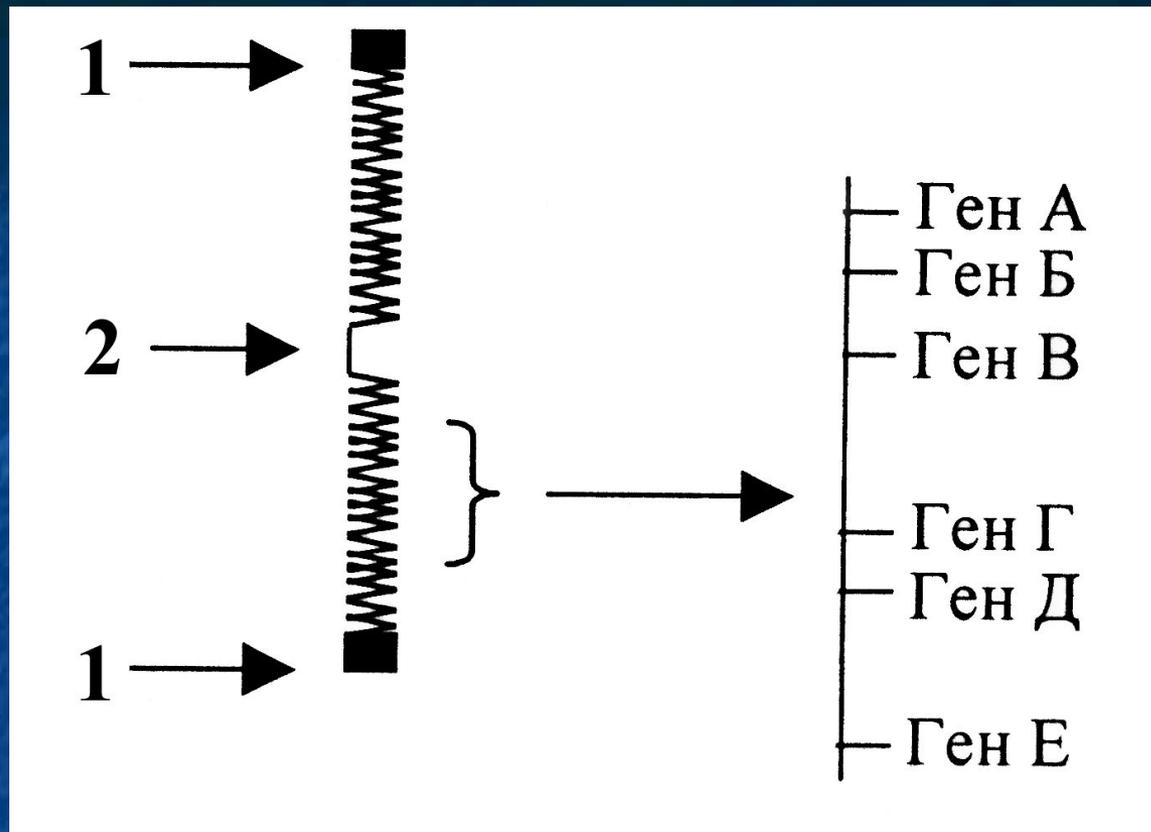
Гены и генная инженерия

Ген. Общая характеристика

Ген является элементарной структурно-функциональной единицей наследственности, определяющей развитие определенного признака клетки или организма. В результате передачи генов в ряду поколений организмов обеспечивается строгая преемственность признаков родителей.

В соответствии с современной концепцией *гены - это участки ДНК*, которые кодируют мРНК, тРНК или рРНК. РНК участвуют в синтезе белков, которые обеспечивают структуру, метаболизм клеток и обуславливают развитие признаков. Минимальные по размеру гены состоят из нескольких десятков нуклеотидов, например, гены тРНК. Гены больших макромолекул рРНК и мРНК включают несколько сот и даже тысяч нуклеотидов.

Большая часть генов находится в *репрессированном* (неактивном) состоянии. Только небольшая часть генов дерепрессирована, потенциально активна и может быть транскрибирована. Количество и качество функционирующих генов зависит от тканевой принадлежности клеток, от их периода жизненного цикла и стадии индивидуального развития.



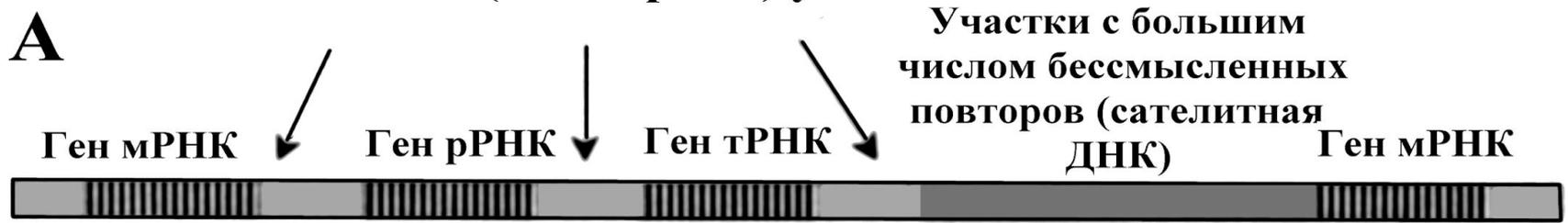
Расположение генов в интерфазной хромосоме. Гены в ДНК расположены в линейном порядке. Каждый ген имеет свое место расположения (локус). Теломерные и центромерные участки хромосом не содержат генов. Аналогичное расположение аллелей характерно для гомологичной хромосомы. 1 – теломеры; 2 – центромера.

Организация генома эукариот

Каждая интерфазная G_1 хромосома содержит одну молекулу ДНК, содержащую большое количество генов. Гены расположены в линейном порядке. Каждый ген имеет свое место расположения (локус). Совокупность всех генов гаплоидного набора хромосом называется *геномом*. Геном человека содержит $3,5 \cdot 10^9$ нуклеотидных пар, что достаточно для образования $\sim 1,5$ млн. генов. Однако исследования показывают, что организм человека имеет примерно 35000 генов. Это значит, что в половозрелом организме используется только $\sim 2-3\%$ записанной генетической информации. Значительная часть генома используется на процессы эмбрионального развития, дифференцировки, роста и в дальнейшем не экспрессируется. Другая значительная часть избыточной ДНК входит в состав интронов. И еще большая часть ДНК представлена многочисленными семействами не имеющих смысла повторяющихся последовательностей (сателитная ДНК). Повторяющиеся последовательности встречаются с частотой от 2 до 10^7 на одну клетку. Они могут кодировать группы белков или обладать пока неизвестными функциями.

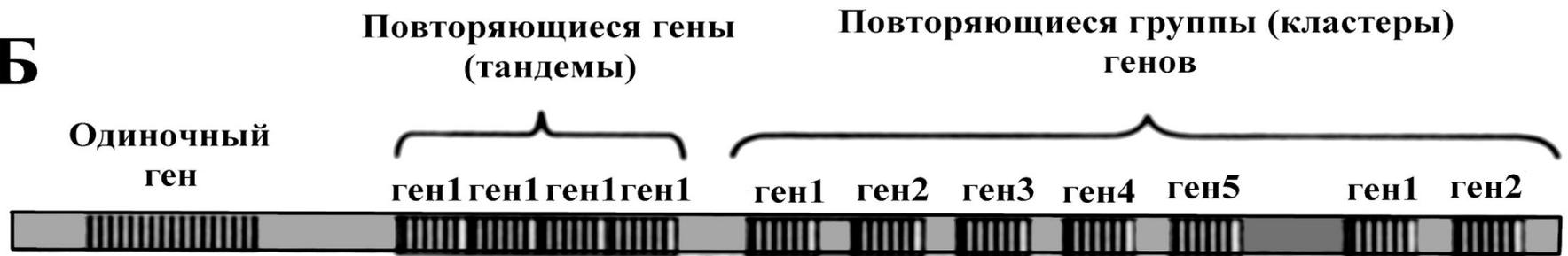
Межгенные (спейсерные) участки

А



ДНК

Б



ДНК

Структурная организация нуклеотидных последовательностей (генов) в ДНК (объяснение в тексте).

По способам организации нуклеотидов и функций последовательностей ДНК можно выделить следующие фрагменты: 1) гены мРНК (структурные гены), 2) гены рРНК; 3) Гены тРНК; 4) сателлитная ДНК; 5) спейсерная ДНК.

Структурные гены (тысячи разновидностей) несут информацию о структуре определенных полипептидов. С этих участков ДНК транскрибируется мРНК, которая направляет синтез белков. Гены рРНК (несколько разновидностей) содержат информацию о структуре рибосомальных РНК и регулируют их синтез. Гены тРНК (более 30 разновидностей) несут информацию о транспортных РНК. *Сателлитная ДНК* имеет большое число повторяющихся групп нуклеотидов, которые не имеют смысла и не транскрибируются. Значение сателлитной ДНК также полностью пока не известно.

Разные по функциям гены имеют также особенности организации в ДНК. Например, *повторяющиеся гены* - один и тот же ген многократно повторяется (много сотен раз), не отделяясь друг от друга, образуя *тандемы* (гены рРНК). *Кластеры генов* – это группы различных структурных генов в определенном участке хромосомы, объединенных общими функциями. Например, кластеры пяти разных гистонов повторяются по 10-20 раз. *Одиночные гены* среди сателлитной ДНК обычно играют регуляторное или усиливающее действие на структурные гены, например, энхасеры. *Спейсерная ДНК* разделяет между собой гены, она не транскрибируется. Роль этих участков до конца не выяснена.

Структурно-функциональная организация генов эукариот

Установление структуры генов эукариот является одним из главных открытий конца XX века. Структурный ген, кодирующий белок, сложно организован. Рассмотрим принцип организации гена на примере гена β -цепи гемоглобина

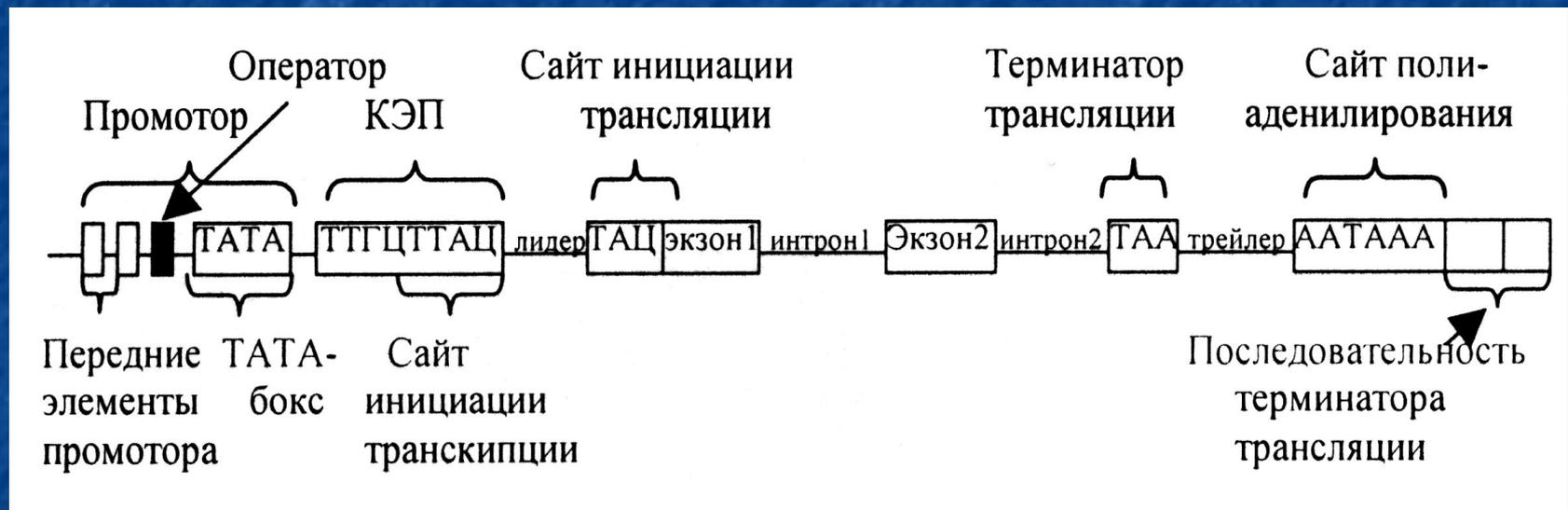


Схема структурно-функциональной организации гена β -цепи гемоглобина человека (объяснение в тексте).

В начале гена (до его смысловой части) расположены участки регуляции работы гена. Сначала расположена *область промотора*, ответственная за присоединение РНК-полимеразы и последующей инициации транскрипции. Неспецифические участки регуляции называют ТАТА-БОКС, составленный из многократно повторяющихся тимина и аденина. Установлено, что РНК-полимераза точно присоединяется к этой последовательности, так что ее активный центр оказывается над первым считываемым нуклеотидом. Этот участок состоит из сайта узнавания, сайта связывания и сайта инициации. Комбинация нуклеотидов в промоторе строго специфична и при нарушении рамки считывания образует стоп-кодона, что приводит к остановке транскрипции.

В области промотора расположен *оператор*, который может присоединять факторы регуляции транскрипции. Далее следует КЭП-последовательность ТТГЦТТАЦ, на которой инициируется транскрипция и образуется 5' начальный участок РНК (сайт инициации транскрипции). После этого следует кодон ТАЦ (сайт инициации трансляции) в образуемой мРНК. Между сайтом транскрипции с сайтом трансляции лежит промежуточная область ДНК, составляющая из 50 пар оснований и называется *лидерной последовательностью*. Далее следует *смысловая часть* структурного гена, состоящая из *экзонов и интронов*. Сначала следует экзон, содержащий 90 пар оснований, кодирующих с первой по 30-ю аминокислоты в цепи гемоглобина. Потом интрон из 130 пар оснований, не кодирующих аминокислоты. Опять следует экзон из 222 пар оснований, кодирующих аминокислоты с 31 по 104. Затем интрон, состоящий из 850 пар оснований.

Снова экзон, содержащий 126 пар оснований, кодирующих аминокислоты 105-146. После этого кодон терминации трансляции ТАА. Затем трейлер и сайт полиаденилирования ААТААА, который необходим для присоединения к РНК-транскрипту «хвоста» поли-А, состоящего примерно из 200-300 адениловых остатков. Этот участок ДНК необходим для остановки транскрипции. Последовательность терминатора транскрипции начинается сразу за поли-А участком и состоит примерно из 1000 нуклеотидов. Эта последовательность совместно с поли-А останавливает процесс транскрипции. На расстоянии 600-900 нуклеотидов от поли-А сайта расположена область последовательностей *энхансера*. Этот участок обладает регуляторной активностью этого гена.

Функциональные характеристики структурных генов эукариот

1. Гены являются *дискретными* составляющими сложного наследственно материала – участками ДНК, имеющими определенную последовательность нуклеотидов.

2. Разные гены имеют разный качественный и количественный состав нуклеотидов.

3. Каждый ген имеет определенное место (локус) в хромосоме.

4. Гены способны к рекомбинации (в процессе кроссинговера) и мутации, что обеспечивает изменчивость.

5. В хромосоме есть гены мРНК (структурные гены), рРНК и тРНК.

6. Среди структурных генов есть регуляторные гены, продукты которых регулируют работу других структурных генов.

7. Ген не принимает непосредственного участия в синтезе белков, он является матрицей для образования посредников – различных молекул РНК, непосредственно участвующих в синтезе.

8. Количество генов может удваиваться в процессе репликации, а затем распределяться в дочерние клетки в результате митоза или мейоза.

9. Ген может существовать в виде нескольких аллелей, определяющих варианты признаков.

10. Определенный структурный ген кодирует *синтез одного белка*. Отдельный белок может обуславливать определенный признак. Этим обусловлены моногенные признаки.

11. Клетка, орган или организм, обладают многими сложными признаками, которые слагаются из *взаимодействия* многих генов - это полигенные признаки.

12. Действие гена строго *специфично*, т. к. ген может кодировать только одну аминокислотную последовательность и регулирует синтез одного конкретного белка.

