

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Практическое занятие №2, ч.1.

ДНК-геномы

Автор – доктор биологических наук,
профессор, зав.каф. биологии с основами
генетики и паразитологии

НАЧЕВА

ЛЮБОВЬ ВАСИЛЬЕВНА



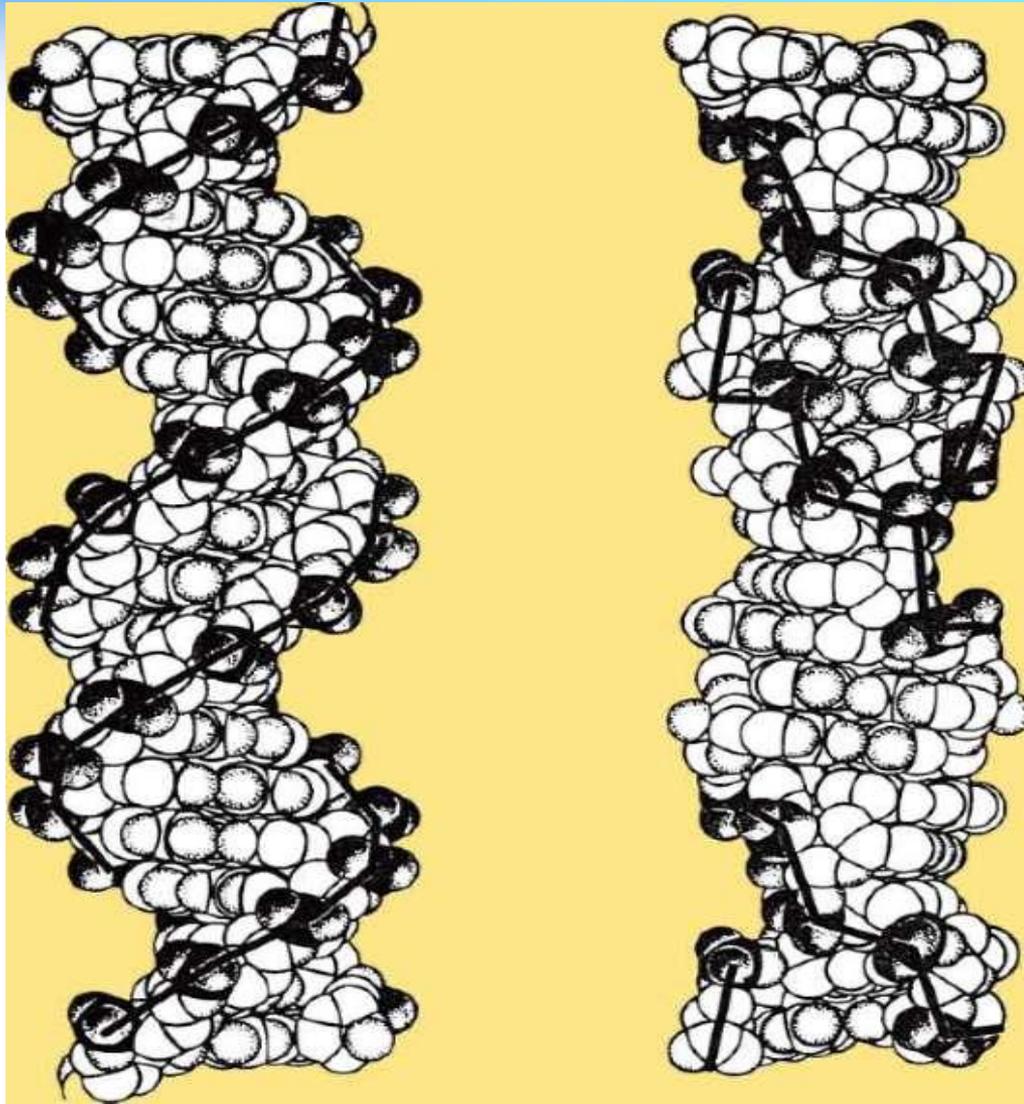


МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

План практического занятия № 2

- Типы геномов,**
- ДНК-геномы,**
- геном митохондрий митохондрий человека,**
- варибельность геномов,**
- перспективы использования информации о геноме человека.**

ДНК слева – левозакрученная Z спираль,
справа – правозакрученная B спираль.



Молекула ДНК



- Число молекул ДНК равно числу хромосом в ядре клетки. Длина таких молекул различна, поскольку хромосомы имеют разные размеры.
- У человека наибольшие размеры имеет **хромосома 1 (263 млн п.н., минимальное оценочное число генов 2237, из которых ассоциированных с болезнями 157),** наименьшие размеры - хромосома **21 (50 млн п.н., минимальное оценочное число генов 204, из которых ассоциированных с болезнями 23).**
- Классическая цитогенетика наименьшие размеры приписывала хромосоме 22.
- Длина кольцевой *митохондриальной ДНК* (хромосома М) человека **16 569 п.н.**



- Наиболее крупный из обнаруженных в природе или синтезированных в лаборатории полимеров - это биспираль ДНК хромосомы 1 длиной 8 см.
- Размеры геномов оцениваются в **пикограммах**, **дальтонах** или в парах нуклеотидов: $1 \text{ пг} = 10^{-9} \text{ мг} = 0,6 \times 10^{12} \text{ дальтон} = 0,9 \times 10^9 \text{ п.н.}$ ДНК генома людей состоит из 3,2 млрд п.н., что по весу составляет 3,5 пг.
- Следовательно, диплоидная соматическая клетка человека содержит примерно **7 пг ДНК**.

