

Типы наследственных болезней

Строение ДНК

Наследственные болезни

Моногенные

Аутосомно-доминантные -
Хх

Аутосомно-рецессивные -
хх

Сцепленные с полом - Y

Ахондроплазия (поражения
скелета)

Семейный поликистоз почек

Врожденная катаракта

Наследственный панкреатит

Муковисцидоз

Фенилкетонурия

Гемофилия

(мозаицизм, пенетрантность)

Полигенные

Мультифакториальн ые

Гены+факторы окружающей
среды

Хромосомные

Геномные мутации
Хромосомные мутации

Синдром Дауна

Синдром кошачьего крика

*мтДНК заболевания:

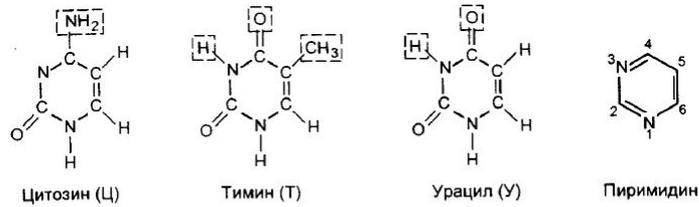
Атрофия зрительных нервов Лебера

Синдром миоклонус эпилепсии

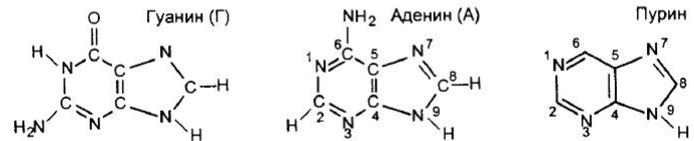
Синдром рваных мышечных волоко

- Генетический импринтинг (ГИ) - эпигенетический процесс, при котором на фенотипические проявления влияет родительское происхождение изменений генов (генный импринтинг), хромосом или их участков (геномный импринтинг), т.е. экспрессируется только один из пары аллелей - отцовский или материнский. Этот феномен свидетельствует о неравнозначном вкладе родителей в функционирование генотипа потомков.
- Примером геномного импринтинга является пузырный занос, который возникает при оплодотворении яйцеклетки двумя сперматозоидами и утрате материнских хромосом (диандрия). В этом случае при «нормальном» кариотипе ткани собственно эмбриона вообще не развиваются при бурном разрастании трофобласта. При двойном наборе материнских хромосом (дигения), формируется тератома - эмбриональная опухоль при сильном угнетении роста плацентарных тканей. Эти примеры иллюстрируют неравнозначный родительский вклад в развитие зародыша при определяющем вкладе генома отца в развитие трофобласта и большом вкладе генома матери в развитие собственно зародышевых структур.
- При описании механизма генетического импринтинга нельзя обойти вниманием явление однородительской дисомии (ОРД). Под ОРД понимают происхождение гомологичных хромосом или их участков от одного из родителей. Механизмами могут служить:
 - 1) коррекция нуллисомии в одной из гамет дисомией по этой же хромосоме другой гаметы;
 - 2) редукция трисомии до дисомии - потеря «лишней» хромосомы одного родителя с сохранением двух других от второго родителя;
 - 3) коррекция моносомии дупликацией единственной хромосомы одного из родителей при отсутствии гомологичной хромосомы от другого родителя;
 - 4) соматическая рекомбинация - обмен между хроматидами гомологичных хромосом в соматических клетках (ОРД по отдельным хромосомным сегментам).
- Эти изменения касаются фрагментов генома с импринтированными участками. При ОРД если хромосома содержит импринтированные участки, то аллели, локализованные в этих участках, могут быть экспрессированы или супрессированы в зависимости от родительского происхождения, что ведет к патологии. Если при ОРД хромосома не содержит импринтированных участков, аномалий фенотипа не возникает.
- В настоящее время описаны более 30 наследственных заболеваний, в этиологии которых играет роль нарушение функционирования импринтированных участков генома. Это так называемые