13. Некоторые гены обладают *плейотропностью* действия, определяя развитие сразу нескольких признаков. Например, синдром Марфана.

14. *Дозированность* действия гена заключается в зависимости интенсивности проявления признака (экспрессивность) от количества определенного аллеля. Например, многие заболевания в гетерозиготном состоянии проявляются слабее, чем в гомозиготном.

15. На *активность гена* может оказать влияние как внешняя, так и внутренняя среда.

16. *Конститутивные гены* – это гены, которые постоянно экспрессируются, так как белки, которые они кодируют, необходимы для постоянной клеточной деятельности. Обеспечивают синтез белков «домашнего хозяйства» - белков рибосом, цитохромов, ферментов гликолиза, переносчиков ионов и др. Эти гены не требуют специальной регуляции.

17. *Неконститутивные гены* – это гены, обычно неактивные, но экспрессирующиеся только тогда, когда белок, который они кодируют, нужен клетке. Эти гены регулируются клеткой или организмом. Эти белки обеспечивают дифференцировку и специфичность структуры и функций каждой клетки.

Молекулярные механизмы функционирования генов эукариот

Экспрессия генов

Генная экспрессия - это молекулярный механизм реализации наследственной информации, благодаря которому ген проявляет свой потенциал в конкретном фенотипическом признаке организма. Все этапы экспрессии генов протекают с использованием энергии и обслуживаются десятками разнообразных ферментов. Процесс экспрессии гена состоит из нескольких этапов:



а) код гена ДНК превращается в код про-мРНК. Первый этап экспрессии называется "транскрипцией"; б) сложная молекула про-мРНК подвергается "процессингу", в результате этого значительно уменьшается в размерах. Образуется зрелая мРНК, считывание информации с которой упрощается. Биологический смысл процессинга – облегчение доступа к наследственной информации; в) мРНК при участии тРНК выбирает необходимые аминокислоты и связывает их на рибосоме в строго определенную последовательность полипептида. Процесс переноса информации с мРНК на полипептид называется трансляцией; г) синтезированный полипептид подвергается "модификации" и превращается в активный белок; д) функционируя, белок делает свой вклад в морфологический или функциональный признак (фенотип) клетки или организма. Этот процесс называется «экспрессией».

Рассмотрим схему механизма экспрессии на примере экспрессии гена β -цепи гемоглобина. В процессе транскрипции участвует не только смысловая часть гена, но и другие регуляторные и структурные части. В процессе транскрипции образуется про-мРНК, которая содержит многие элементы, характерные для гена ДНК. Процессинг существенно модифицирует про-мРНК, которая превращается в мРНК и содержит много меньше структурно-функциональных элементов. Трансляция создает на основе мРНК молекулы совершенно другой природы — белки, ничего не имеющие общего с нуклеиновыми кислотами и обладающими совершенно другими свойствами и организацией. Модификация полипептида приводит к еще одному природному явлению — появлению сложной пространственной организации молекулы белка.

Происходит переход линейной информации ДНК и РНК в пространственную организацию протеина, которая в свою очередь является основой специфического пространственного взаимодействия молекул в живом организме, что лежит в основе жизни. В данном случае процесс модификации обеспечивает объединение четырех молекул гемоглобина в единый комплекс, содержащий ген. В результате в результате всех этапов экспрессии появляется признак – способность к транспорту газов (O_2 и CO_2).

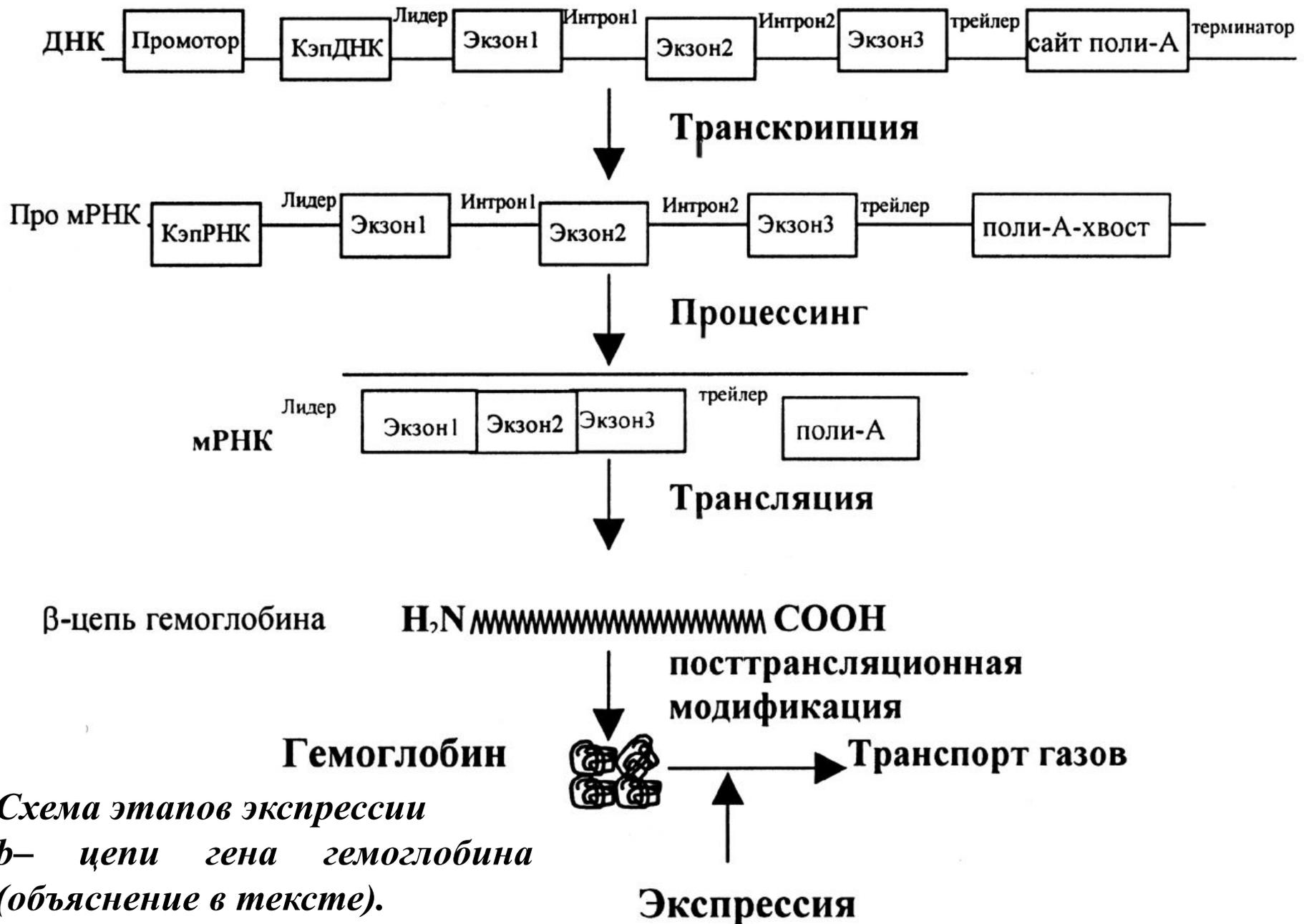


Схема этапов экспрессии β -цепи гена гемоглобина (объяснение в тексте).

Регуляция экспрессии генов

Концепция оперона в регуляции экспрессии генов у прокариот. Ген обычно неактивен, но когда необходим определенный белок, конкретный ген активируется, что обуславливает производство этого белка. Таким образом, клетки имеют механизм, контролирующий количество любого белка в определенное время. Синтез белков регулируется *генетическим аппаратом* и факторами *внутренней и внешней среды*.

Структура оперона прокариот. В 1961 г. два французских биолога Ф. Джакоб и Ж. Моно предложили механизм регуляции генов, названный *гипотезой оперона*.

Оперон – это последовательность специальных функциональных сегментов ДНК, а также структурных генов, которые кодируют синтез определенной группы белков одной метаболической цепи. Например, ферментов гликолиза. Оперон (регулируемая единица транскрипции) состоит из следующих структурных частей:

1. Ген-регулятор, контролирующий образование белка-регулятора.

2. Промотор – участок ДНК, к которому присоединяется РНК-полимераза и начинается транскрипция.

3. Оператор – участок промотора, связывающий белок-регулятор.

4. Структурные гены (цистроны) – участки ДНК, кодирующие мРНК конкретных белков.

5. Терминаторный участок ДНК несет сигнал об остановке транскрипции.

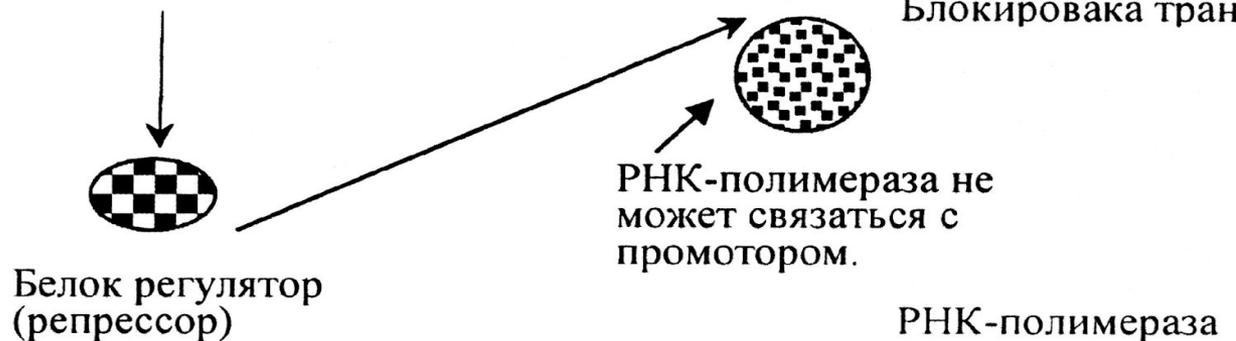
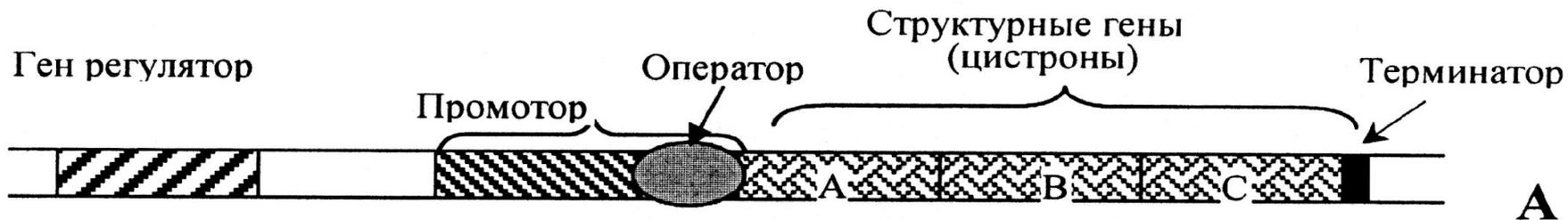
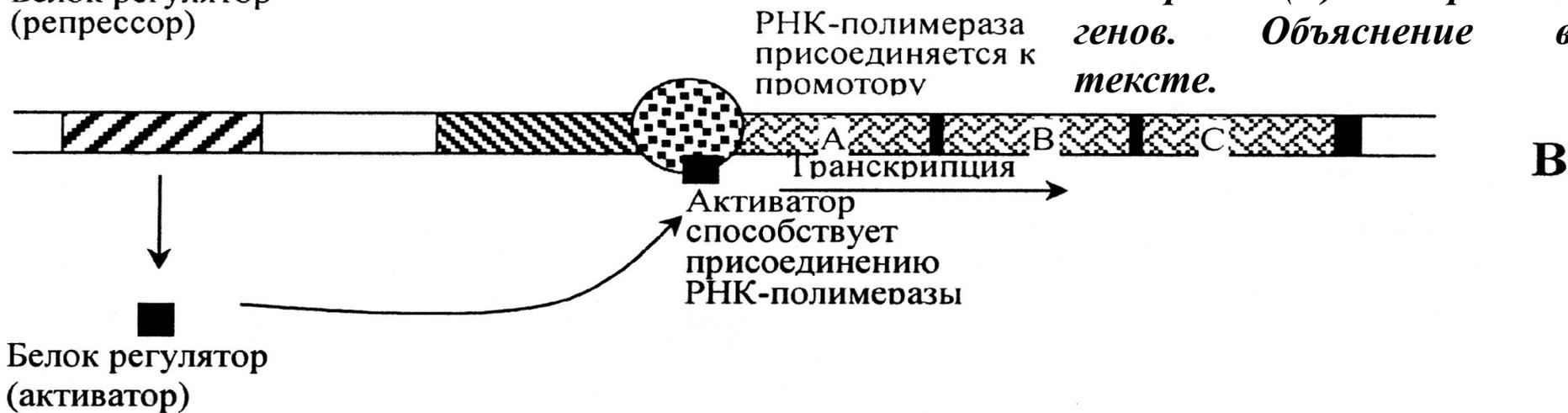


Схема структуры оперона (А). Негативный контроль (Б) и позитивный контроль (В) экспрессии генов. Объяснение в тексте.

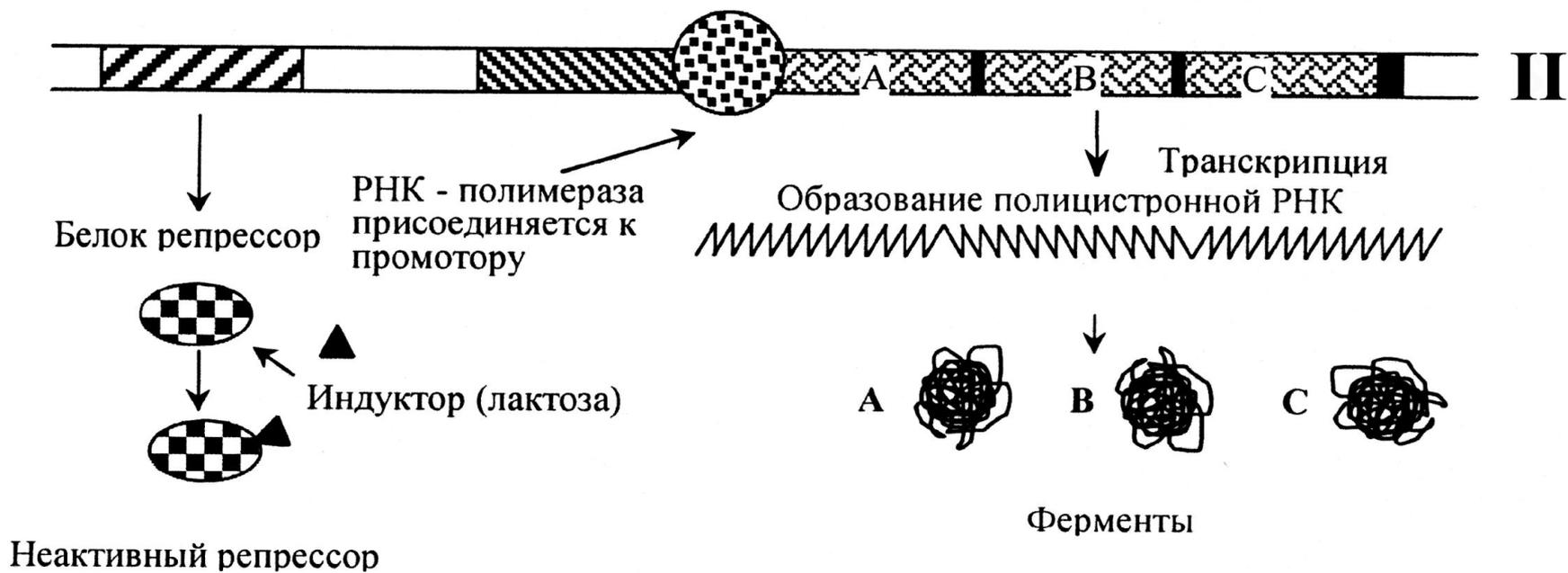
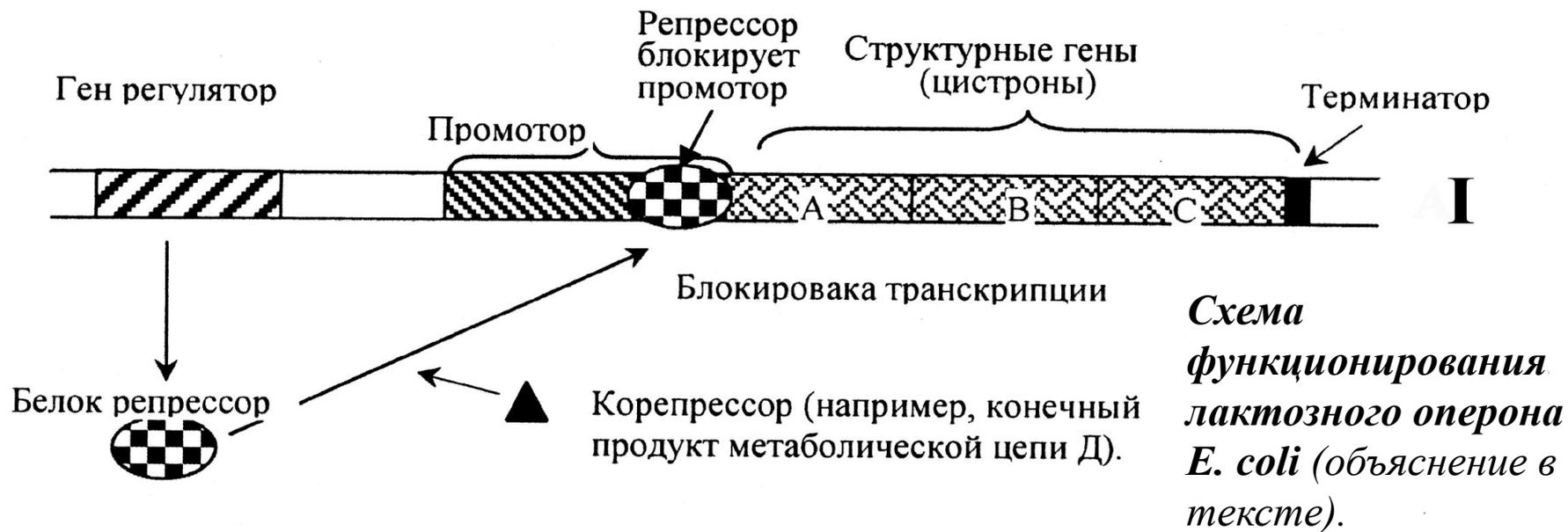