Информационная емкость генома человека



- **Об информационной емкости генома человека говорит следующий пример:**

Если ДНК-тексты одной клетки воспроизвести шрифтом телефонных справочников (наиболее мелкий из используемых в полиграфии), то для их издания понадобилось бы 1000 книг по 1000 страниц в каждой.

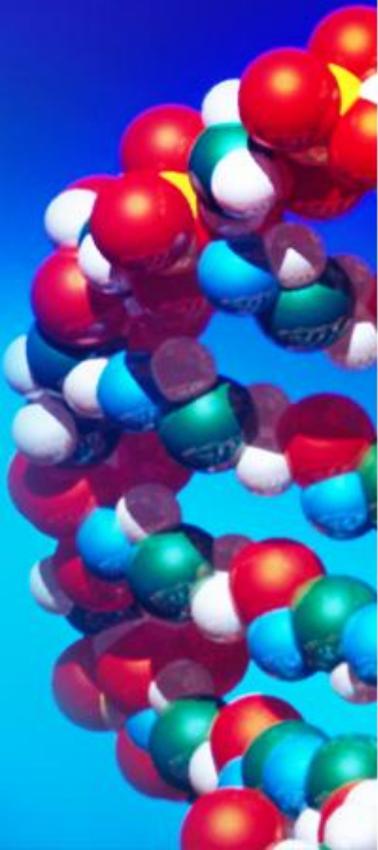
Биологическая информация



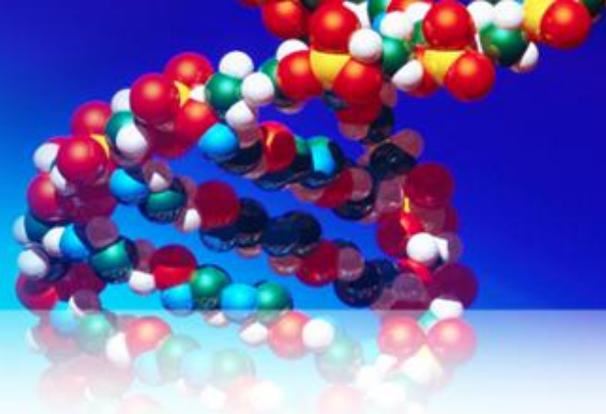
- Любая информация, включая биологическую, для ее сохранения или манипуляций с нею требует системы записи или кодирования.
- В мире жизни это решается благодаря информационным макромолекулам (**ДНК, РНК, белки**), представляющим собой **биомолекулярные тексты** (взаимосоответствующие по содержанию ДНКовые, РНКовые и белковые), составленные с использованием *биологического (генетического) кода*.
- Использование в биоинформатике названных выше полимеров дает право называть земную жизнь **белково-нуклеиновой**.

Функционально-генетическая организация ДНК. Проект «Геном человека».

- ДНК генома человека насчитывает $3,2 \times 10^9$ п.н. (по другим данным, $3,165 \times 10^9$ п.н. или 3×10^9 п.н.).
- На долю смысловых (кодирующих, структурных) нуклеотидных последовательностей для полипептидов в нем приходится 1,2% ДНК.
- Если присовокупить смысловые последовательности для нетранслируемых в полипептиды РНК - рибосомных, транспортных и др., то суммарное количество ДНК, выполняющее биоинформационно-генетическую функцию непосредственно, в геноме человека составляет порядка 3%.



Геном человека



- Впервые в конце 70-х гг. XX в. была полностью определена последовательность нуклеотидов ДНК генома фага ϕ (греч. *phi* - *phi*) X174 - 5375 п.н., 9 генов.
- Рубеж XX-XXI вв. ознаменован реализацией проекта «Геном человека», состоящего в определении последовательности нуклеотидов (секвенирование) в молекулах ДНК всех хромосом человека.

Части генома человека



- На начало 2001 г. информации оказалось достаточно, чтобы представить организацию человеческого генома в целом (область интереса структурной геномики).
- Транскрибируемая часть составляет 28-30% генома, но транслируется до белков не более 5% (экзонная порция).
- 45-50% ДНК генома представлено повторяющимися последовательностями.
- Из них 45% приходится на «избыточную» (она же «паразитическая», «эгоистическая») ДНК.

В структуре генома



- В геноме человека структурные (смысловые, кодирующие) гены расположены по длине хромосом блоками, между которыми находятся протяженные участки некодирующей межгенной ДНК.
- От участков «избыточной» ДНК гены отделены «монотонными» последовательностями из Г-Ц пар до 30 тыс. п.н. длиной.
- Допускается, но не доказано бесспорно, что такие участки имеют отношение к регуляции активности СМЫСЛОВЫХ ГЕНОВ.