Молекулярные основы наследственности



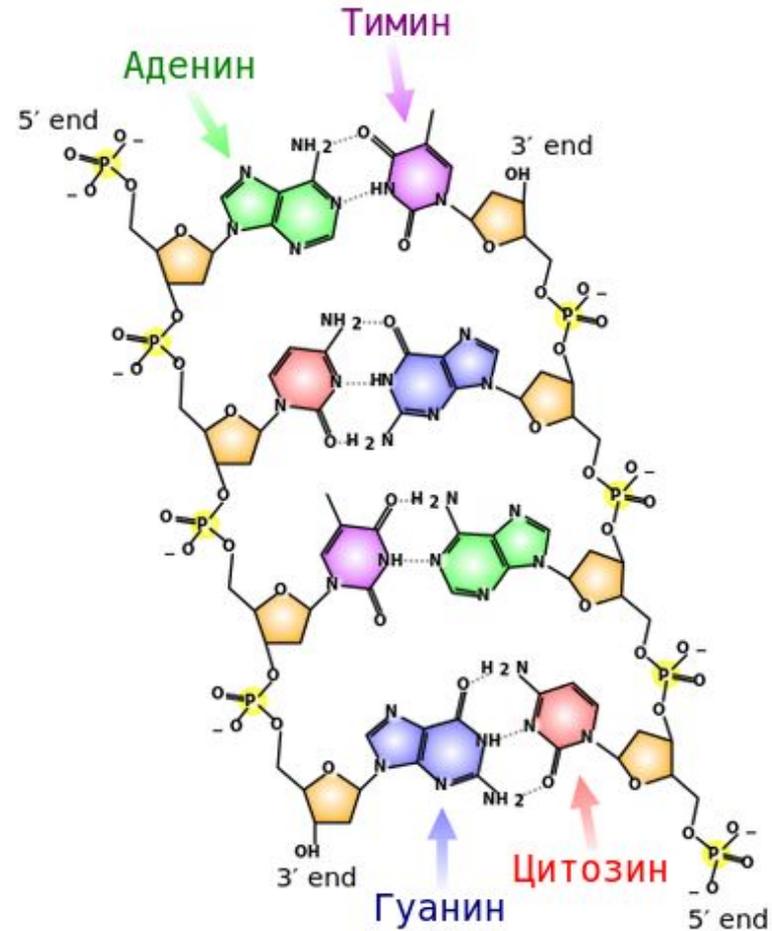
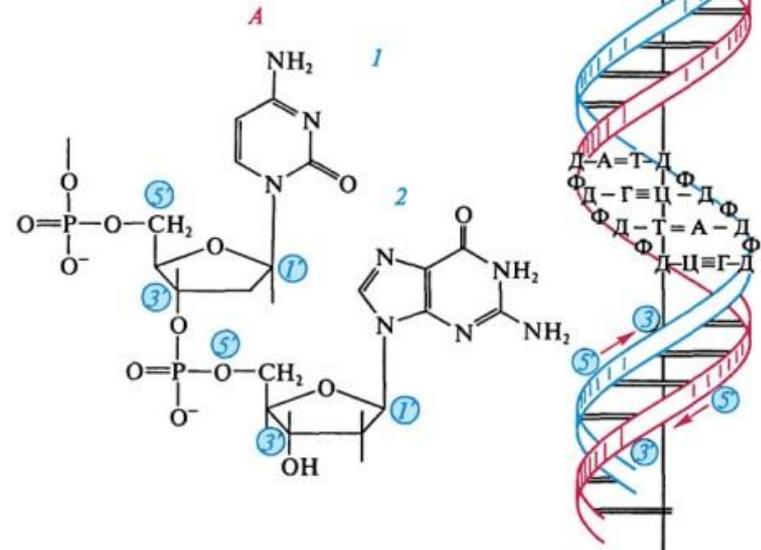
Пиримидиновые нуклеотидные основания



Пуриновые нуклеотидные основания

Рис. 3.1. Структура молекул нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты построены из единиц, которые называются нуклеотидами. Основаниями нуклеотидов являются пиримидины (цитозин, тимин, урацил) и пурины (гуанин и аденин). Атом азота в положении 9 молекул пуринов или в положении 1 молекул пиримидинов связывается с углеродом в положении 1 молекул сахаров (дезоксирибозы в ДНК и рибозы в РНК).