В процессах регуляции экспрессии генов принимают участие также вещества небелковой природы (эфффекторы), взаимодействующие с белками-регуляторами и изменяющими их способность связываться с опероном. Например, конечный продукт метаболической цепи. В зависимости от результатов такого воздействия среди эфффекторов различают *индукторы*, способствующие транскрипции и *корепрессоры*, препятствующие ей.

Функционирование лактозного оперона E. Coli

В своих экспериментах Джакоб и Моно обнаружили, что добавление лактозы к культуре E.coli индуцирует образование сразу трех белков-ферментов: галактозидазы, пермеазы и трансацетилазы, необходимых клетке для расщепления лактозы до глюкозы и галактозы. Гены, кодирующие эти ферменты, соседствуют друг с другом в хромосоме. Их назвали *структурными генами*, или *цистронами*. Они одновременно транскрибируются РНК-полимеразой в одиночную длинную мРНК, которая имеет кодоны для всех трех ферментов. мРНК, транскрибируемая из нескольких генов, называется *полицистронной*. Способность к транскрипции этих цистронов контролируется участком молекулы ДНК – *оператором*.

Операторный локус – это определенный участок оперона, имеющий определенную последовательность нуклеотидов, длиной 27 пар оснований. Этот сегмент ДНК располагается в области *промотора*, к которому перед началом транскрипции присоединяется РНК-полимераза. Промотор расположен перед началом первого структурного гена β -галактозидазы. Цистрон «синтезирует» мРНК, когда оператор включен и прекращает синтез, когда он выключен. Оператор включается или выключается белком, называемым *репрессором*. Его синтез контролируется *регуляторным геном*. Репрессор либо связывается с оператором, подавляя его активность, либо не связывается с ним связыванию РНК-полимеразы и позволяя проявлению активности структурных генов. Таким образом, репрессор является *негативным регулятором*.



Рассматриваем схему функционирования лактозного оперона. *Репрессия* (I). При отсутствии индуктора (лактозы), репрессор связывается с оператором и блокирует транскрипцию, в этом случае ферменты не образуются. *Индукция* (II). Лактоза индуцирует транскрипцию генов, т. к. инактивирует репрессор. К промотору присоединяется РНК-полимераза и начинается транскрипция генов А, В и С. В результате образуются необходимые в данных условиях ферменты. Синтез ферментов может не только индуцироваться, но и подавляться. Например, в результате какой-то цепи реакций в клетке образуется конечный продукт Д в большем, чем это необходимо клетке количестве.

Это может нарушить нормальный ход реакций обмена, поэтому в клетке возникает необходимость остановить данный процесс. Тогда вещество Д вступает в реакцию с соответствующим белком-репрессором и переводит его в *активное состояние*. После этого происходит присоединение репрессора к оператору, тем самым выключается вся система оперона и синтез ферментов прекращается. В данном случае, торможение синтеза производится *конечным продуктом*, образующимся в результате реакции. Такой механизм действия называется регуляцией по *принципу обратной связи*.

Описанный механизм регуляции имеет большое приспособительное значение. Например, согласно имеющейся генетической программе кишечная палочка может синтезировать несколько десятков ферментов, расщепляющих различные вещества, так как состав среды, окружающей бактерии, очень изменчив. В этих условиях постоянное образование всего набора ферментов было бы неэкономичным для клетки так как нецелесообразно продуцировать одновременно 60-80 ферментов, из которых в данных условиях среды могут понадобиться лишь 6-8. Поэтому синтез ненужных в этих условиях ферментов блокирован, а клетки образуют лишь несколько необходимых белков. В природе отбор идет по принципу наибольшей экономии, поэтому клетки, функционирующие более экономично, лучше приспособляются и быстрее размножаются. Это привело к совершенствованию системы регуляции метаболизма.

Особенности экспрессии генов у эукариот

Принципы регуляция экспрессии одинаковы как у прокариот, так и у эукариот. Однако эукариоты, особенно многоклеточные, более сложные организмы и экспрессия их генов сложнее и несколько отличается деталями. В частности, можно отметить следующие особенности экспрессии у эукариот:

1. Геном высших эукариот значительно сложнее. Например, гаплоидный геном человека имеет приблизительно 35 тысяч генов расположенных в 24 (22 аутосомы + X и Y) хромосомах. А у прокариот имеется только одна хромосома и несколько сотен генов.

2. В клетках эукариот ядерная оболочка пространственно разделяет процессы транскрипции и трансляции, хромосомы находятся в ядре, а рибосомы в цитоплазме. Экспрессия генов у эукариот включает гораздо большее число этапов. Поэтому у них есть ряд механизмов регуляции, отсутствующих в клетках прокариот, например процессинг.

3. На экспрессию эукариотических генов оказывает влияние *амплификация генов*. Это многократное увеличение числа копий одинаковых генов, с целью интенсификации синтеза молекул нужных в определенный момент времени. Например, повторяющиеся последовательности ДНК включают сотни копий генов рРНК и тРНК.

4. В отличие от прокариот структурные гены эукариот имеют продолжительные последовательности азотистых оснований, которые не кодируют аминокислот - *интроны*. Между ними расположены последовательности, которые кодируют аминокислоты - *экзоны*. Транскрибируемая из гена РНК, имеет как интроны, так и экзоны. Она называется про-мРНК. Ее интронные области удаляются нуклеазами, а несущие информацию участки - *экзоны*, соединяются вместе. Процесс обработки про-мРНК и превращение ее в мРНК известен как *процессинг*.

5. У эукариот не установлено полной оперонной организации генетического материала. Гены ферментов определенной метаболической цепи могут быть расположены в различных хромосомах. Они обычно не имеют общей системы регуляции в виде гена регулятора, оператора и промотора. Поэтому синтезируемые в ядрах эукариот мРНК моноцистронны. Регуляция активности генов у эукариот сложнее, т.к. в этом процессе участвуют сразу несколько генов-регуляторов, то есть регуляция транскрипции эукариот является *комбинативной*. Например, у эукариот на молекуле ДНК имеется специальная область около промотора. Эта область имеет около 100 пар специальных нуклеотидов (*препромоторный элемент*). К этому участку молекулы присоединяется особый белок – фактор транскрипции. Это обеспечивает успешное присоединение РНК-полимеразы II к промотору.

6. Еще одна особенность генома эукариот – наличие специальных “усиливающих” сегментов ДНК – *энхансеров*. Они могут располагаться на большом расстоянии от промотора. Их функцией является участие в регуляции активности структурных генов. В свою очередь и препромоторный элемент и энхансер регулируется соответствующими регуляторными белками. Некоторые белки-регуляторы обладают координирующим влиянием на активность многих генов, то есть они обладают *плейотропным* действием.

7. Геном эукариот подчиняется регуляторным воздействиям со стороны эндокринной системы организма. Многие гормоны являются индукторами транскрипции. В первую очередь это относится к стероидным гормонам, которые обратимо связываются с белками рецепторами, переносящими их в ядро. Такой комплекс связывается со специфическим участком хроматина, ответственным за регуляцию генов. Например, действие тестостерона активизирует гены, определяющие развитие организма по мужскому типу.

8. Еще одна особенность регуляции активности генов эукариот связана с образованием хроматина - комплекса ДНК с белками хроматина. В таком виде гены в составе нуклеосом неспособны к транскрипции. Поэтому необходимым условием является частичная декомпактизация хроматина и ослабление связей с гистоновыми белками. Однако полная нуклеосомная организация хроматина в ходе транскрипции не утрачивается.

9. Контроль экспрессии генов у эукариот осуществляется также на стадии трансляции. Например, путем воздействия на фактор инициации трансляции. Поэтому, даже при наличии в цитоплазме мРНК, синтеза на ней может не происходить.

10. Некоторые гены эукариот многократно повторены, а определенные же участки ДНК вообще не играют генетической роли, например сателлитная ДНК. Значит, геном эукариот «избыточен». Например, у человека функционирует 2-3% из 35000 всех генов. Кроме этого, в геномах эукариот содержатся последовательности, повторяющиеся несколько десятков, сотен и даже миллионов раз. Среди повторяющихся последовательностей имеются элементы с непостоянной локализацией. Их называют *транспозонами*, или мобильными элементами. Повторяющиеся последовательности выполняют разнообразную биологическую роль: регуляция воспроизведения ДНК, участие в кроссинговере, обозначение границы между экзонами и интронами и др. Уникальная ДНК входит в состав большинства структурных генов, причем более половины ее не бывает активной.

11. Регуляция экспрессии генов эукариот может осуществляться на стадии посттрансляционных изменений (модификация). Например, для образования активной формы белкового гормона инсулина, из молекулы проинсулина вырезаются две цепочки, которые затем сшиваются дисульфидными связями.

12. В процессе синтеза одного белка участвует не один, а много генов. В частности, один или несколько структурных генов, образующих мРНК, примерно 20 генов тРНК, необходимых для переноса 20 различных аминокислот (мономеров белков) и несколько генов рРНК, образующих рибосомы. Функционируют также много других структурных генов: различных ферментов процессинга, трансляции, модификации и тд.

Итак, очевидно, что экспрессия гена в признак у эукариот очень сложный процесс, который регулируется на многих уровнях, в том числе и другими генами. Таким образом, любой признак эукариотического организма является полигенным.

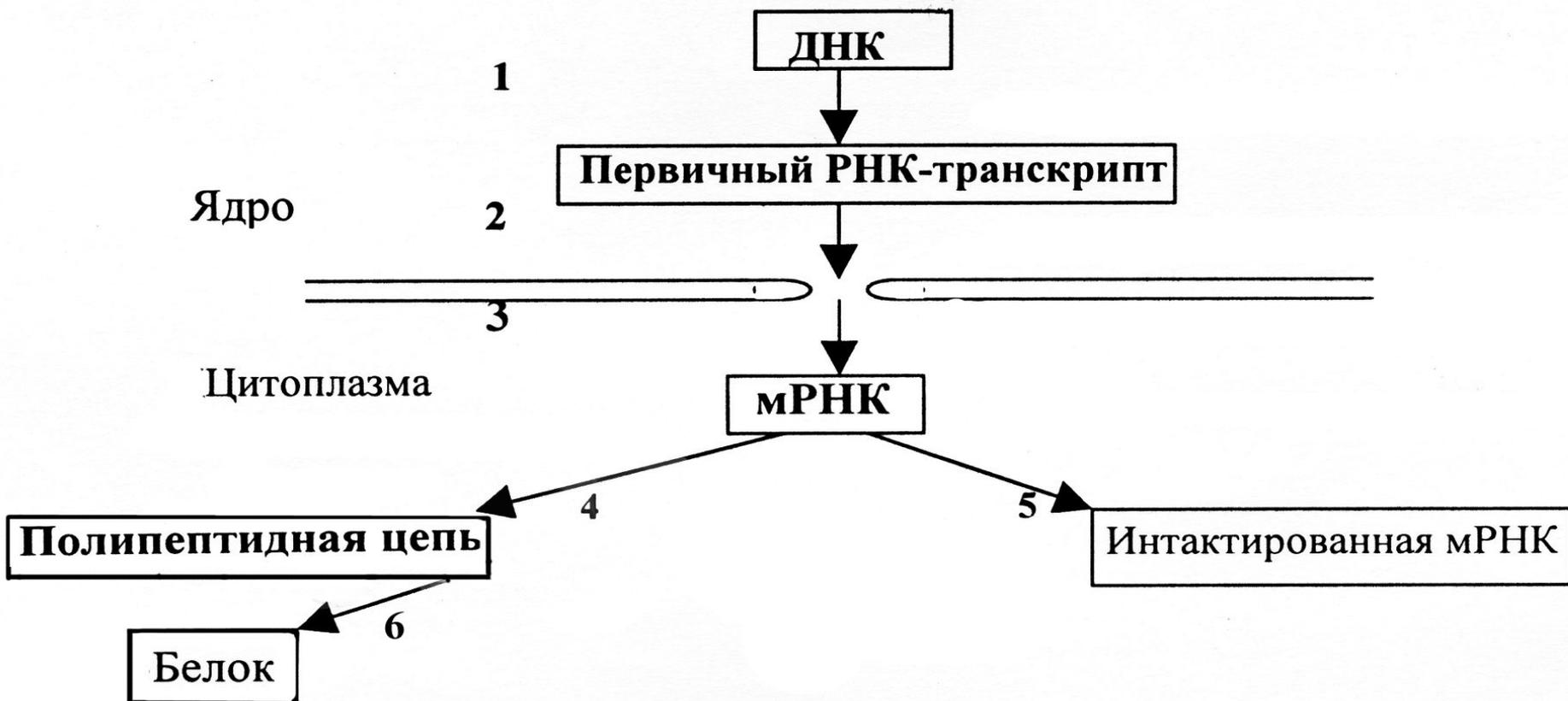


Схема иллюстрирующая шесть уровней, на которых может осуществляться контроль экспрессии генов у эукариот.

1 – контроль на уровне транскрипции;

2 – Контроль на уровне процессинга;

3 – Контроль на уровне транспорта;

4 – Контроль на уровне трансляции;

5 – Контроль на уровне дегградации;

Современное состояние теории гена

В результате исследований элементарных единиц наследственности сложились представления, носящие общее название *теории гена*. Основные положения этой теории следующие:

1. Ген – часть молекулы ДНК, имеющей определенную последовательность нуклеотидов. Представляет собой сложную функциональную единицу наследственной информации, состоящую из различных функциональных сегментов. Число нуклеотидов, входящих в состав различных генов, неодинаково.

2. Гены занимают определенные участки (локусы) в хромосоме.