нуклеотидные последовательности



- В ДНК обнаруживаются уникальные нуклеотидные последовательности, представленные в геноме в единственном экземпляре, а также повторяющиеся последовательности: 3% ДНК - это короткие повторы, 5% - длинные.
- Среди повторяющихся нуклеотидных последовательностей есть, во-первых, **тандемные повторы**, когда соответствующие участки ДНК следуют друг за другом по типу **«голова-хвост»**, и диспергированные повторы, когда участки-повторы разбросаны по геному.



- Во-вторых, в зависимости от числа копий имеются:
 - 1) **высоко-повторяющиеся** (от десятков или сотен тысяч до миллионов копий),
 - 2) **среднеповторяющиеся** (тысячи и десятки тысяч копий) и
 - 3) **слабоповторяющиеся** (единицы, десятки или сотни копий) последовательности.
- В-третьих, длина повторяющихся последовательностей варьирует от сотен и реже тысяч до 2-10 нуклеотидов.



- В-четвертых, относительно небольшая доля повторов представлена идентичными последовательностями, тогда как большая их часть характеризуется наличием в копиях:
- 1) повторяющейся последовательности **нуклеотидных** замен,
- 2) выпадений (**делеций**),
- 3) вставок (**инсерций**).

сателлитная ДНК



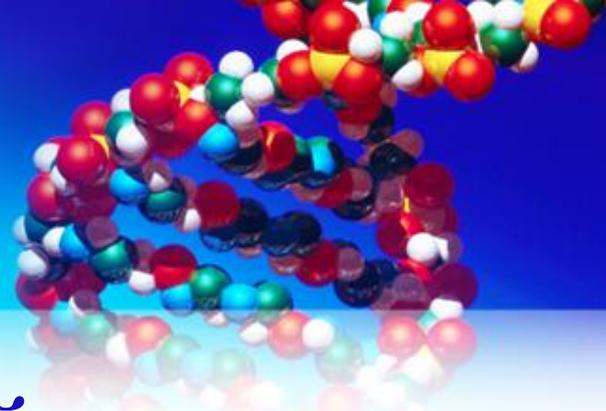
- Сателлитная ДНК представлена большим числом копий коротких нуклеотидных фрагментов. Выделяют: **микросателлитные** (длина повторяющегося фрагмента 1-4 п.н.) и **минисателлитные** (длина 4-6 п.н.) повторы. К последним относятся теломерные повторы.
- У представителей ряда видов повторяющиеся единицы теломерной ДНК имеют идентичный нуклеотидный состав (у человека - ТТАГГГ), у других нуклеотидный состав различается. **Теломерные повторы относятся к категории тандемных.**

Кластеры генома человека



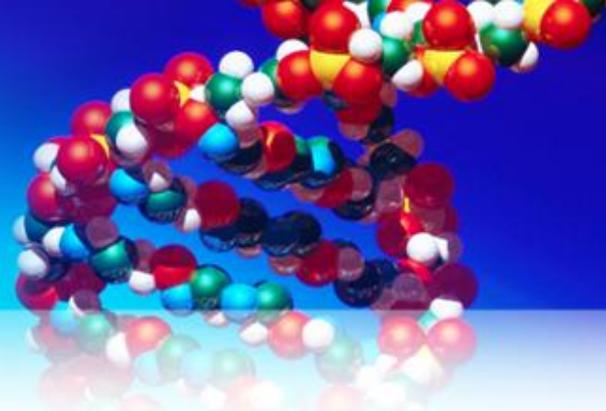
- В геноме животных и человека имеются кластеры генов, возникновение которых в эволюции связывают с неоднократной дупликацией предковой нуклеотидной последовательности.
- **Молекулярная дивергенция** членов такого кластера, например, вследствие **нуклеотидных замен**, с последующим отбором вела к возникновению совокупностей структурных (смысловых) генов со «скромными» различиями по нуклеотидному составу, кодирующих в принципе один и тот же полипептид, но с определенными функциональными особенностями.

В качестве примера



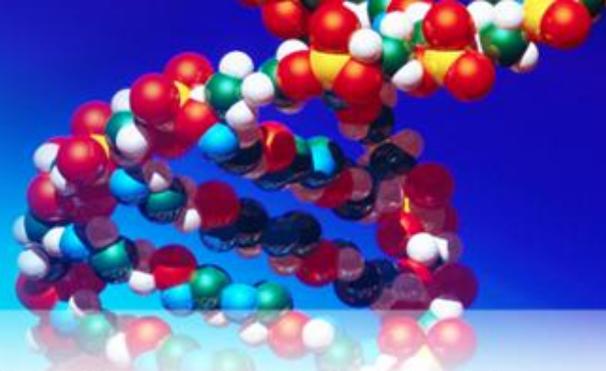
- приведем β -глобиновый кластер, расположенный у человека на коротком плече хромосомы 11, члены которого обуславливают экспрессию β -полипептида гемоглобина: эмбриона - ген ϵ , плода - гены $A\gamma$ и $G\gamma$, взрослого - гены δ и β .