ПРАВИЛА ЧАРГАФФА

1 правило

Суммарное содержание пуриновых нуклеотидов равно суммарному содержанию пиримидиновых

$$\mathbf{A+G=C+T}$$

2 правило

Содержание тимина равно содержанию аденина

$$\mathbf{A = T}$$

3 правило

Содержание цитозина равно содержанию гуанину

$$\mathbf{G = C}$$

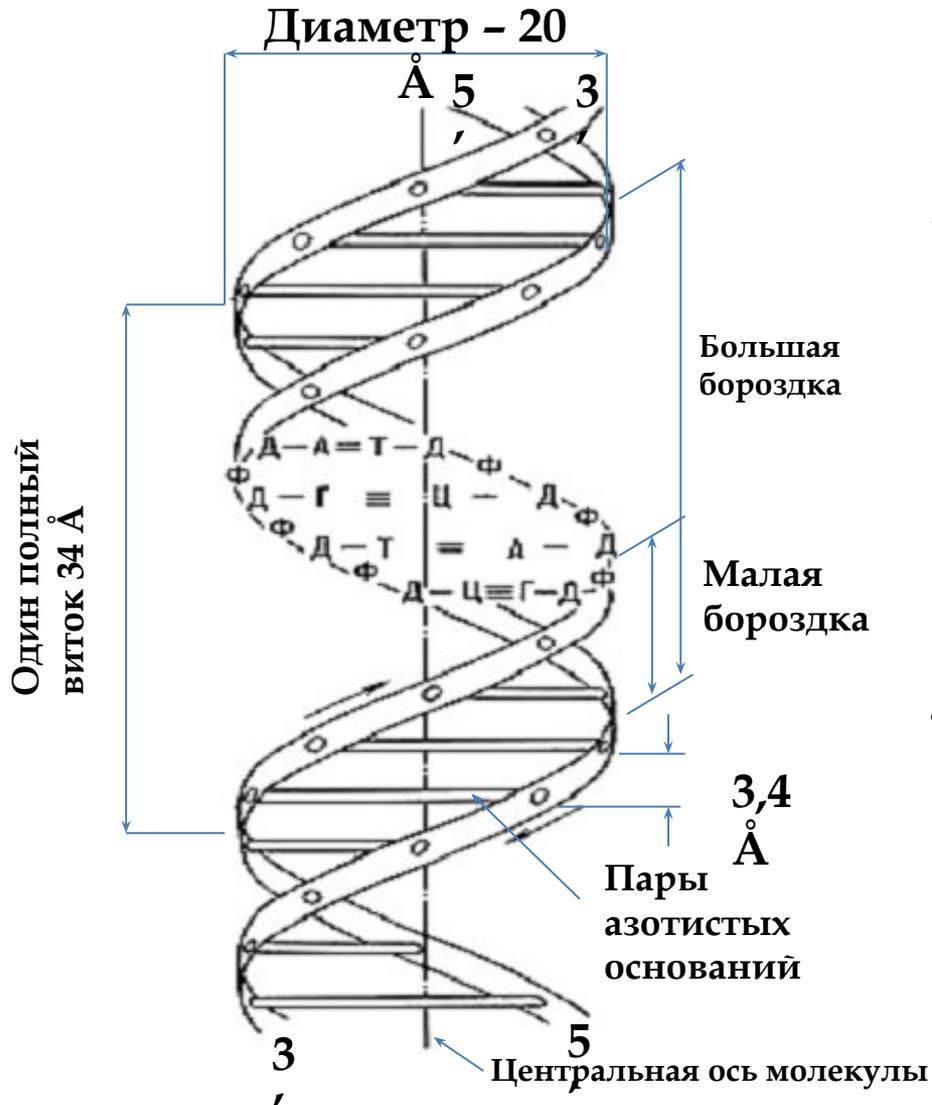
4 правило

Процентное содержание **Г + Ц** не обязательно равно **А + Т** у разных организмов