3. Гены не принимают непосредственного участия в синтезе белков, они являются матрицами для образования посредников – различных молекул РНК, непосредственно участвующих в синтезе.

4. Существуют структурные гены (гены мРНК), а также гены тРНК и рРНК.

5. Структурные гены (гены мРНК) кодируют структуру полипептидов.

6. Расположение триплетов нуклеотидов в структурных генах коллинеарно аминокислотам в полипептидной цепи, кодируемой данным геном.

7. Регуляторные гены (разновидность структурных) контролируют и направляют деятельность структурных генов.

8. Внутри гена могут происходить рекомбинации и мутирование.

9. Молекулы ДНК, способны к репарации, поэтому не всякие повреждения гена ведут к мутациям.

10. Генотип, будучи дискретным (состоящим из отдельных генов), функционирует как единое целое. На функцию генов оказывают влияние факторы как внутренней, так и внешней среды.

Взаимосвязь между генами, ферментами и признаками

Тесная взаимосвязь между генами и ферментами была известна задолго до того, как был установлен механизм экспрессии гена. Она была обнаружена в 1909 г. британским врачом А. Гарродом. Он предположил, что заболевания, наследуемые потомками от родителей, могут быть вызваны недостатком ферментов, которые катализируют превращение одного метаболитического вещества в другое. Он назвал такие заболевания «врожденными ошибками метаболизма». Недостаток фермента связан с отсутствием нормальной аллели гена, который контролирует синтез данного фермента.

Эта концепция в 1945 году была положена в основу гипотезы Дж. Бидла и Э. Татума: *один ген - один фермент*. Это положение утверждает, что каждый ген контролирует синтез своего белка. Но некоторые белки содержат более чем одну полипептидную цепь, например, гемоглобин состоит из 2-х альфа и 2-х бета полипептидных цепей. Значит, образование сложного белка требует участие нескольких генов. Таким образом, гипотеза была уточнена: *один ген — одна полипептидная цепь*. На основе представленной схемы контролируется клеточный метаболизм.

Результатом участия белков в метаболизме является *развитие признака* или *признаков* организмов. Весь процесс от биосинтеза белков и до проявления их свойств можно представить в виде следующей цепи событий:

ДНК → про-мРНК → мРНК → полипептидная цепь → белок → признак.

Внеядерная наследственность

Большинство генетической информации сосредоточено в ядре, где происходят описанные выше процессы. Однако известна так называемая внеядерная наследственность. В первую очередь она связана с наличием ДНК в митохондриях, а также в пластидах растений.

Гены, которые содержатся в ДНК органелл называют плазмагенами. Количество ДНК цитоплазмы невелико по сравнению с ДНК ядер. У разных видов клеток она составляет от 0,15 до 20% от ядерной ДНК. Например, у человека митохондриальная ДНК составляет менее 5%. Цитоплазматические гены, как и ядерные, способны к репликации и мутациям.

Молекулы ДНК пластид и митохондрий обычно замкнуты в кольцо. Особенностью цитоплазматических генов является полицистронная организация. Интронов мало, в пределах десятка, а у иных генов они вовсе отсутствуют. Это говорит о сходстве организации плазматических генов и ДНК прокариот. Плазматические гены в сумме с генами ядра, составляют *цельный геном* клетки.

Гены цитоплазмы, у организмов размножающихся половым способом наследуются по материнской линии, так как в зиготе преимущественно находятся митохондрии женской половой клетки. С мужскими половыми клетками в зиготу, и то не всегда, попадает лишь незначительная часть цитоплазмы.

Кроме органоидов цитоплазмы, наследственные структуры клеток могут быть представлены в виде плазмид. Это в основном небольшие кольцевые ДНК бактериальных клеток. Известны различные по своим функциям плазмиды, например, некоторые бактерии содержат F-плазмиду (фактор пола) - генетический элемент, располагающийся отдельно от крупной кольцевой хромосомы. Одни особи содержат F-положительные, а другие F-отрицательные плазмиды. Это своего рода признак полового диморфизма. Между такими, противоположным по полу, клеткам может происходить половой процесс — конъюгация и обмен плазмидами.

Другая разновидность - R-плазмиды бактерий обуславливают их устойчивость к антибактериальным препаратам. Col-плазмиды бактерий содержат гены синтеза колицинов – токсических белков. Плазмиды, также способны к репликации и мутациям. Известны плазмиды, которые реплицируются не самостоятельно, а в составе хромосомной ДНК чужой клетки, в которую они могут включаться. Такие участки ДНК называются *эписомами*. Плазмиды играют большую роль в природе, осуществляя передачу генетического материала между микроорганизмами, даже относящимися к относительно отдаленным филогенетическим группам.

Митохондриальный геном.

Несмотря на небольшое содержание митохондриальной ДНК в клетках животных, митохондриальный геном определяет целый ряд очень важных признаков, без которых невозможна трансформация энергии клеткой.

Митохондрии стали симбионтами эукариотических клеток свыше 1,5-2 миллиардов лет назад и впоследствии передали большую часть своих генов клеточному ядру. Они являются «энергетическими субстанциями» клеток, поскольку участвуют в преобразовании энергии. Они являются полуавтономными органеллами, т.к. способны частично синтезировать свои белки, регулировать метаболизм и делиться.

Геномы митохондрий различных животных обнаруживает значительную вариабельность по набору генов, порядку их расположения и экспрессии. Подавляюще большинство описанных митохондриальных геномов (mtДНК) представляет собой кольцевые суперспирализованные двухцепочечные молекулы, локализованные внутри митохондриального матрикса. Разные клетки человека содержат от нескольких десятков до тысяч митохондрий. Каждая митохондрия может иметь несколько копий mtДНК.

Высокая концентрация активных форм кислорода в митохондриях и слабая система репарации приводят к увеличению на порядок частоты мутаций mtДНК по сравнению с ядерной (nДНК). Радикалы кислорода являются причиной специфических замен цитозина на тимин и гуанина на тимин, поэтому mtДНК занимает особое место среди высокополиморфных информативных генетических систем. Такая интересная особенность, а также отсутствие кроссинговера позволяет проводить генетическую археологию, то есть исследование генетического разнообразия человеческой популяции посредством анализа вариаций mtДНК и устанавливать корреляционную зависимость между эволюционными группами и определенными митохондриальными заболеваниями, вызванными мутациями mtДНК. Строго материнский характер наследования и отсутствие рекомбинации mtДНК человека обеспечивает эволюцию митохондриального генома путем последовательного накопления мутаций.

У человека mtДНК является небольшой двухцепочной кольцевой молекулой, содержащей 16 569 пар нуклеотидных оснований. Большинство митохондриальных белков кодируется нДНК, и лишь 13 полипептидов (примерно 2%) кодируется mtДНК и синтезируются в митохондриальном матриксе. Удалось определить локализацию многих генов в молекуле ДНК из митохондрий человека. Картирование митохондриальных генов человека (2 гена рРНК, 22 гена тРНК и 13 генов, кодирующих белки) позволило обнаружить несколько особенностей митохондриального генома. Так например, если в цитоплазме клеток человека имеется по меньшей мере 31 тРНК для различных аминокислот, то в митохондриях для осуществления белкового синтеза используются всего лишь 22 тРНК.

Правила кодон-антикодонового спаривания соблюдаются не так строго, т.к. многие молекулы тРНК способны узнавать любой из четырех нуклеотидов в третьей (неоднозначной) позиции кодона. Такое считывание «двух из трех» дает возможность одной тРНК связываться с любым из четырех кодонов, различающихся третьим азотистым основанием. Это позволяет обходиться меньшим числом молекул тРНК, но в то же время делает белковый синтез менее точным. Генетический код в митохондриях несколько видоизменен – 4 из 64 кодонов имеют другие значения для аминокислот, чем при синтезе белков в цитоплазме. Аналогично организованы митохондриальные геномы других млекопитающих.



Схема организации митохондриального генома человека.

Между нДНК и mtДНК геномами существуют четкие различия: а) вся mtДНК содержится в неоплодотворенной яйцеклетке; важнейшей характеристикой mtДНК является неменделевский тип наследования (по материнской линии); б) по сравнению с нДНК, mtДНК имеет относительно небольшие размеры и малый набор генов; в) mtДНК не содержит интронов; г) по своей структуре mtДНК – это кольцевая хромосома, состоящая из двух цепей; д) mtДНК высокочувствительна к мутациями приводящим к так называемым «митохондриальным болезням» (см. главу 5); е) отсутствует ферментная система репарации и рекомбинации.

Мутации ДНК

В молекулах ДНК могут происходить изменения последовательности нуклеотидов. Такие изменения, если они затрагивают функционально активные гены, могут приводить к нарушениям метаболизма или функций (признаков). Если эти изменения не приводят к гибели организма или клетки - они могут передавать по наследству. Следовательно, *генные мутации* – это стабильные изменения структуры генов, повторяющиеся в последующих циклах репликации и проявляющиеся у потомства в виде новых вариантов признаков. Все разновидности мутаций связаны с изменением нуклеотидной последовательности генов.

Причины мутаций.

Ошибки репликации. Они возникают в случае некомплементарного присоединения азотистых оснований в процессе репликации. Если ошибки не были исправлены ДНК-полимеразой, они передаются следующим поколениям в процессе следующей репликации.

Ошибки рекомбинации. Нарушение точности рекомбинаций участков ДНК при кроссинговере ведет к обмену несоответствующими участками хромосом. Это приводит к нарушению нуклеотидного состава ДНК.

Химические мутагены. Химические вещества могут изменять структуру ДНК. Например, аналоги азотистых оснований включаясь в ДНК могут останавливать репликацию или нарушать комплементарность цепей. Формальдегид (НСОН) может «сшивать» между собой ДНК, РНК, белки. Гидрооксиламин (NH₂ОН) – специфически реагирует с цитозином, а его дериваты вместо гуанина связывают аденин. Азотистая кислота (HNO₂) окисляет и повреждает азотистые основания ДНК.

Физические мутагены. В частности воздействие радиации или ультра-фиолетовое излучение (200-400нм) вызывает образование димеров тимина, что нарушает структуру ДНК. В результате останавливается транскрипция, нарушается репликация. Ионизирующая радиация рентгеновские лучи, гамма лучи нарушают структуру пуриновых оснований и фосфодиэфирные связи ДНК.

Биологические мутагены. Например, вирусы, обладающие способностью встраивать свои гены в ДНК клетки хозяина. Тем самым изменяют исходную структуру генетического материала.

Классификация мутаций.

По особенностям структурных изменений можно отметить несколько групп разнообразных мутаций: а) замена одних азотистых оснований другими (*транспозиция*); б) изменение количества нуклеотидных пар в структуре гена (*дупликация*); в) изменение порядка последовательности нуклеотидов в составе гена (*инверсии*); г) разрыв цепей; д) образование сшивок.

Замена азотистых оснований. Причинами этого рода мутаций являются а) ошибки репликации, б) влияние определенных химических агентов. Под воздействием химических агентов может происходить нарушение структуры азотистого основания уже присоединенного нуклеотида. Например, под воздействием азотистой кислоты может происходить самопроизвольное дезаминирование цитозина. В результате этого цитозин превращается в урацил. В дальнейшем, в цикле репликации урацил соединяется с аденином, который в следующем цикле присоединяет тимидиновый нуклеотид.

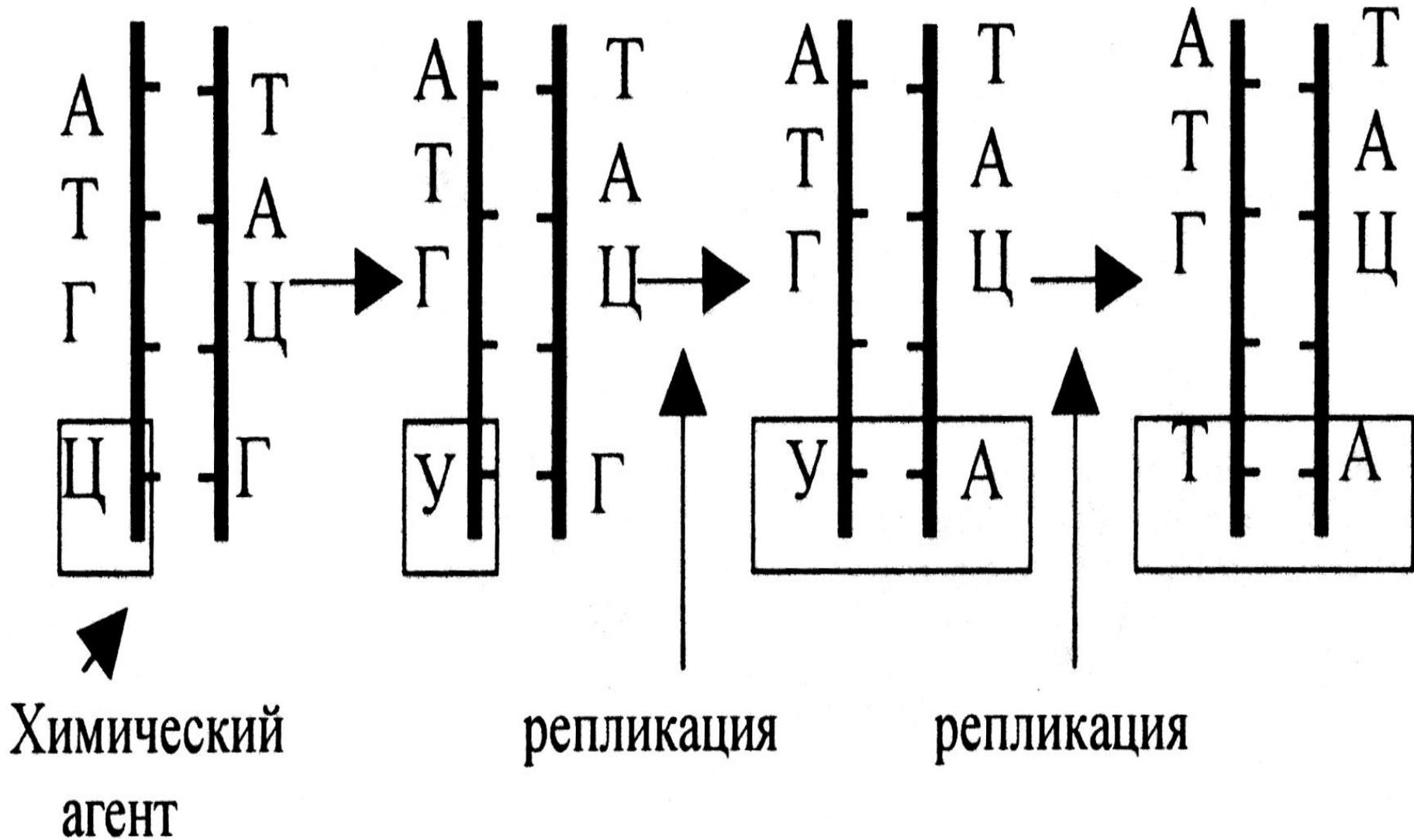
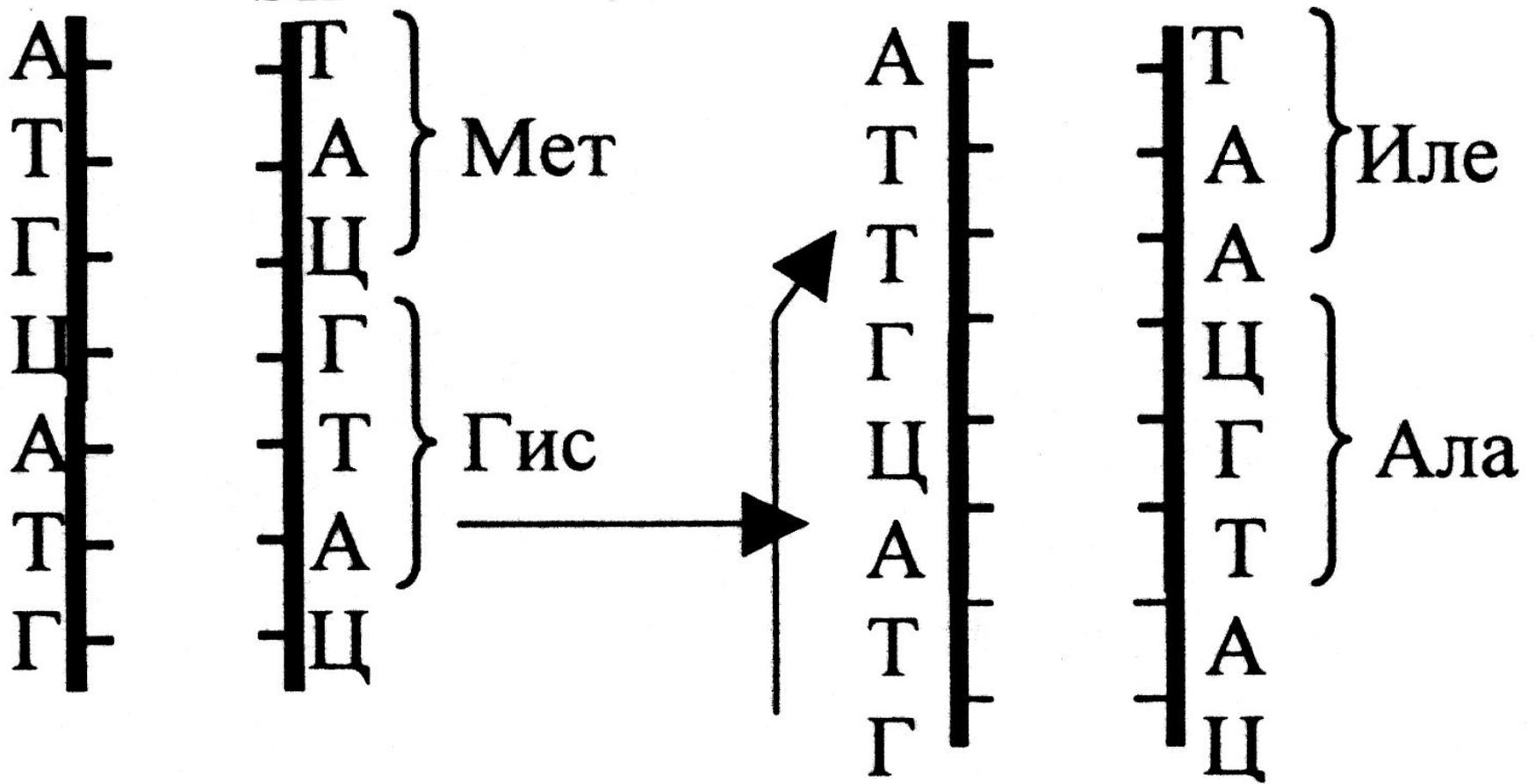