Кластерная организация



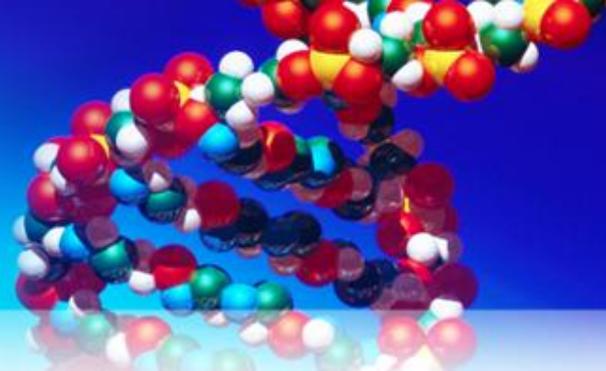
- Кластерная организация характеризует гены, контролирующие синтез рибосомных и транспортных РНК, гистоновых белков.
- Однако, имеет место многократный повтор стереотипной нуклеотидной последовательности.
- **Кластеры смысловых** (кодирующих, структурных) генов обозначают как *мультигенные семейства*.

Повторы нуклеотидной последовательности



- Диспергированные повторы образуют несколько семейств. Это короткие или *SINE* (англ. *Short Interspersed Nucleotide Elements*) повторы.
- Представителем этого семейства является Alu-повтор (300 п.н., высоко-повторяющаяся последовательность с числом копий у человека 10^5 - 10^6 на геном. Alu-повтор встречается в интронах, межгенной и сателлитной ДНК).
- У млекопитающих есть семейство длинных или *LINE* (англ. *Long Interspersed Nucleotide Elements*) повторов (не более 6-7 тыс. п.н.).

Отдельные члены семейства кластеров



- Отдельные члены семейства различаются последовательностью нуклеотидов.
- Это среднеповторяющиеся последовательности с числом копий у человека 10^3 - 10^5 на геном.
- К *LINE*-повторам относятся ретротранспозоны (МГЭ, или «прыгающие» генетические элементы), в структуре которых имеется ген **обратной транскриптазы**.

Нуклеотидные повторы

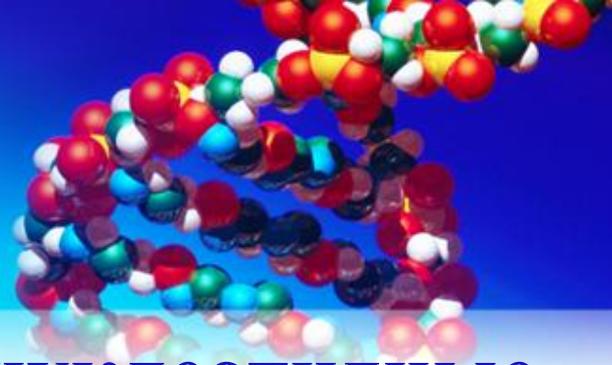


- Нуклеотидные повторы обнаруживаются в кодирующей ДНК.
- Например, особенность **α2-пептида коллагена I типа** (кожа, сухожилия, кости, строма внутренних органов) - это **повтор из аминокислот пролина, оксипролина и глицина**, которым соответствуют повторы соответствующих кодонов в экзонах **коллагенового гена *Colla I***.
- Благодаря названным аминокислотным повторам достигается плотная «упаковка» пептидов в **коллагеновых волокнах**.



- Наряду со структурной и функциональной геномикой, интенсивно развивается **сравнительная геномика**, имеющая целью, если говорить о человечестве, конкретизировать генетический полиморфизм и особенности гено (аллело)фондов различных популяций, народностей, расовых и этнических групп, а также сопоставить геномы представителей различных таксонов живых существ (включая инфекционные и паразитарные агенты).

однонуклеотидные замены



- Внимания заслуживают однонуклеотидные замены, с которыми связывают особую разновидность генетического полиморфизма (многообразия) - однонуклеотидный генетический полиморфизм (ОНП, англ. ***SNP - Single Nucleotide Polymorphism***).
- Будучи распространенными (встречаются через каждые 1-2 тыс. п.н., в геноме человека их $3,2 \times 10^6$), они играют важную роль в наследственном полиморфизме людей.



- примерно половина ($1,5 \times 10^6$) **однонуклеотидных замен** в геноме человека приходится на экспрессируемую (смысловая, кодирующая, транслируемая) часть генома, их идентификация используется в целях картирования генов на хромосомах, молекулярной диагностики наследственных болезней, изучения генетической предрасположенности к мультифакториальным болезням.