Коэффициент специфичности =
$$\frac{\mathbf{C+G}}{\mathbf{A+T}}$$

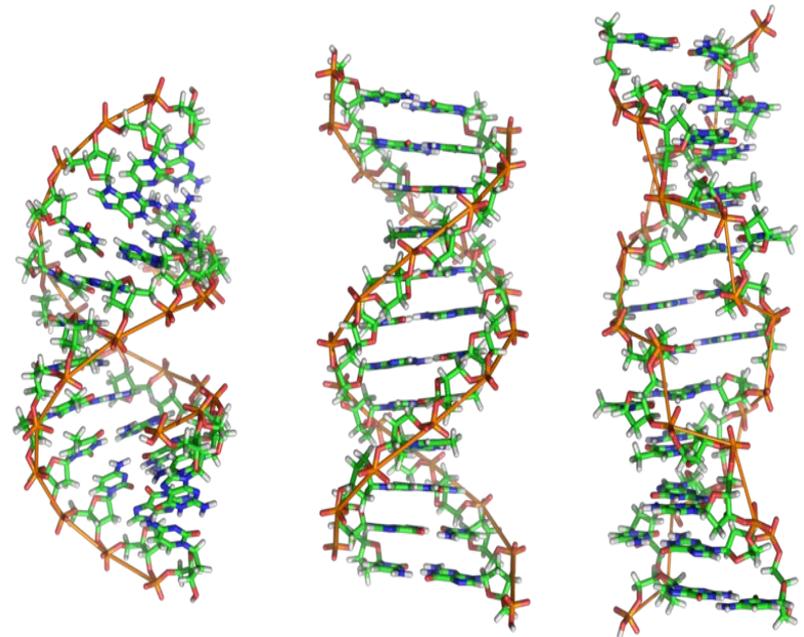
0,3-2,8

Модель ДНК Уотсона - Крика



1. Эти две цепи ориентированы в противоположных направлениях, т.е. их С-5' и С-3'-концы не совпадают.
2. Основания в составе каждой полинуклеотидной цепи лежат в плоскости, перпендикулярной оси молекулы и располагаются внутри двойной спирали плоскопараллельно, один над другим, с интервалом 3,4 Å (0,34 нм).
3. Азотистые основания противоположных цепей ДНК спарены с помощью водородных связей в строго определенном виде: А=Т или Г≡Ц.
4. Полный оборот спирали занимает 34 Å (3,4 нм), включая по 10 оснований в каждой цепи
 - Прим.: уточнение - на 1 виток приходится 10,4 н.н.
6. По длине молекулы чередуются большие и малые бороздки.
7. Диаметр двойной спирали ДНК составляет 20 Å (2,0 нм)

- В формировании вторичной структуры ДНК участвуют следующие типы взаимодействий:
- 1. Водородные связи между комплементарными основаниями (две между аденином и тимином, три — между гуанином и цитозином).
- 2. Стэкинг-взаимодействия.
- **Стэкинг** - относится к такому расположению ароматических молекул, которое напоминает расположение монет в стопке и поддерживается ароматическими взаимодействиями.
- 3. Электростатические взаимодействия.
- 4. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия.



A-форма

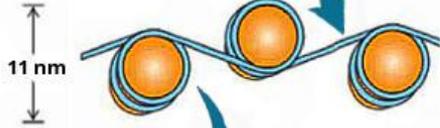
B-форма

Z-форма

Структурная организация ДНК в хромосомах (уровни компактизации)



Участок двойной спирали ДНК



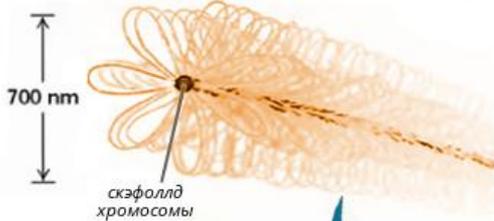
Нуклеосомный уровень
ДНК намотана на белковые "бусины" - белки - гистоны с образованием нуклеосомной нити.



Соленоидный уровень
Скручивание нуклеосомной нити с образованием хроматинового волокна - фибриллы. Компактная укладка "бусин" по типу соленоида или супербида.