Схема возникновения мутации (транспозиции) по механизму замены одного азотистого основания другим.

Еще одной причиной может быть ошибочное включение в образующуюся цепь ДНК нуклеотида с измененным основанием. Если это остается незамеченным ферментами репарации, измененное основание включается в процесс репликации, что может привести к замене основной пары на другую.

Мутации в результате замены азотистых оснований возникают первоначально в одной из цепей ДНК. Если они не исправляются в ходе репарации, то при последующих репликациях они закрепляются в обеих цепях молекулы. Следствием этого является образование нового триплета в генетическом коде ДНК. Это может отразиться на первичной структуре кодируемого белка, его пространственной организации и функции.

В некоторых случаях замена одной аминокислоты на другую приводит к серьезным последствиям. Например, замена глутаминовой кислоты валином в молекуле гемоглобина приводит к изменению его структуры и функций. В результате этого у человека развивается болезнь – серповидно-клеточная анемия. В ряде случаев замена азотистых оснований может приводить к появлению нонсенс-кодонов, не кодирующих аминокислот. Следствием этого будет досрочное прерывание процесса синтеза. Считается, что замена азотистых оснований приводят в ~ 25 % случаев к образованию триплетов-синонимов, в ~ 5 % случаев – к образованию нонсенс-кодонов, и в ~ 70 % - к возникновению генных мутаций.



Вставка Т-А

Схема возникновения мутации (инсерции) в результате изменения количества нуклеотидов.

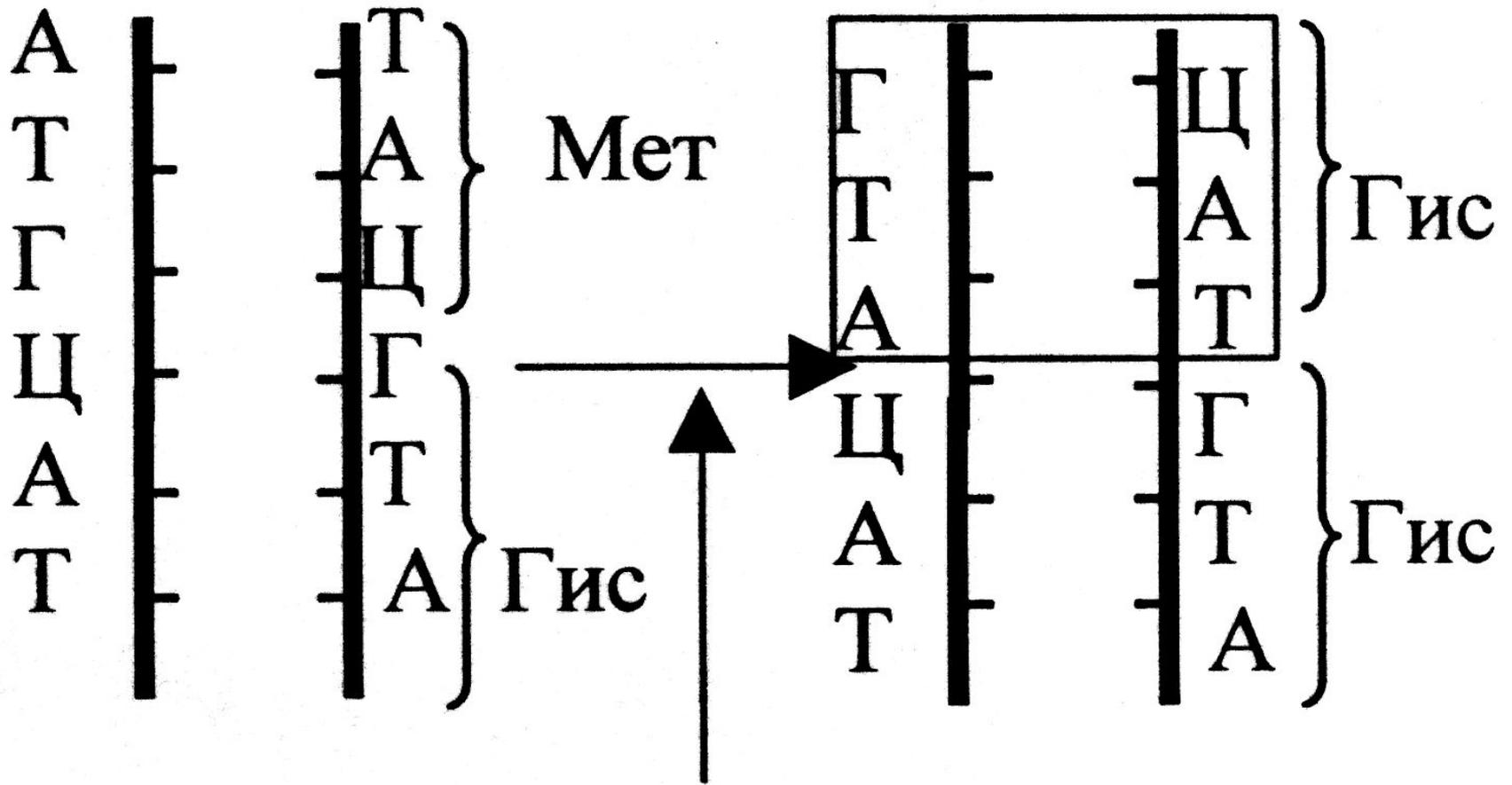


Схема возникновения мутации в результате инверсии.

Изменение количества нуклеотидов в гене. Эта мутация - результате *выпадения (делеции)* или *вставки (инсерции)* одной или нескольких пар нуклеотидов в молекулу ДНК. Такой тип мутаций встречается довольно часто. Указанное изменение происходит вследствие воздействия на ДНК некоторых химических агентов, а также радиоактивного облучения. Результатом этой мутации является сдвиг рамки считывания информации с генетического кода. Следствием этого является синтез полипептидов с измененной аминокислотной последовательностью, нарушение структуры и функций белков, нарушение фенотипа.

Однако если количество восставленных или утраченных нуклеотидов кратно трем, то сдвиг рамки не происходит. В этом случае в белке может появиться лишняя аминокислота или будет на одну меньше. Одной из причин мутаций, приводящих к изменению количества нуклеотидов являются вставки или делеции в результате активности *подвижных генетических элементов*. Это определенные нуклеотидные последовательности, встроенные в геномы многих организмов. Эти структуры ДНК способны самопроизвольно менять свое положение в результате ошибок при рекомбинации.

Изменение нуклеотидной последовательности гена (инверсия). Этот тип мутации связан с поворотом определенного участка ДНК на 180° . Такие нарушения происходят вследствие действия химических агентов и ряда физических факторов на молекулярно-генетические процессы репликации и рекомбинации.

Следствием этого является нарушение нуклеотидной последовательности гена. Это приводит к изменению первичной структуры полипептида, нарушению структуры и функции белка и нарушению фенотипа.

Разрывы одной из цепей могут происходить под действием ионизирующей радиации, в результате повреждения химических связей между нуклеотидами. Повреждения могут восстанавливаться ферментом лигазой.

Сшивка нуклеотидов, например двух рядом стоящих тиминов, происходит под действием ультрафиолетового облучения. Это приводит к ошибкам транскрипции.

Множественные аллели. Формы существования гена называют аллелями. Они располагаются в одних и тех же участках (локусах) гомологичных хромосом. Наличие в генофонде популяции более двух вариантов аллельных генов называют множественными аллелями. Причиной множественного аллелизма являются разнообразные мутации и рекомбинации. Мутации могут происходить в любых участках гена. Они приводят к тому, что один и тот же ген может существовать в нескольких вариантах. Если мутации не вызывают гибели организма, они сохраняются в генофонде вида, чем обуславливают появление нового варианта признака в популяции.

Значение мутаций для организма

В большинстве случаев генные мутации являются неблагоприятными, т.е. снижают жизнеспособность организма. Такие мутации называются *полулетальными*. Если мутации настолько снижают жизнеспособность, что приводят к гибели организма, они называются *летальными*. Иногда возникают мутации существенно не влияющие на жизнеспособность, тогда их называют *нейтральными*. В редких случаях в результате мутаций появляются аллели несущие благоприятные признаки, повышающие способность к выживанию это *полезные* мутации. Обычно вновь возникший аллель является рецессивным по отношению к природному исходному аллелю.

Мутации могут возникать в любых клетках. Если они возникли в половых клетках — их называют *генеративными*. Такие мутации могут передаваться потомкам. Если мутации возникают в соматических клетках — их называют *соматическими мутациями*. Они не передаются потомкам, но могут передаваться дочерним клеткам и оказать существенное влияние на развитие какого либо из признаков организма. Мутации могут возникать внезапно, без видимых причин. В этом случае их называют *спонтанными*. Мутации, которые происходят при направленном действии мутагенных факторов называют *индуцированными*.

Как полуметальные, так и летальные мутации, если они затрагивают доминантные гены обычно не закрепляются в популяции и удаляются вместе с гибнущим организмом, не оказывая существенного влияния на популяцию. Рецессивные летальные или полуметальные мутации в гетерозиготном состоянии могут накапливаться в популяции и обуславливать появление различных патологий. Полезные мутации приводят к появлению благоприятных признаков организма, способствующих их выживанию, приспособлению и распространению. Появляются новые аллели гена, которые закрепляются, и способны передаваться по наследству. Многообразие аллелей (множественный аллелизм) способствует генетическому и фенотипическому разнообразию представителей данного вида, что имеет большое приспособительное и эволюционное значение.

Ограничение неблагоприятного действия мутаций. Частота возникновения мутаций довольно высокая. Большинство из них являются неблагоприятными. Поэтому в организме имеются специальные механизмы, снижающие неблагоприятный эффект мутаций. Во-первых, это способность ДНК-полимеразы осуществлять коррекцию (на основе комплементарности цепей ДНК) при образовании новых цепей ДНК. Существует также специальный фермент – эндонуклеаза, редактирующая структуру дочерних ДНК. Определенную роль в стабильности генотипа играет избыточность генетического кода, а также диплоидность кариотипа соматических клеток. Парность аллелей (диплоидный набор хромосом) препятствует проявлению рецессивных мутаций. К снижению действия вредных мутаций приводит наличие в генотипе нескольких десятков или сотен копий генов (экстракопирование генов), кодирующих жизненно важные белки. Кроме этого существуют специальные молекулярные механизмы репарации ДНК.

Репарация ДНК

Для сохранения основных характеристик клеток и организмов данной популяции необходимо точное сохранение структуры и стабильности функций генетического материала на протяжении тысяч и миллионов лет, несмотря на действие различных мутагенных факторов. Существует несколько причин поддержания стабильной структуры и функции ДНК. Во-первых, это высокая химическая стабильность самой молекулы ДНК, а во-вторых, это наличие специальных механизмов репарации возникающих изменений. Широкий набор различных репликационных ферментов осуществляет непрерывный «осмотр» ДНК и удаление из нее поврежденных нуклеотидов.

Способность клеток к исправлению повреждений в молекулах ДНК получила название *репарации* (лат. reparatio – восстановление). Наследственная информация представлена в ДНК в виде цепей двойной спирали ДНК. Благодаря этому случайное повреждение в одной из цепей может быть исправлено репликационным ферментом и данный участок цепи восстановлен в своем нормальном виде за счет информации содержащийся в неповрежденной цепи.

Классификация репараций

По времени осуществления, в клеточном цикле различают дорепликативную, репликативную и пострепликативную репарацию.

Дорепликативная репарация. Это процесс восстановления поврежденной нити ДНК до ее удвоения. В простейших случаях разрывы могут быть воссоединены ферментом лигазой. В других случаях используется полная ферментативная система репарации (приведена ниже).

Репликативная репарация. Это совокупность процессов восстановления ДНК в ходе репликации. При этом поврежденный участок удаляется в ходе репликации в зоне роста цепи. В обеспечении высокой точности репликации большая роль принадлежит механизму *самокоррекции*, осуществляемому ДНК-полимеразой или тесно связанной с ней ферментом эндонуклеазой. Этот процесс связан с определением ошибочно включенного в цепь нуклеотида, отщепление его и замена на соответствующий. В результате этого частота ошибок снижается в 10 раз (с 10^{-5} до 10^{-6}).

Пострепликативная репарация. Ее механизм точно не изучен. При пострепликативной репарации происходит вырезание поврежденного участка, что изменяет ген. При этом клетка может сохранять жизнеспособность и передавать дефектную ДНК дочерним клеткам. Предполагают возможность различных вариантов синтеза ДНК на поврежденной матрице.

По механизмам репарация подразделяется на: неэксцизионную репарацию и эксцизионную репарацию.

Неэксцизионная репарация.

Фоторепарация. В результате ультрафиолетового облучения целостность молекул ДНК нарушается, так как в них возникают димеры, т.е. сцепленные между собой соседние пиримидиновые основания. Димеры могут формироваться между двумя тиминами, тиминном и цитозином, двумя цитозинами, тиминном и урацилом, двумя урацилами. Однако облученные клетки на свету выживают гораздо лучше, чем в темноте. После тщательного анализа причин этого явления установлено, что в поврежденных клетках на свету происходит репарация ДНК (фоторепарация). Она осуществляется специальным ферментом ДНК-фотолигазой активирующейся квантами видимого света. Фермент соединяется с поврежденной ДНК, разъединяет возникшие в димерах связи и восстанавливает целостность нити ДНК.