Митохондриальный геном



- В целом митохондриальная ДНК человека выглядит так же, как и других млекопитающих: мыши и быка. Несмотря на то, что это далеко не близкие виды - размеры их митохондриальных ДНК довольно близки между собой: 16 569; 16 295; и 16 338 пар оснований, соответственно.
- Гены транспортной РНК разделяют некоторые смысловые гены.
- Наиболее важные из структурных **митохондриальных генов** - гены цитохромоксидазы, NADH-дегидрогеназы, цитохром-С оксидоредуктазы и АТФ-синтетазы.

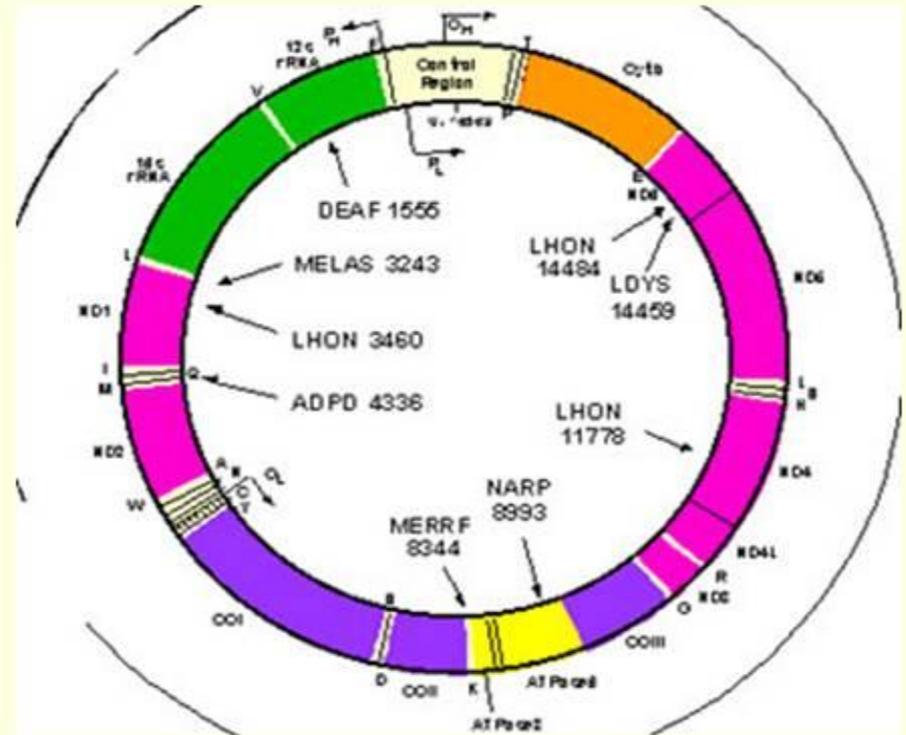
Особенности м-ДНК



- ДНК в митохондриях представлена циклическими молекулами, **не образующими связь с гистонами**, в этом отношении они *напоминают* бактериальные хромосомы.
- У человека митохондриальная ДНК содержит 16,5 тыс. н. п., она полностью расшифрована.
- Найдено, что митохондриальная ДНК различных объектов очень однородна, отличие их заключается лишь в величине интронов и нетранскрибируемых участков.
- Все митохондриальные ДНК представлены множественными копиями, собранными в группы, кластеры.

Геном митохондрий человека

- - представлен одной кольцевой молекулой ДНК размером 16 569 пар нуклеотидов. Он кодирует 13 белков, 22 (все) транспортные РНК, две рибосомные РНК.

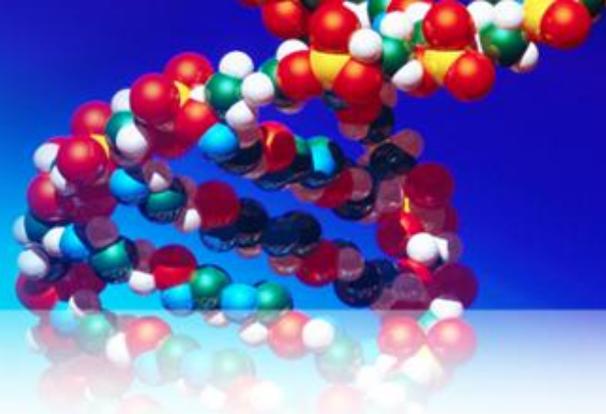


Структурно-функциональные особенности мт генома

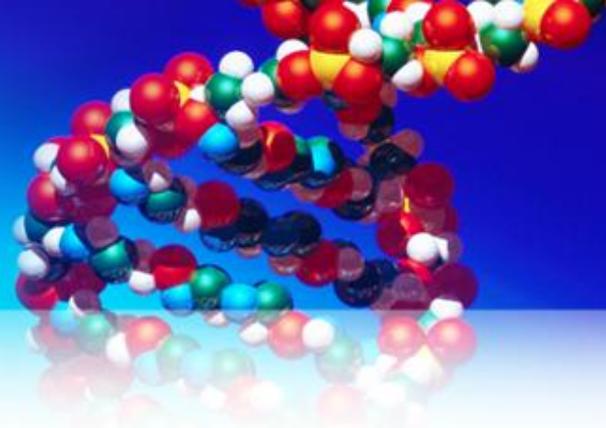


- Во-первых, установлено, что мтДНК передается от матери всем ее потомкам и от ее дочерей всем последующим поколениям, но **сыновья не передают свою мтДНК** (материнское наследование).
- Материнский характер наследования мтДНК, вероятно, связан с двумя обстоятельствами: либо доля отцовских мтДНК так мала (по отцовской линии может передаваться не более одной молекулы ДНК на 25 тыс. материнских мтДНК), что они не могут быть выявлены существующими методами, либо после оплодотворения блокируется репликация отцовских митохондрий.