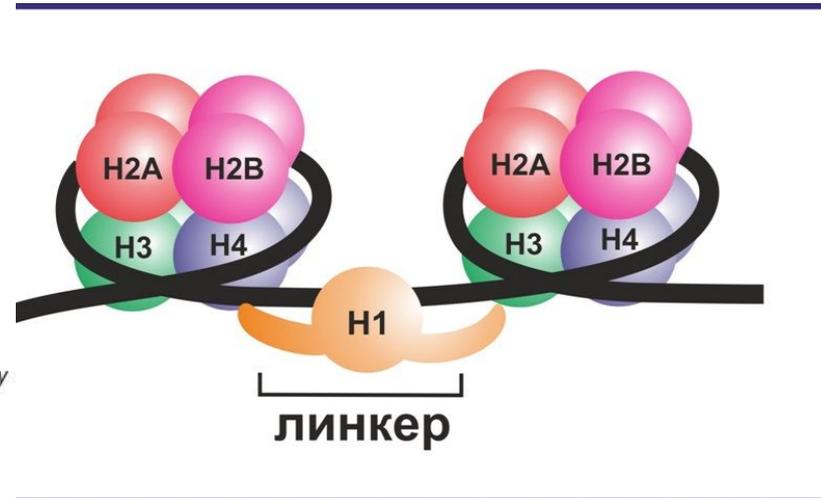
Петлевой уровень
Упаковка хроматиновых фибрилл петлями. Петли фиксируются специальным белковым матриксом (скэффолд).



Доменный уровень
Образование петельных доменов, которые своим основанием прикрепляются к белковому матриксу в SAR (scaffold attachment regions) областях - фрагментах ДНК с высоким содержанием А/Т пар нуклеотидов.



Хромосомный уровень
последний (высший) уровень компактизации ДНК. Митотическая хромосома, состоящая из двух хроматид.



Репликация ДНК

- Ферменты и белки, участвующие в синтезе ДНК.
- ДНК-полимераза,
- топоизомераза (гираза),
- хеликаза
- лигаза,
- праймаза,
- ssb-белки
- Весь комплекс, состоящий более чем из 20 репликативных ферментов и факторов, называется **ДНК-репликационной системой**, или **реплисомой**.

Особенности репликации у эукариот

1. Множественные точки начала репликации (**origins**)
 2. Эукариотические ДНК-полимеразы
 3. Наличие теломер и теломераз
- Эукариотическая полимераза синтезирует ДНК гораздо медленнее, чем прокариотическая:
 - Около 50 нуклеотидов в секунду, т.е. в 20 раз медленнее бактериальной.
 - Если бы была 1 точка репликации – то полная репликация длилась бы больше месяца.
 - На самом деле этот процесс занимает несколько часов, а иногда даже минут.
 - Каждая хромосома человека состоит из молекулы ДНК, содержащей около 150 млн. нуклеотидов, поэтому для полной репликации такой молекулы с помощью одной репликационной вилки потребовалось бы 3 000 000 секунд, т.е. 800 часов! В действительности удвоение ДНК продолжается 8-10 часов.

- Выделенные из дрожжей точки начала репликации назвали **автономно реплицирующимися последовательностями** (**ARSs** – autonomously replicating sequences).
- **ARS** содержит четыре участка (A, B1, B2, и B3).
- Элемент A (ARS consensus sequence or ACS) высококонсервативен и содержит последовательность из 11 оснований
- «5'- T/A-T-T-T-A-Y-R-T-T-T-T/A -3'»,
- где Y — это пиримидин, и R — это пурин.
- Мутационный анализ показал, что любая мутация в элементах B1, B2 и B3 приводит к снижению функции ARS. Мутация в A-элементе приводит к полной потере функции ARS.