Фотореактивирующий фермент ДНК-фотолигаза не является видо-специфичным, т.е. действует на разные виды ДНК. В качестве кофермента в нем имеется цианокобаламин (вит B_{12}), поглощающий кванты видимого света и передающий энергию молекуле фермента. При не эксцизионной световой репарации исправляются повреждения, возникшие только под воздействием ультрафиолетовых лучей. На ранних стадиях эволюции живых организмов, когда отсутствовал озоновый экран, задерживающий большую часть потока губительных для организмов солнечных ультрафиолетовых лучей, фоторепарация играла особенно важную роль.

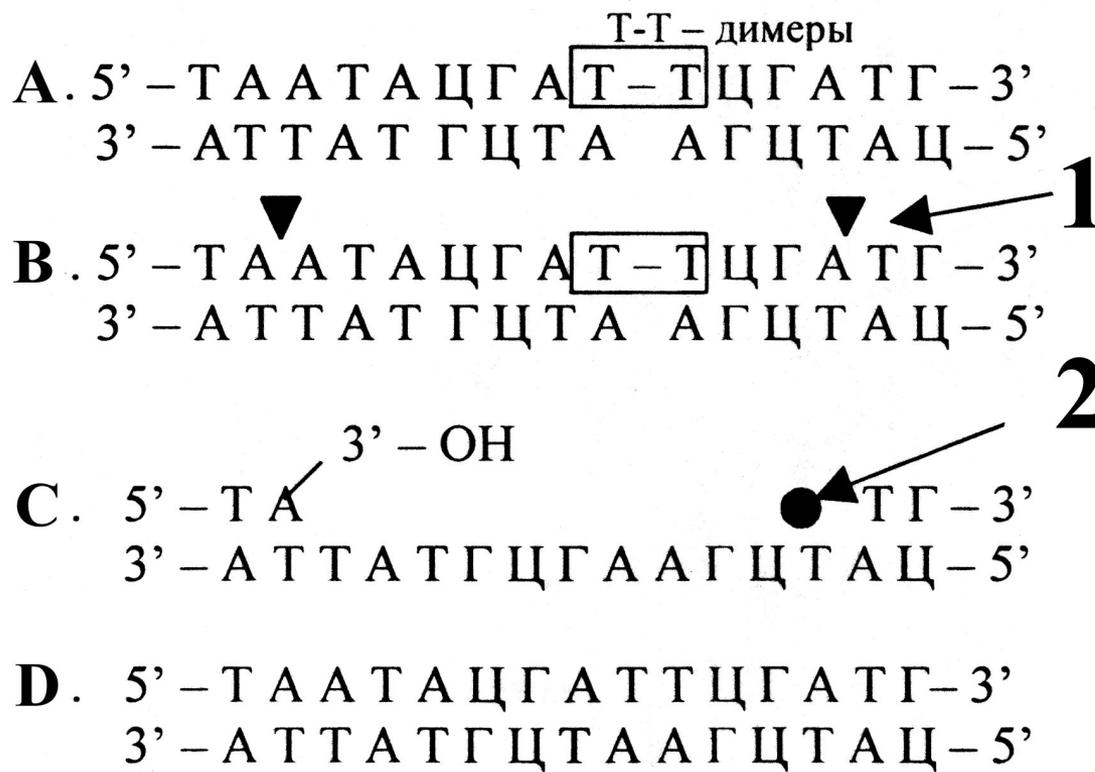


Схема эксцизионной репарации ДНК по удалению Т-Т димера

А. Под действием УФ облучения в цепи ДНК может возникнуть мутация (димер Т-Т). В. Соответствующая эндонуклеаза узнает нарушение и разрезает участок поврежденной цепи ДНК. С. Вырезание и удаление из поврежденной цепи обширного участка (включающего димер) ДНК-полимеразой, обладающей экзонуклеазной активностью. D. Матричный синтез вырезанного участка цепи с помощью ДНК полимеразы и соединение его с неповрежденным участком. 1 – эндонуклеаза; 2 – ДНК – полимераз

Эксцизионная репарация. При эксцизионной репарации устраняются повреждения, появившиеся под влиянием ионизирующей радиации, химических веществ и других факторов. Это основной тип репарации, который обнаружен как у прокариот, так и в клетках эукариот. Механизм эксцизионной (вырезающей) репарации ДНК отличается тем, что не только разрезаются димеры (как при световой), но и вырезаются большие участки молекулы ДНК (до нескольких сотен нуклеотидов). Видимо, могут удаляться целые гены, после чего происходит репаративный комплементарный матричный синтез с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Следствия нарушения процесса репарации

К настоящему времени обнаружено несколько мутаций, проявляющихся как тяжелые врожденные заболевания из-за нарушения процесса репарации. Примером может служить пигментная ксеродерма – редко встречающаяся рецессивная аутосомная мутация. У таких детей отсутствует один из ферментов репарации ДНК. Дети, гомозиготные по этой мутации, при рождении выглядят нормально, но уже в раннем возрасте под влиянием ультрафиолета солнечного света у них появляются изменения кожи: веснушки, расширение капилляров, ороговение кожи, бывает и поражение глаз, что связано с повреждением ДНК. В фибробластах, взятых из кожи больных пигментной ксеродермой, процесс репарации после ультрафиолетового облучения затягивается до 30 ч (в клетках здоровых людей – 6 ч) и не достигает уровня нормального.

Длительное воздействие ультрафиолета приводит, в конце концов, к возникновению рака кожи и летальному исходу. Способность клеток осуществлять эффективную репарацию генетического материала может иметь значение так же в клеточных механизмах старения. Так долгоживущие линии мышей отличаются более стабильными хромосомами, а у мышей с короткой продолжительностью жизни хромосомы отличаются большей повреждаемостью, возникновением структурных aberrаций, являющихся следствием нарушения процессов репарации. Есть наблюдения, показывающие снижение интенсивности процессов репарации ДНК с возрастом.

Генная инженерия. Технология рекомбинантных ДНК

В начале 1970-ых молекулярные биологи разработали принципиально новые технологии, основанные на открытиях в области молекулярной генетики, это представило огромные перспективы манипулирования генетическим материалом. Эти технологии получили название “технологии рекомбинантных ДНК“, часто называемые “генной инженерией“. Эти технологии революционизировали биологию и оказали огромное влияние на медицину. С их помощью можно производить обмен генетической информацией между хромосомами, создавая новые геномы. Например, можно получать трансгенные организмы, бактерии экспрессирующие гены человека, проводить генную терапию человека и др. Таким образом, *генная инженерия* – это раздел молекулярной генетики, использующий различные методы манипуляций с нуклеиновыми кислотами (технологии рекомбинантных ДНК) для целенаправленного изменения генетических программ и создания новых генотипов.

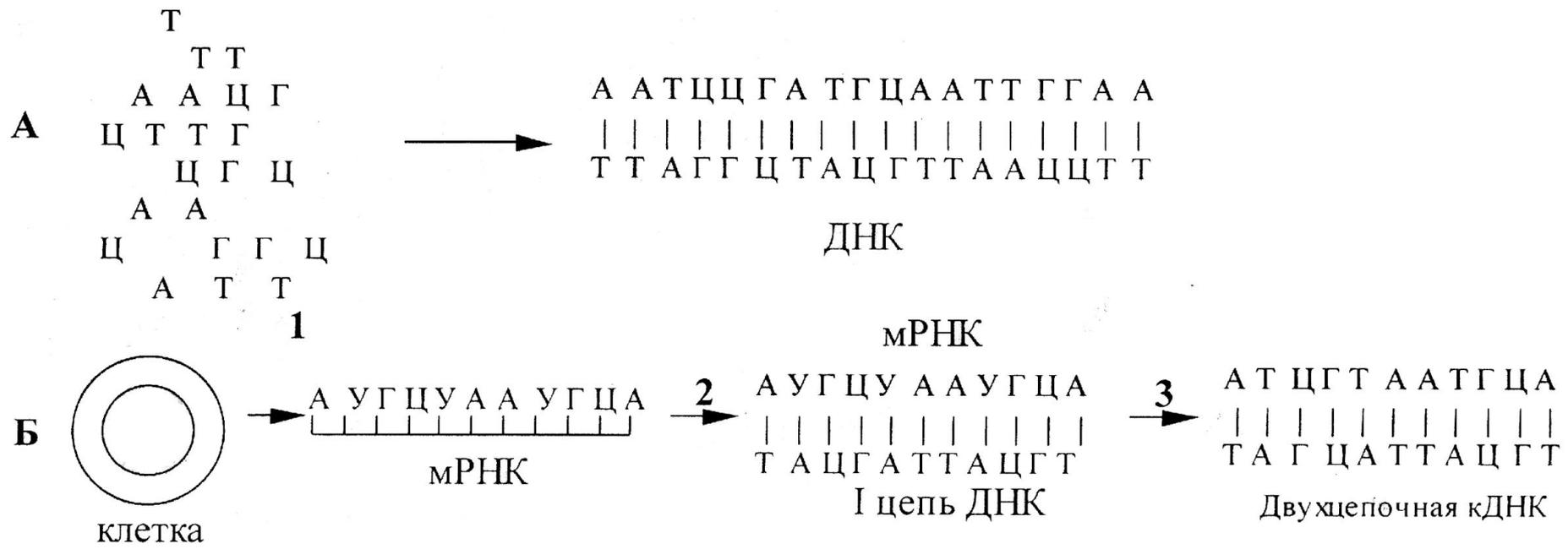
Генная инженерия состоит из следующих основных этапов: а) получение генетического материала, содержащего нужные гены; б) включение этих генов в автономную генетическую систему (вектор), способную к репликации и встраиванию в чужой геном; в) введение этой системы в реципиентную клетку, где новые гены входят в состав ДНК. На указанных этапах используется много молекулярно-генетических подходов и методов. Рассмотрим некоторые из них.

Получение генетического материала.

Генетический материал можно получать двумя способами: путем химического синтеза и путем ферментативной рестрикции ДНК.

Химический синтез осуществляется из нуклеотидов в специальных условиях (рис. 4.34 А) на основе полностью расшифрованной нуклеотидной последовательности определенного участка ДНК. Искусственный ген аланиновой тРНК был впервые синтезирован Г. Кораной в 1970 г. этот ген состоял из 77 пар нуклеотидов, но не имел регуляторных отделов и поэтому не функционировал. Спустя несколько лет Корана синтезировал ген тирозиновой тРНК, содержащей промотор и терминатор. Этот ген, введенный бактериям функционировал как натуральный. В настоящее время синтезировано уже много разнообразных генов.

Синтез некоторых генов можно проводить также с помощью мРНК и ферментов обратной транскрипции. В определенных условиях на матрице мРНК с помощью специальных ферментов ревертаз синтезируется комплементарная цепь ДНК. Затем на ней как на матрице образуется вторая цепь ДНК. Такая искусственно полученная молекула называется *ДНК-копией* или *к-ДНК*.



Схемы путей синтеза генетического материала. А – синтез из нуклеотидов; Б – синтез на основе обратной транскрипции мРНК; 1 – получение мРНК из клеток; 2 – обратная транскрипция; 3 – образование двухцепочечной кДНК.

Рестрикция ДНК – это процесс «разрезания» молекул ДНК прокариот и эукариот специальными ферментами, что позволяет получать участки содержащие определенные гены. Одним из важнейших инструментов генной инженерии являются – эндонуклеазы, ферменты, расщепляющие ДНК по специфическим последовательностям нуклеотидов внутри цепи. Эти ферменты получили название *рестриктаз*. Рестриктазы расщепляют ДНК на относительно небольшие фрагменты в участках строго определенных последовательностей. Этим их воздействие отличается от большинства других ферментативных, химических или физических воздействий, проводящих к случайным разрывам цепей ДНК. Рестриктазы (уже открыто более 200 типов ферментов этого класса) являются частью защитной системы бактерий, охраняющих собственный геном от чужеродной, главным образом, вирусной ДНК.

При расщеплении ДНК какой-либо одной рестриктазой получают смесь фрагментов, каждый из которых имеет одни и те же концевые участки. Такие фрагменты можно разделить и идентифицировать методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле.



Схема рестрикции ДНК(А) и образование рекомбинантной (химерной) ДНК (Б). 1. Рестриктазы распознают определенные нуклеотидные последовательности ДНК и «разрезают» ее в местах, обозначенных стрелками. 2. Фрагменты исходной ДНК с «липкими концами», готовыми к комплементарному взаимодействию. 3. Фрагмент «чужой» ДНК, полученный также после рестрикции тем же видом рестриктазы. 4. Рекомбинантная (химерная) ДНК, состоящая из «своих» и «чужих» генов.

Включение фрагментов ДНК в вектор (образование химерных ДНК)

Вектор – это нечто вроде молекулярного «такси», способного переносить чужую ДНК внутрь клетки-хозяина таким образом, чтобы она там могла реплицироваться. Существуют два основных типа векторов: бактериальные плазмиды и бактериофаги.

Бактериальные плазмиды—это небольшие кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК, в функции которых входит, например, обеспечение устойчивости к антибиотикам. Плазмиды обладают несколькими свойствами, которые делают их чрезвычайно удобными для использования в качестве векторов.

В частности в бактериальной клетке они могут существовать во множестве копий, могут реплицироваться независимо от хозяйской ДНК, для многих плазмид известна полная нуклеотидная последовательность. Это делает возможным точную локализацию сайтов рестрикции для клонирования фрагментов ДНК. Плазмиды значительно меньше хозяйской хромосомной ДНК и поэтому могут быть легко отделены от нее. Клонированный фрагмент легко выделяется из рекомбинантной плазмиды посредством ее расщепления той же рестриктазой.

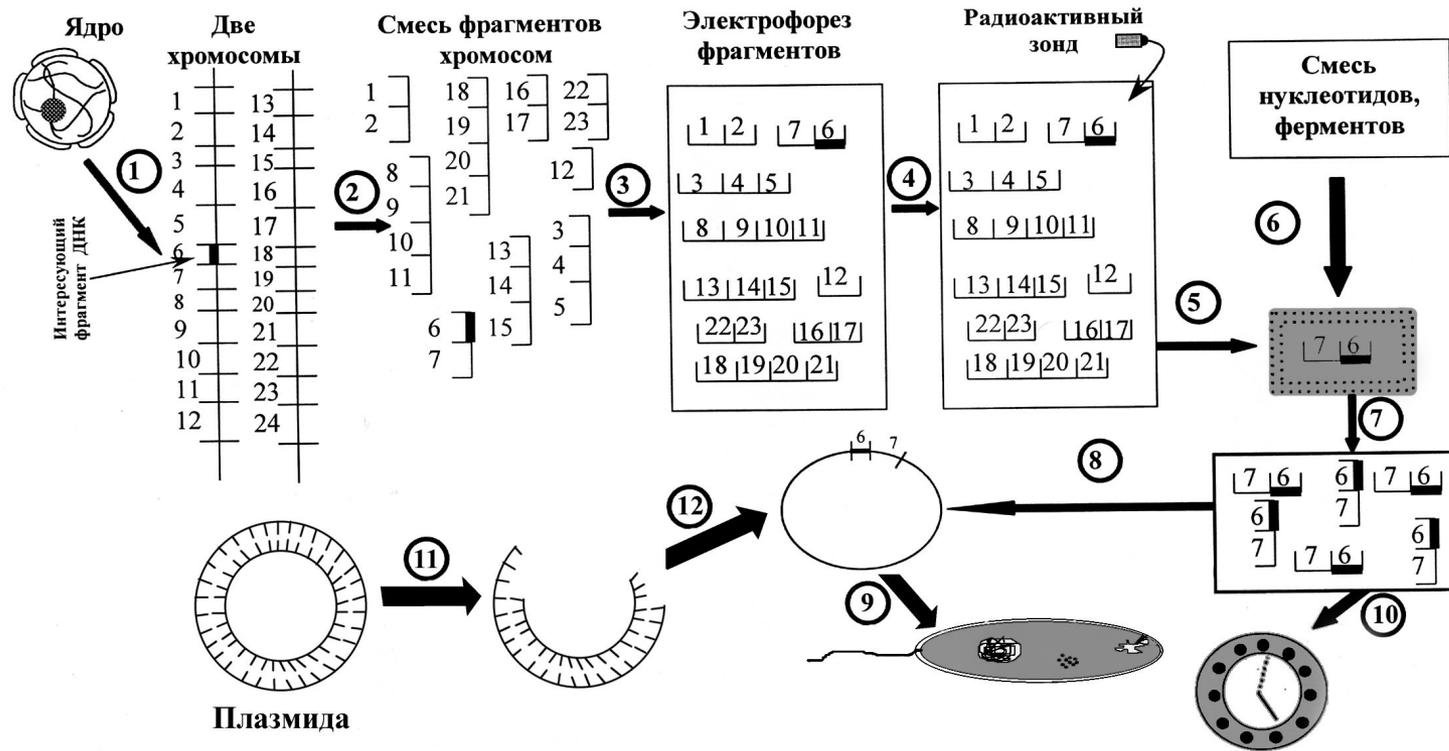


Схема основных этапов и методов генной инженерии: 1 – получение ДНК из ядер; 2 – рестрикция ДНК на фрагменты (фрагмент 6 содержит интересующий нас ген); 3 – разделение фрагментов с помощью электрофореза; 4 – идентификация интересующего нас фрагмента методом гибридизации со специальным ДНК-зондом; 5 – выделение нужного фрагмента; 6 – синтез нужного фрагмента; 7 – клонирование фрагментов методов ПЦР; 8 – включение фрагмента в плазмиду (вектор); 9 – введение плазмиды в бактерию, 10 – введение фрагмента ДНК непосредственно в ядро клетки-реципиента; 11 – рестрикция плазмиды; 12 – включение в плазмиду фрагмента ДНК.