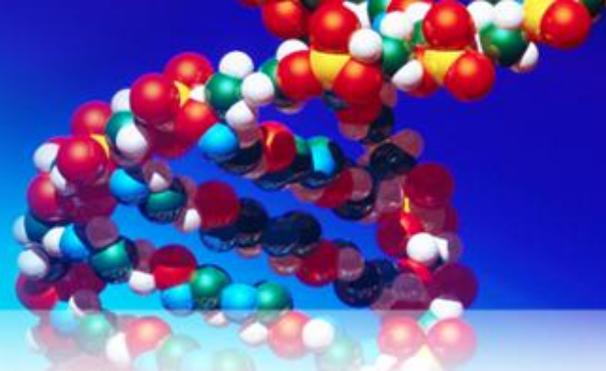
Наследование мт-генома



- **Во-вторых, отсутствие комбинативной изменчивости — мтДНК принадлежит только одному из родителей, следовательно рекомбинационные события, характерные для ядерной ДНК в мейозе, отсутствуют, а нуклеотидная последовательность меняется из поколения в поколение только за счет мутаций.**



- **В-третьих, мтДНК не имеет интронов (большая вероятность, что случайная мутация поразит кодирующий район ДНК), защитных гистонов и эффективной ДНК-репарационной системы — все это определяет в 10 раз более высокую скорость мутирования, чем в ядерной ДНК.**



- В-четвертых, внутри одной клетки могут сосуществовать одновременно нормальные и мутантные мтДНК — явление гетероплазмии (присутствие только нормальных или только мутантных мтДНК называется гомоплазмией).
- Наконец, в мтДНК транскрибируются и транслируются обе цепи, а по ряду характеристик генетический код мтДНК отличается от универсального (UGA кодирует триптофан, AUA кодирует метионин, AGA и AGG являются стоп-кодонами).