* пример:
дрожжи

Инициация

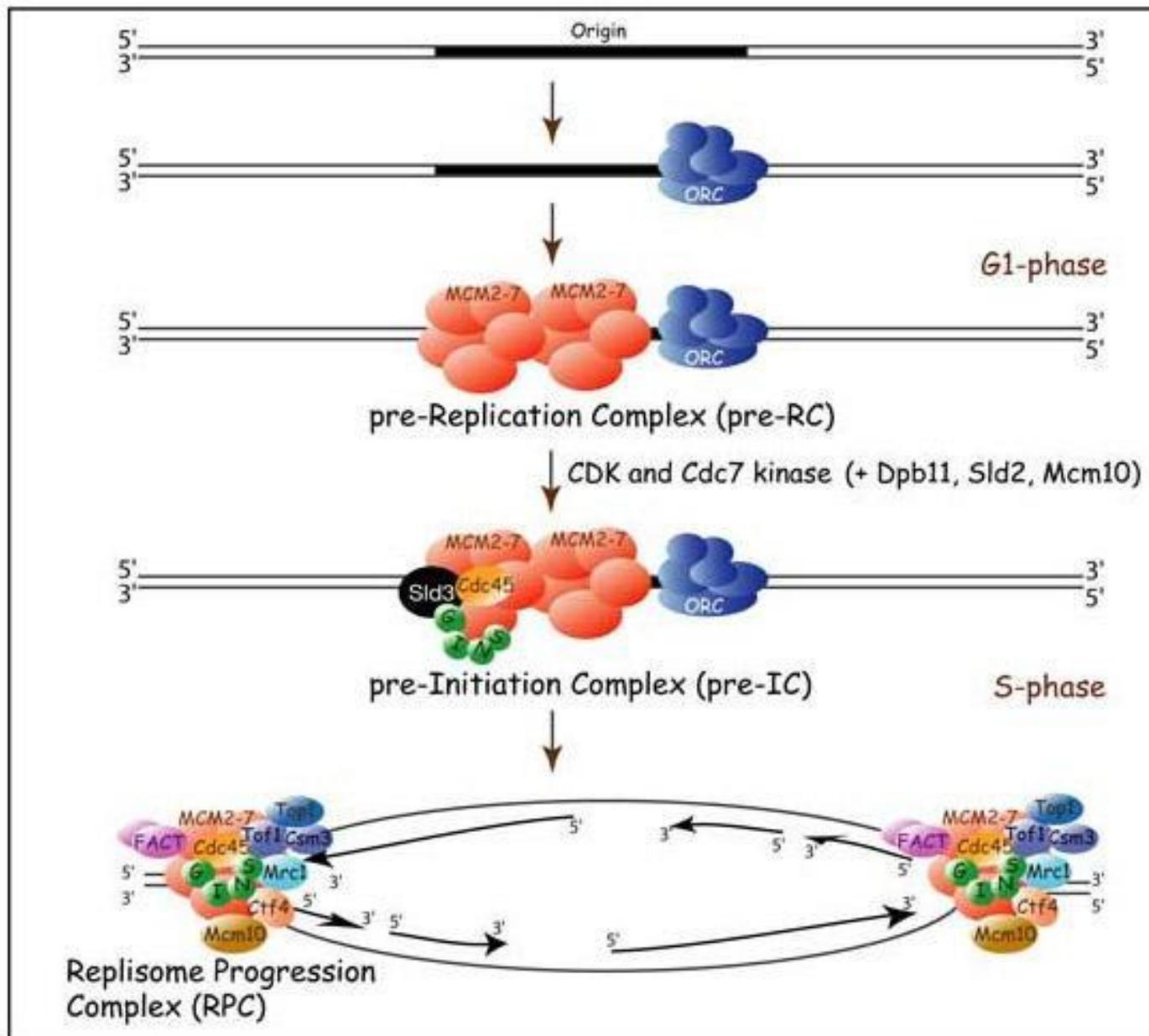
- **На стадии G1:**
- формируется **пререпликационный комплекс**, в состав которого входят шесть белков комплекса **ORC** (origin recognition complex - ORC1-6) и **белки Cdc6 и Mtm**
- (при этом, активность циклин-зависимой киназы (Cdk) падает)

- ORC специфически связываются с точками начала репликации (**ARS**) и служат основой для присоединения других иницирующих белков **Cdc6 и Mtm.**