Фаги обычно содержат линейную ДНК, в которую могут быть встроены фрагменты чужеродной ДНК по какому-либо из доступных сайтов рестрикции. Основным преимуществом фаговых векторов перед плазмидными является то, в них удастся встраивать в 2-3 раза более крупные фрагменты «чужой» ДНК.

Необходимые гены вырезаются из хромосом животных, инкубируются с плазмидами или фагами, которые также разрезаны специальными рестриктазами. Через некоторое время фрагменты разных ДНК соединяются в соответствии с принципом комплементарности и ДНК плазмиды восстанавливает исходную кольцевую форму.

Так можно соединять отрезки ДНК, полученные из разных клеток и создавать комбинации разнообразных генов в одной молекуле. Для соединения участков ДНК применяют лигазу – один из ферментов репарации. Процесс ковалентного соединения «липких» концов фрагментов ДНК называют «лигированием». Используя различные рестриктазы и лигазы, можно разрезать и сшивать нить ДНК в разных местах и получать разнообразные рекомбинантные (химерные) молекулы.

Введение в геном реципиента.

Вектор, включающий в себя фрагменты чужеродной ДНК, должен, проникать в *реципиентные клетки*, выбранные для клонирования гена. Эти клетки могут быть как про- так и эукариотическими. Чаще всего для этой цели используют бактерии, поскольку их легко получать в большом количестве. Встроенные в плазмиды чужие гены передаются в клетку хозяина путем трансдукции и встраиваются в их геном, где способны к быстрой репликации с помощью ферментов клетки-хозяина. Процесс быстрого получения большого количества одинаковых копий молекул называется *клонированием*. Клон – это большая популяция идентичных молекул, клеток, организмов, полученных от одного предка. Путем клонирования вектора в реципиентных клетках можно обеспечить получение большого количества нужного гена в высокоочищенном виде или большого количества белка, кодируемого данным геном. В геном животных фрагменты чужой ДНК вводят путем микроинъекции непосредственно в ядро клетки.

Основные методы генной инженерии

Полимеразная цепная реакция. Для проведения генетического анализа необходимо достаточно большое количество нужных фрагментов ДНК. Раньше это решалось трудоемким и медленным способом клонирования ДНК через бактерии. Теперь эта задача – накопления нужных фрагментов ДНК – решается с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Открытие данной реакции совершило подлинную революцию в изучении генома человека и молекулярно-генетической диагностике наследственных болезней. Это метод быстрого увеличения количества фрагментов ДНК вне живых клеток (*in vitro*). Он позволяет получить тысячи копий нужного фрагмента ДНК в течении нескольких минут. Причем, исходно требуется очень незначительное количество материала.

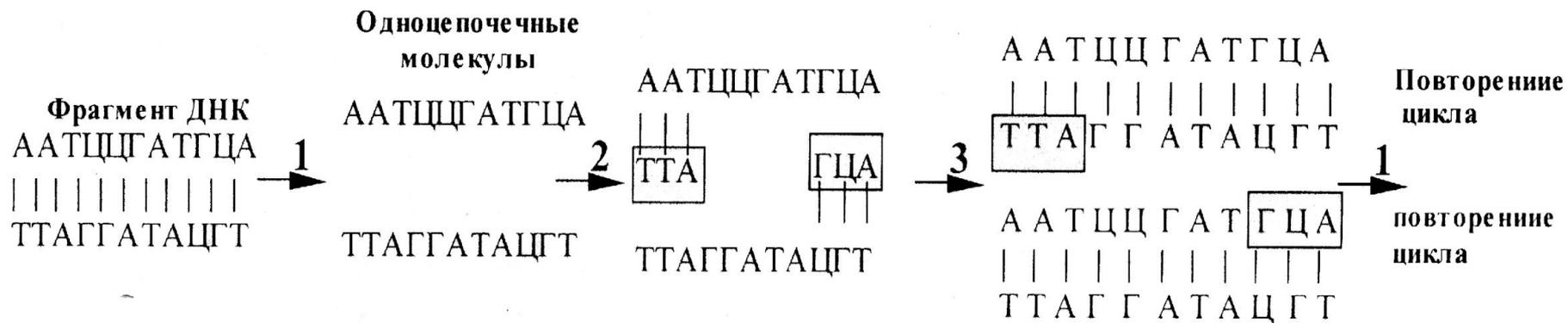


Схема клонирования нужного фрагмента ДНК с помощью ПЦР. Цикл состоит из нескольких этапов, которые многократно повторяются. 1 – разделение фрагмента ДНК на две одноцепочечные молекулы; 2 – присоединение праймеров (ТТА и ГЦА); 3 – синтез двухцепочечных молекул ДНК.

Необходимым условием для проведения ПЦР является знание нуклеотидной последовательности амплифицируемого фрагмента или по крайней мере части этого фрагмента. В соответствии с нуклеотидной последовательностью концов исследуемого участка синтезируется два олигонуклеотидных *праймера* инициатора синтеза ДНК (для затравки процесса ПЦР). Длина праймеров составляет 20-30 нуклеотидов. Процесс клонирования заключается в осуществлении многократно повторяющихся циклов. Каждый цикл включает 3 стадии: а) температурная денатурация ДНК (разделение двухцепочечной ДНК на одноцепочечные молекулы); б) присоединение праймеров к комплементарным последовательностям одноцепочечных молекул (отжиг); в) синтез полинуклеотидных цепей на одноцепочечных молекулах в границах присоединенных праймеров с помощью ДНК-полимеразы.

Электрофорез. Электрофорез фрагментов ДНК обеспечивает разделение разнообразных фрагментов ДНК в агарозном или полиакриламидного геле. Фрагменты ДНК движутся с разной скоростью в геле, помещенном в постоянное электрическое поле от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется в электрическом поле). После окончания электрофореза каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде отдельной полосы в конкретном месте геля. Длину каждого фрагмента можно определить путем сравнения пройденного фрагментом расстояния с расстоянием, пройденным стандартными образцами ДНК.

Идентификация сегментов ДНК. Визуализация и идентификация фрагментов ДНК является либо конечным этапом диагностики, либо необходимым элементом дальнейшего анализа. Для этого после окончания ПЦР проводится электрофорез в агарозном геле, после чего гель обрабатывается этидил бромидом, который связывается с ДНК. При УФ-облучении поверхности геля выявляется свечение фрагментов ДНК в красной области спектра.

Идентификация конкретных фрагментов в геле среди многочисленных фрагментов геномной ДНК является более сложной задачей. Из-за больших размеров генома человека после рестрикции образуется настолько большое число рестриктных фрагментов, что агарозный гель после электрофореза и окраски этидия бромидом при УФ-облучении выглядит как более или менее равномерно окрашенная поверхность, на которой невозможно выявить специфические фрагменты ДНК. Такую задачу решают с помощью блот-гибридизации.

Зонды и гибридизация ДНК. Для выявления специфического клона молекул ДНК, а также при количественном определении ДНК или РНК используются различные типы молекулярных зондов. Как правило, - это фрагменты ДНК или РНК, содержащие меченые ^{32}P -нуклеотиды. Работа с зондами основана на способности последних «узнавать» комплементарные им последовательности в молекулах ДНК или РНК и специфически связываться с ними. Этот процесс называется *гибридизацией*. Наиболее распространенный метод поиска специфических последовательностей основан на применении синтетических олигонуклеотидов, последовательность нуклеотидов в которых подбирается по аминокислотной последовательности небольшого участка искомого белка.

Длины олигонуклеотидного зонда в 15—20 звеньев оказывается достаточно для достоверной гибридизации и обнаружения уникального гена. кДНК-зонды используются также для выявления после электрофореза специфических фрагментов ДНК или РНК и переноса их в нужные исследователю условия.

Все разновидности методов гибридизации, базируются на специфических взаимодействиях пар оснований комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Точное соответствие последовательностей гибридизующихся фрагментов приводит к быстрому образованию прочного устойчивого комплекса. Методы генной инженерии чрезвычайно чувствительные и точные. Они позволяют выделить специфический ген из целого генома, среди миллиона сходных элементов. Идентификация последовательности длиной в 10 нуклеотидов требует чувствительности, соответствующей выявлению 1 элемента из 3×10^8 . Серповидноклеточная анемия вызвана заменой только 1 основания в геноме, т. е. 1 элемента из 3×10^9 . Достигнутый сегодня уровень развития методов генной инженерии достаточен для работы на таком уровне чувствительности.

Секвенирование - определение нуклеотидной последовательности ДНК. В настоящее время разработаны методы определения полной нуклеотидной последовательности любой молекулы ДНК. При решении этой задачи необходимо иметь большое количество идентичных фрагментов молекул ДНК. Нарработку интересующих последовательностей можно осуществить клонированием соответствующего фрагмента, например, методом ПЦР. Метод секвенирования по Максаму-Гилберту основан на химическом расщеплении ДНК по определенному основанию.

Другой ферментативный метод (метод Сэнгера) базируется на применении аналогов нуклеотидов, прерывающих синтез комплементарной цепи ДНК по одноцепочечной матрице в месте встраивания в цепь соответствующего аналога. Секвенирование позволяет определить полную нуклеотидную последовательность всех хромосом, всего ДНК любого генома, любого организма. Это уже почти полностью сделано для некоторых бактерий, мухи дрозофилы, мыши и человека. Кроме этого этот метод позволяет определить последовательность нуклеотидов любых генов, что дает возможность их синтеза.

Ферменты генной инженерии. В перечисленных подходах и методах генной инженерии в качестве «инструмента» используются многие ферменты. Ряд используемых ферментов и их функции представлены в таблице.

Фермент	Реакция	Область приложения
1. Рестриктазы	Расщепляют ДНК по специфическим последовательностям нуклеотидов	Получение фрагментов ДНК, создание химерных молекул ДНК
2. Нуклеаза	Деградация как 5'-, так и 3'-концов ДНК	Введение концевых делеций в молекулы ДНК
3. ДНК - лигаза	Катализирует образование связей между молекулами ДНК	«Сшивание» фрагментов молекул ДНК
4. ДНК – полимераза I	Синтез двухцепочечной ДНК по ДНК-матрице	Синтез двухцепочечной кДНК;
5. ДНКаза I	Вносит одноцепочечные разрывы в ДНК	Картирование участков в ДНК
6. Экзонуклеаза III	Удаляет нуклеотиды с 3'-концов ДНК	Секвенирование ДНК
7. λ – Экзонуклеаза	Удаляет нуклеотиды с 5/-концов ДНК.	Секвенирование ДНК
8. Обратная транскриптаза	Синтезирует ДНК по РНК-матрице	Синтез кДНК по мРНК; картирование ДНК

Применение генной инженерии в сельском хозяйстве.

Рогатый скот, имея модификационный ген гормона роста приобретает способность к быстрому росту и быстро набирает большую мышечную массу, при том же объеме питания. Причем нет факторов свидетельствующих о том, что ген гормона роста влияет на качество мяса. Он так же увеличивает продукцию молока. Недалек тот час, когда у нас будут «генетические фермы» организмов, где гормон роста, либо интерферон либо другие ценные продукты будут продуцироваться животными, а не бактериями. Генная инженерия растений, несомненно, тоже имеет огромное значение для человека. Использование технологий генной инженерии в сельском хозяйстве позволяет получать новые сорта растений с новыми, нужными человеку, свойствами.

Благодаря генной инженерии вскоре станет возможным синтез натуральных пестицидов. Можно будет выращивать модифицированные безвредные растения желаемого качества. В растениях, содержится малое количество белков и аминокислот, что снижает их пищевую ценность. Но если бы удалось добиться синтеза растениями «животных» белков путем пересадки соответствующих генов, они бы стали более качественными и полезными продуктами питания человека и с/х животных. Разрабатываются методы трансплантации комплекса генов формирующих засухоустойчивость или морозоустойчивость, резистентность к вредителям, фиксацию азота (включение атмосферного азота в органические молекулы) и другие качества культурных растений.

Использование методов генной инженерии в медицине

Геномные библиотеки и кДНК библиотеки.

Подобрав соответствующие условия рестрикции и клонирования, можно добиться того, что в наборе клонированных фрагментов будут содержаться практически все гены данного генома. Такие коллекции клонов, полученные от конкретного генома, называют геномными библиотеками. Геномная библиотека готовится из тотальной ДНК клеточной линии или ткани.

В отличие от геномной библиотеки библиотека кДНК готовится из мРНК ткани. Библиотека кДНК также состоящая из всех генов данного генома готовится в несколько этапов. Сначала выделяют тотальную мРНК ткани. Затем с помощью обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы проводят обратную транскрипцию мРНК в двухцепочечную ДНК (кДНК). Указанные «библиотеки» используются для изучения нуклеотидной последовательности, локализации генов, их структуры и патологии.

Картирование генов. Это совокупность подходов и методов, с помощью которых можно каждый ген отнести к определенной хромосоме. Благодаря применению двух основных методов—гибридизации соматических клеток и гибридации ДНК — установлена хромосомная локализация ряда генов, ответственных за некоторые заболевания.

Пренатальная диагностика. Дородовая диагностика наследственных заболеваний возможна, если известна природа генетического нарушения и имеется соответствующий зонд. Анализу можно подвергнуть ДНК клеток, собранных из 10 мл амниотической жидкости (или полученных с помощью биопсии ворсинок хориона). После рестрикции, ПЦР и гибридизации со специальным зондом можно с уверенностью предсказать развитие болезни. Уже сейчас существуют зонды для дородовой диагностики многих наследственных заболеваний.

Использование микроорганизмов для получения белков. Лечение больных диабетом путем ежедневного введения инсулина полученного от свиней, рогатого скота либо других млекопитающих иногда вызывает иммунологические реакции. В последние годы стало экономически доступно использование технологий рекомбинации ДНК для использования бактерий продуцирующих человеческий инсулин в результате имплантации в бактерию гена человеческого инсулина.

Возможности генной терапии. Заболевания, вызванные функциональной недостаточностью продукта того или иного гена, можно лечить с помощью генной терапии. Стратегия подхода заключается в получении нужного гена, в его клонировании, а затем включение в неполноценный геном клетки хозяина. Весьма перспективным представляется использование для этого стволовых клеток. Можно надеяться, что такие клетки «приживутся» и будут размножаться, синтезируя трансгенный продукт. Но, ген, перенесенный в соматические клетки, потомкам не передается. Поэтому ведутся интенсивные эксперименты по поиску путей генно-инженерного воздействия на половые клетки. Соответствующие эксперименты проводят на лабораторных животных. Гены, инъецированные в оплодотворенные яйцеклетки мыши, в некоторых случаях встраиваются в геном.