Митохондриальные заболевания

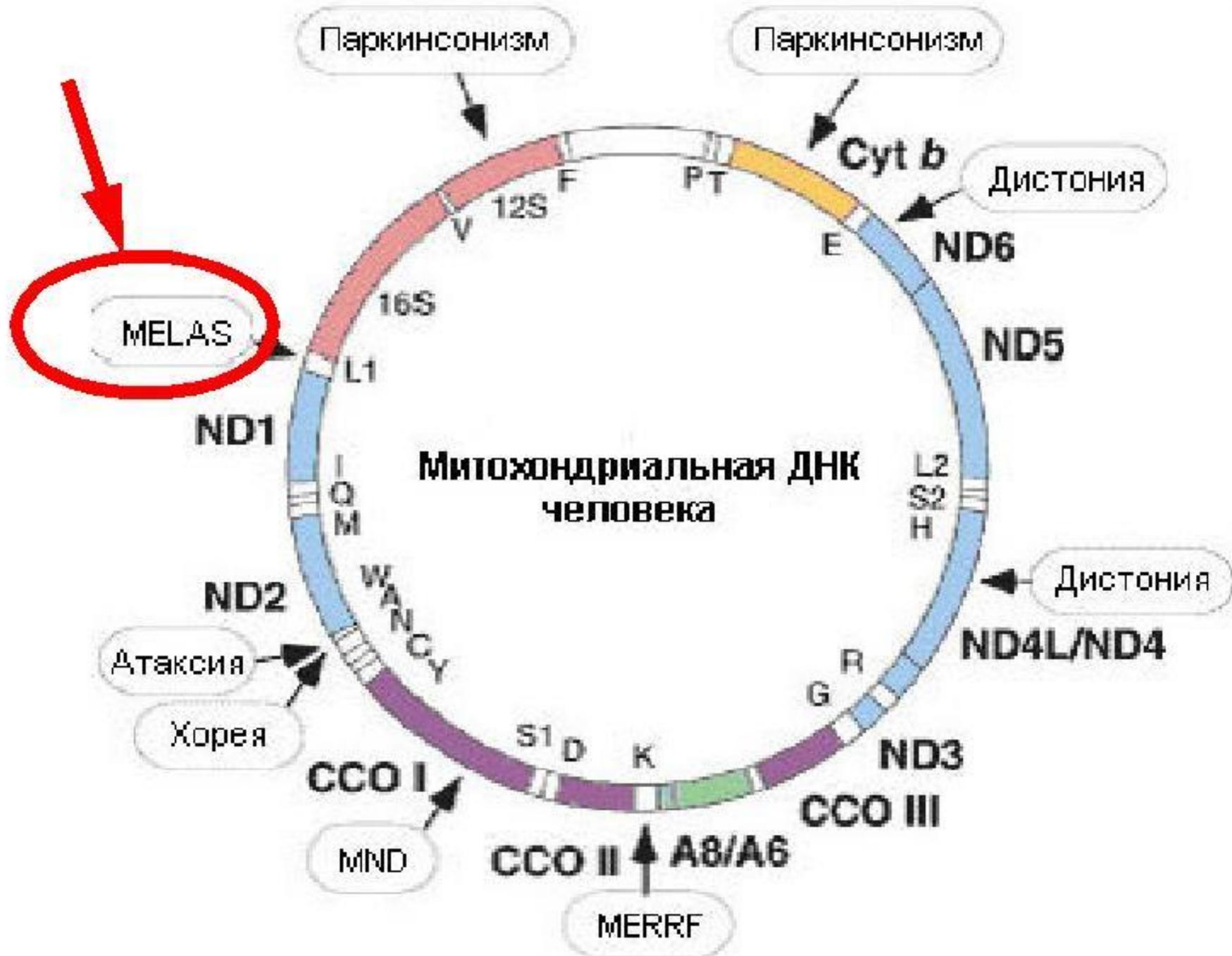


- МЗ обусловлены генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий, приводящими к нарушениям тканевого дыхания.
- Они передаются только по женской линии к детям обоих полов, так как сперматозоиды передают зиготе половину ядерного генома, а яйцеклетка поставляет и вторую половину генома, и митохондрии.
- Патологические нарушения клеточного энергетического обмена могут проявляться в виде дефектов различных звеньев в цикле Кребса, в дыхательной цепи, процессах бета-окисления и т. д.