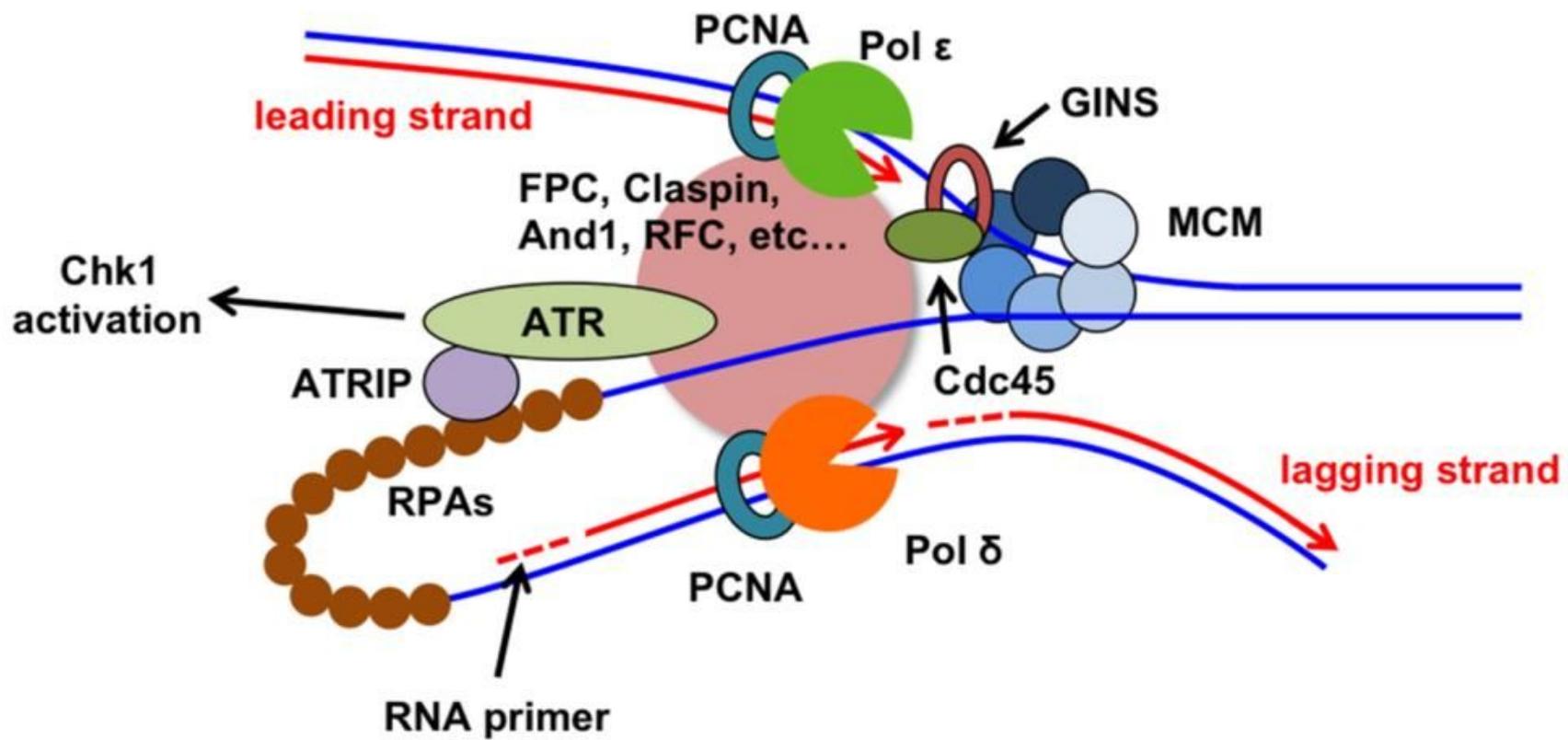
* пример:
дрожжи

- **При переходе от стадии G1 к стадии S:**
- Белок **Cdc6** покидает комплекс. На его место «встает» белок **Cdc45**.
- (активность **Cdk-1** возрастает)
- В этой перестройке комплекса, необходимой для активации точки начала репликации в течение стадии S, принимает участие белок **Cdc7-Dbf4-киназа**.
- **После инициации репликации** пре-репликационный комплекс превращается в **пост-репликационный**, он состоит только из белков ORC, связанных с хроматином. Этот комплекс сохраняется до конца митоза, когда активность Cdk 1 падает. Образование нового пре-репликационного комплекса становится возможным только в следующей стадии G1.
- Таким образом, в течение одного клеточного цикла происходит лишь один цикл репликации.
- Белки ORC остаются связанными с точкой начала репликации, другие компоненты пре-репликационного комплекса или покидают его, или становятся частью вилки репликации.
- Например, белки **Mcm2-Mcm7**, по-видимому, функционируют как репликативная геликаза.