Полученных трансгенных животных используют для изучения характера экспрессии генов в разных тканях, а также для выявления специфических генов онтогенеза. Трансгенный подход недавно с успехом был использован для коррекции генетического дефекта у мышей. В оплодотворенные яйцеклетки мыши с наследственным гипогонадизмом инъецировали ДНК, содержащую кодирующую последовательность предшественника гонадолиберина. У части развивающихся из таких яйцеклеток мышей этот ген нормально экспрессировался. Фенотипически эти мыши были нормальными во всех отношениях. Их потомство также не проявляло недостаточности по гонадолиберину. Приведенный пример свидетельствует о принципиальной возможности переноса генов, экспрессии трансгенов в соматических клетках и их передачи потомству.

Получение трансгенных животных.

Перенесение чужих генов в геном высших организмов, в том числе животных называют *трансгенезом*. Его цель – получение организмов с новыми признаками, изменение наследственности сложных многоклеточных организмов. Такие организмы называют трансгенными.

Для трансгенеза используют несколько методических приемов– интродукция генов в изолирование клетки реципиента с последующей ретрансплантацией этих клеток; инъекцию гена непосредственно в организм реципиента; интродукцию клонированных генов в геном эмбриона на ранних стадиях развития. Чаще всего используют последний метод. При этом из материнского организма (например, мыши) берут только что оплодотворенную яйцеклетку. В ее ядро в зону мужского пронуклеуса путем инъекции вводят клонированные гены.

Потом самкам пересаживают эмбрионы, которые развивались в культуральных средах. При этом достигается довольно высокий уровень имплантации и рождение полноценных мышей. В процессе трансгеноза происходит встраивание нового гена в геном зародыша. Вследствие этого получают животных с новым геном, и они обеспечивают передачу его следующему поколению путем полового размножения. Следует также учитывать, что введенный ген обычно встраивается в одну из гомологичных хромосом, поэтому трансгенными будут не все потомки. Осуществлено успешное перенесение в геном мыши гена гормона роста человека. Масса трансгенных мышей и их потомков была в 1,5-2 раза больше. Ныне широко ведутся исследования по получению трансгенных кролей, овец, птицы, свиней.

Быстрыми темпами разрабатываются методы создания трансгенных животных, которые могут синтезировать некоторые лекарственные препараты (инсулин, интерферон, факторы свертываемости крови, гормоны, незаменимые аминокислоты).

В перспективе есть возможность получать так называемых трансгенных животных, в зиготу которых будет внесено несколько генов (политрансгенные животные). Но при этом возникает опасность разрушения эволюционно сбалансированного генома животных.

Введение генов в клетки и их экспрессия. После растворения защитной оболочки протеолитическими ферментами с яйцеклеткой можно проводить разные манипуляции и вводить в него микроколичества нуклеиновой кислоты. Яйцеклетку диаметром около 0,1 мм помещают на конец микропипетки и экспериментатор с помощью микроскопа и стеклянного капилляра с внешним диаметром не более нескольких десятков микрон вводит в яйцо несколько пиколитров (10-12 пл) чужих фрагментов ДНК. Инъекция – наиболее ответственный этап эксперимента, поскольку в этот момент можно нанести значительные повреждения яйцу или эмбриону. Наилучшая интеграция и экспрессия генов достигается при инъекции в мужской пронуклеус, что разрешает свести к минимуму повреждения ооциту, поскольку пронуклеус располагается близ его мембраны.

Таким образом, удастся достичь включения одного или нескольких генов в геном эмбрионов млекопитающих. Эти гены могут экспрессироваться и передаваться потомкам. Следует подчеркнуть некоторые сложности и неясности с которыми связана эта процедура. Процесс интеграции генов в геном клеток млекопитающих является малоизученным. Как показали исследования, эта интеграция происходит случайным образом и не связана с конкретным участком хромосомы. Другая сложность обусловлена нестабильностью клеток, в которые вводится ген (или гены), где он может быть утерянным, видоизмененным или неактивным. Активность генов определяется не только последовательностями нуклеотидов, которые обеспечивают транскрипцию генов с образованием мРНК, но также другими последовательностями нуклеотидов, которые стоят отдаленно от собственно гена. Для достижения полной экспрессии гена, эти последовательности необходимо вводить вместе с ним.

Перенесение вирусных генов. Проведены заражения эмбрионов мыши на стадии морулы вирусом лейкоза мышей (M-MuLV) и имплантации их самкам-реципиентам. Через несколько месяцев наблюдали проявление болезни в 10-40% взрослого потомства. Было установлено, что заболевание, которое напоминало лейкоз, индуцировано инъекцией ранним эмбрионом вируса. Это вызвало интеграцию генома вируса в геном клеток эмбриона, в том числе, в клетки зачаточного пути. Таким образом было доказано, что можно достичь стабильного встраивания чужеродного генетического материала в геном клеток млекопитающих, более того, этот материал может экспрессироваться и передаваться потомкам.

Профилактика развития опасных инфекций.

Параллельно с внедрением технологии рекомбинации ДНК были приняты меры профилактики появления новых генетических форм организмов, вызывающих инфекцию. Разработаны строгие правила работы с клонированными и трансгенными организмами, что предупреждает возможное распространения новых инфекций. Результаты длительных исследований показали, что химерные бактерии, созданные благодаря технологии рекомбинации ДНК, были не опасны при соблюдении мер безопасности и достаточной компетенции экспериментаторов.

Значение генной инженерии для медицины. Таким образом достижения генной инженерии существенно расширили возможности медицины. В частности, разработаны методы изучения молекулярных механизмов наследования заболеваний. Установлена молекулярно-генетическая природа гиперхолестерии, муковисцедоза, талассемии, хореи Гентингтона, серповидно – клеточной анемии и др. Разработаны методы получения и получены некоторые важные белки человека в достаточных для терапевтических целей количествах (инсулин, СТГ, активатор плазминогена и др.). Открыты новые возможности получения белковых вакцин (белки вируса гепатита В и белковых препаратов для диагностических целей). Разработаны пренатальные методы диагностики наследственных заболеваний. Разработаны новые принципы лечения некоторых наследственных заболеваний. Научно обоснованы и разработаны методы идентификации личности и установление родства людей.

Молекулярная медицина

Последнее десятилетие явило миру абсолютно новую область науки - молекулярную медицину. Эта область стала возможной благодаря стремительному развитию таких направлений биологической науки, как молекулярная биология и молекулярная генетика и проникновению практически во все сферы биологических исследований методов и технологий генетической инженерии. Значительным достижением в этой области стала расшифровка первичной структуры генома человека, и этот результат совместных усилий мирового научного сообщества дает возможность развивать такие разделы молекулярной медицины как функциональная геномика и геномная дактилоскопия, молекулярная диагностика, фармакогенетика и генная терапия.

Научными задачами молекулярной медицины является идентификация структурных и регуляторных генов человека изучение их экспрессии и регуляции, выяснение генной природы и молекулярных механизмов наследственных болезней, роли генетических факторов в этиологии и патогенезе разнообразных патологических состояний в том числе и инфекционной этиологии.

ДНК-диагностика наследственных патологий

Общее количество генов в геноме человека по разным оценкам составляет 30-36 тысяч. Сейчас картировано в хромосомах несколько тысяч генов ~ 6 тыс. Остается еще много работы по картированию ~ 30 тыс генов. Предполагается, что эта задача будет решена через 5-7 лет. Далеко, не все гены генома могут вызвать развитие патологических процессов. Общее количество наследственных патологий у человека приближается к 6 тыс. Однако большее количество их формируется под влиянием около 300 генов для наиболее распространенных наследственных болезней и около 200 генов - для сравнительно редких генетических заболеваний. Это связано с тем, что нарушение в одном и одном и том же гене может служить причиной разных форм и видов наследственных болезней. Например, известно около 200 аномальных гемоглобинов, которые являются следствием разных структурных, или регуляторных мутаций в генах, которые кодируют синтез собственно двух полипептидных цепей - α и β .

Для большинства наследственных болезней уже разработаны точные и эффективные методы диагностики на любой стадии онтогенеза, в том числе и пренатальной. Рассмотрим пример нарушения в структуре и регуляции генов. Довольно показательной является мышечная дистрофия Дюшера – наиболее распространенное нервно-мышечное заболевание, которое встречается с частотой ~ 1 на 5 тыс. мальчиков-младенцев. Причиной болезни являются мутации в гене белка дистрофина. Этот ген локализован на коротком плече X-хромосомы, известны размеры гена (2.4 млн. пар оснований), размер мРНК (14 тыс. оснований) и белка - дистрофина (427 кДа), а также функция последнего - стабилизация сарколеммы (цитоплазматическая мембрана) мышечного волокна. *Мутации* в этом гене вызывают или полное (миодистрофия Дюшера) или частичное (миодистрофия Беккера) отсутствие соответствующего белка, следствием чего является разрушение мышечных волокон. Тяжелые формы заболевания служат причиной ранней инвалидности и смерти больного.

Пока отсутствуют надежные методы терапии мышечной дистрофии Дюшена, а постановка диагноза с точным адресованием генетического дефекта до недавнего времени была невозможной - вплоть до установления полной последовательности нуклеотидов всех 85 экзонов гена. Сейчас это стало реальностью благодаря знанию первичной структуры гена, возможности синтезировать олигонуклеотидные праймеры, использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (см. выше) для синтеза соответствующих последовательностей и использовании их в диагностике (гибридизация). Это дало возможность не только определять местонахождение дефекта в гене, но и работать над программами его коррекции методами генотерапии.

Генодиагностика в онкологии

Изучение молекулярно-генетических причин и механизмов злокачественной трансформации, также как и ранняя диагностика рака становятся все более важными, поскольку частота онкологических заболеваний постоянно возрастает. Так, частота ретинобластомы за последние 30 лет выросла почти в 3 раза и составляет сейчас 1 на 10-15 тыс.; нефробластомы и нейробластомы - 1 на 8-10 тыс.; частота карциномы почек ежегодно возрастает на 2%; рака молочной железы - на 1,2%, частота случаев меланомы за 60 лет прошедшего века выросла в 20 раз. Неуклонно увеличивается частота рака легких, яичников, органов желудочно-кишечного тракта, щитовидной железы и т.д. То, что рак является генетической болезнью, стало очевидным фактом. Постоянно возрастает количество выделенных, клонированных и картированных генов, которые имеют отношение к формированию и развитию опухолей. Вместе с этим, основные закономерности молекулярной индукции злокачественной трансформации и функционирования раковой клетки остаются невыясненными.

Молекулярная онкогенетика имеет принципиальное значение для фундаментальной биологии, теоретической медицины и клиники. Исследования по молекулярной онкогенетике развиваются в нескольких направлениях: 1) молекулярная диагностика наследственных форм рака; 2) диагностика и выяснение молекулярных механизмов вирусиндуцированных форм рака; 3) поиск и диагностика молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза при раковых заболеваниях; 4) диагностика микрометастазов; 5) поиск и диагностика полиморфных ДНК-маркеров, для выявления склонности к раку.

Гены, задействованные в процессах злокачественной трансформации клеток классифицируются на две группы: гены контроля клеточного цикла и гены общего контроля. Мутантные гены первой группы относятся к категории генов склонности к злокачественной трансформации. Вторая группа генов поддерживает стабильность генома путем репарации его повреждений, противостоит мутациям генов первой группы. Для того, чтобы возникла опухоль, необходимо по меньшей мере два события: мутации в одном из аллелей генов первой группы делают клетку потенциальной опухолевой, мутации в другом аллеле этого же гена делают опухоль злокачественной, то есть завершают процесс опухолевой трансформации. В результате, если мутации в обеих группах генов возникли в генеративных клетках, то это вызывает у потомства определенные формы опухолей, а если происходят мутации конкретных генов в соматических клетках (соматическая мутация) то могут возникать разные опухоли у данного индивидуума.

Рассмотрим несколько примеров *молекулярно-генетической диагностики* наследственных форм рака. Наглядным примером гена-супрессора, который выполняет отрицательную регуляцию клеточного цикла, есть ген RB1, который определяет склонность к ретинобластому — злокачественной опухоли сетчатки глаза, которая наследуется по аутосомно-доминантному типу и обусловлена мутацией в одном из аллелей этого гена. Опухоль развивается вследствие инактивации неповрежденного аллеля, которая происходит в клетках сетчатки в раннем детском возрасте, а то и в период пренатального развития. Но эта мутация может возникнуть не только в клетках сетчатки, но и в других соматических клетках. А если так, то потомство человека с герминальной мутацией в гене RB1 становится предрасположенным к возникновению опухолей. У самого этого человека соматические мутации вызовут лишь ретинобластому, но нарушение функции RB1 могут выявиться во многих других опухолях таких как, остеосаркома, лимфоидный лейкоз, мелкоклеточный, рак легких, опухоли половых органов, рак молочной железы и т.п.

Генодиагностика инфекционных болезней

По своей методологии генодиагностика инфекционных патологий принципиально не отличается от диагностики наследственных и онкологических заболеваний. В этом случае задача состоит в выявлении генов, специфических для возбудителя, или продуктов их экспрессии. Для этого используются специальные ДНК-зонды, специфические для геномов различных возбудителей. Зонды могут быть не просто специфическими по отношению к ДНК исследуемого патогена, но и соответствовать гену, который кодирует один из факторов патогенности. В таком случае становится возможным не только идентифицировать возбудителя, но и сделать заключение о его патогенности. С помощью ПЦР, можно из минимального количества возбудителя (практически из одной клетки) получить достаточное количество ДНК возбудителя для диагностики ДНК-зондом.

Общепризнанным становится использование ДНК-технологий для диагностики *вирусных болезней*, контроля качества их лечения и эпидемиологического состояния заболевания.

Генетическая терапия

Результатом достижений молекулярной генетики, генной и клеточной инженерии последних лет явилось рождение новой области медицинской науки – генетической (генной) терапии (ГТ) - возможность использования функциональных генов в качестве лекарственных средств. ГТ является средством терапии наследственных заболеваний на генном уровне, т.е. на уровне генома и молекулы ДНК. Наибольшее распространение в настоящее время получили методы, основанные на введении в организм больного тем или иным способом соответствующих генов. В этом варианте ГТ разрабатывает методы коррекции наследственных и приобретенных заболеваний, а также вирусных инфекций на генетическом уровне методами молекулярной биологии и генной инженерии путем введения в клетки полноценных функционально-активных (терапевтических) генов или последовательностей ДНК, регулирующих активность генов.

ГТ в современном ее понимании можно определить как совокупность биомедицинских технологий, основанных на введении больному генетических конструкций: перенос генов *ex vivo* (подобно случаю с геном АДА, проводится обычно на клетках крови); *in situ* (локальная ГТ, например, введение в трахею и бронхи в случае муковисцидоза или в массу опухоли в случае терапии злокачественных новообразований); *in vivo* (введение генетических конструкций непосредственно в эмбрион. Лечебный эффект генных терапевтических средств достигается в результате: 1) корректировки или замены дефектного гена (ГТ терапия); 2) экстрахромосомной экспрессии введенного терапевтического гена (ГТ); 3) подавления функции «больного» либо сверхактивного гена (антисэнс-терапия).

По основным подходам в реализации целей ГТ можно выделить различные ее виды. Основываясь на типе клеток-мишеней, разделяется на соматическую и фетальную. Имея в виду тактику введения генетических конструкций, можно выделить: системное (внутривенно, внутримышечно) введение и локальное (органы, опухоли). Исходя из векторной системы, можно выделить виды ГТ, использующие вирусные или невирусные векторы.

Первым успешным примером соматической ГТ, считается лечение в 1990 г. тяжелого комбинированного иммунодефицита, обусловленного редким генетическим заболеванием – дефицитом аденозиндеаминазы (АДА), с помощью вирусного вектора, содержащего ген АДА. Этим вектором трансфицировали Т-лимфоциты, выделенные из крови двух больных девочек, которым не помогла традиционная терапия, и затем вводили лимфоциты обратно, чем и достигался терапевтический эффект.