Митохондриальные заболевания

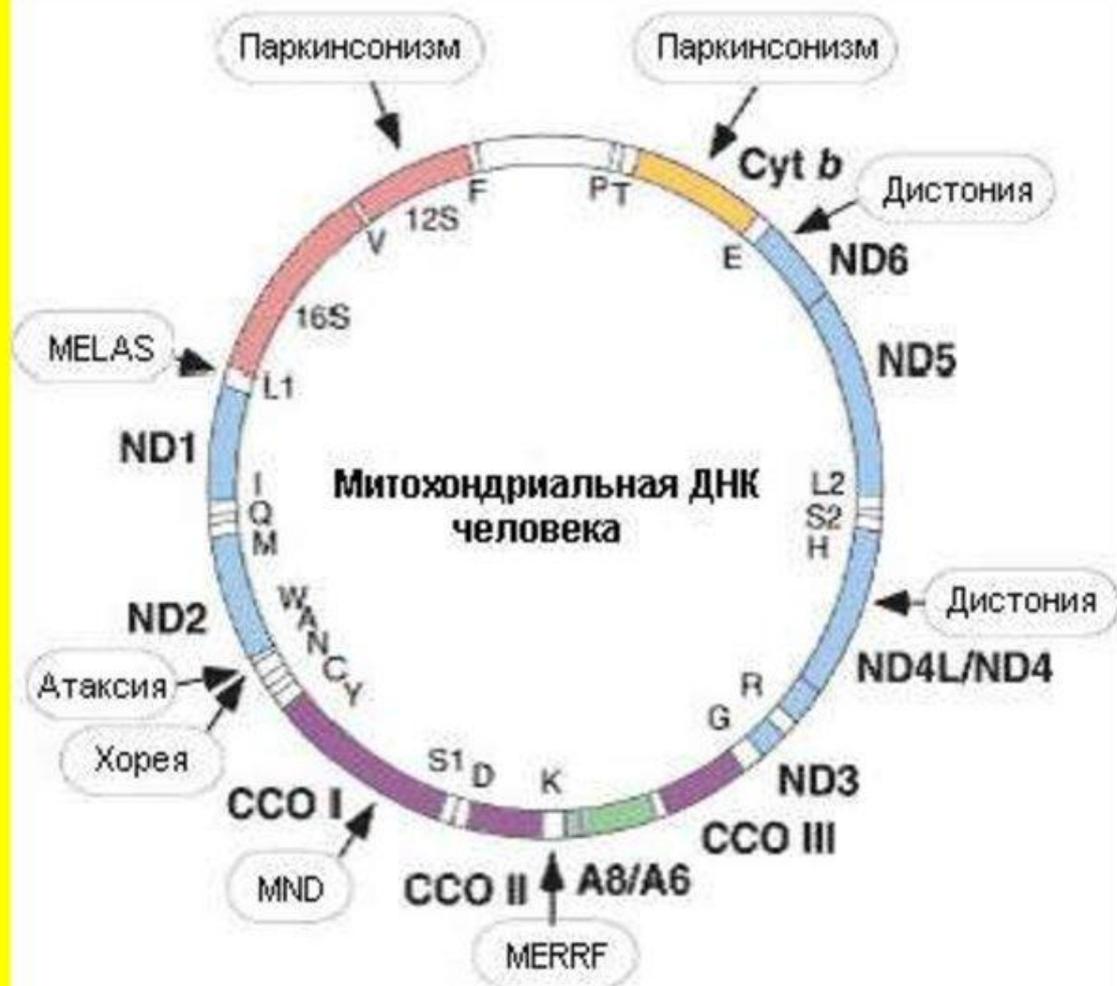


- Ярко выраженные наследственные синдромы, обусловленные мутациями генов, ответственных за митохондриальные белки:
 - Синдром **NARP** (*невропатия, атаксия, пигментный ретинит*),
 - синдром Кернса-Сейра (*прогрессирующая наружная офтальмоплегия, пигментный ретинит, атаксия, интенционный тремор, атриовентрикулярная блокада сердца*),
 - синдром MELAS (*митохондриальная энцефаломиопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобные эпизоды*),
 - синдром MERFF (*миоклонус-эпилепсия, "рваные" красные волокна*).



Гены, связанные с митохондриальными болезнями — синдромом MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультоподобные эпизоды), синдромом MERRF (миоклонус-эпилепсия с разорванными красными волокнами) и нейродегенеративными заболеваниями, такими как атаксия (расстройство координации движений), хорей, дистония, заболевания двигательных нейронов (MND, motor neuron disease) и паркинсонизм.

с сайта www.innovitaresearch.org



«Вторичные митохондриальные заболевания»



- «Вторичные митохондриальные заболевания», включающие нарушение клеточного энергообмена как важное звено формирования патогенеза:
- болезни соединительной ткани,
- синдром хронической усталости,
- гликогеноз,
- кардиомиопатия,
- мигрень,
- печеночная недостаточность,
- панцитопения,
- гипопаратиреоз,
- диабет, рахит и др.

Наследование генов митохондрий

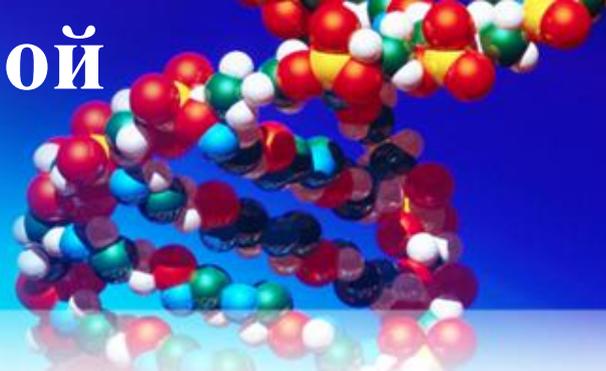


- Гены митохондрий наследуются иначе, чем ядерные гены.
- **Ядерные гены** в каждой соматической клетке обычно представлены двумя аллелями (за исключением большинства сцепленных с полом генов у гетерогаметного пола).
- **Один аллель унаследован от отца, другой от матери.**
- **Митохондрии** содержат собственную ДНК, причем в каждой митохондрии человека обычно содержится от 5 до 10 копий кольцевой молекулы ДНК и *все они наследуются от матери.*



- Когда митохондрия делится, копии ДНК случайным образом распределяются между ее потомками, а затем происходит удвоение ДНК.
- Если только одна из исходных молекул ДНК содержит мутацию, в результате случайного распределения такие мутантные молекулы могут накопиться в некоторых митохондриях.
- **Митохондриальная болезнь** начинает проявляться в тот момент, когда заметное число митохондрий во многих клетках данной ткани приобретают мутантные копии ДНК (**пороговая экспрессия**).

Мутации в митохондриальной ДНК



- Мутации в митохондриальной ДНК происходят по разным причинам намного чаще, чем в ядерной.
- Это означает, что митохондриальные болезни достаточно часто проявляются из-за спонтанных вновь возникающих мутаций.
- Иногда темп мутирования увеличивается из-за мутаций в ядерных генах, кодирующих ферменты, которые контролируют репликацию ДНК митохондрий.



- Эти свойства и вышеуказанные функции мт-генома сделали исследование изменчивости нуклеотидной последовательности мтДНК неоценимым инструментом для врачей, судебных медиков, биологов-эволюционистов, представителей исторической науки в решении своих специфических задач.

О мутациях генов в мт-ДНК



- Начиная с 1988 г., когда было открыто, что мутации генов мтДНК лежат в основе митохондриальных миопатий (J. Y. Holt et al., 1988) и наследственной оптической нейропатии Лебера (D. C. Wallace, 1988).
- Дальнейшее систематическое выявление мутаций мт-генома человека привело к формированию концепции митохондриальных болезней (МБ).
- В настоящее время патологические мутации мтДНК открыты в каждом типе митохондриальных генов.

Геном митохондрий

В клетке человека 100- 1000 митохондрий

16500 п.н. у человека 37 генов для 13 белковых цепей, 22 тРНК и 2 рРНК

Нет интронов, перекрывающиеся гены, нет метилирования отклонения от универсального кода. Код митохондрий уникален

Мутаций в 10 раз больше, чем в ядерном геноме

Наследуются по женской линии