Chromosome Replication



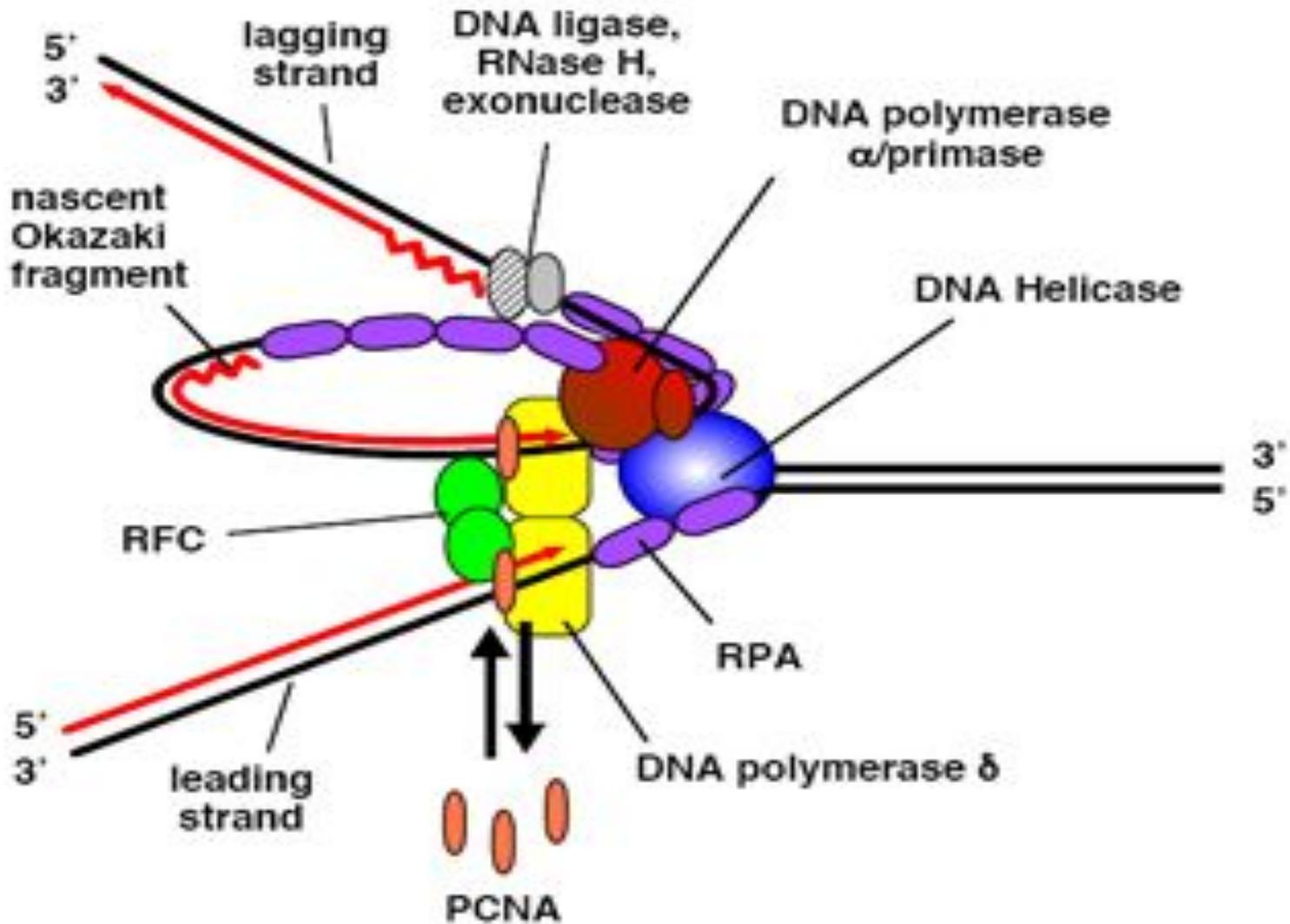
- **После инициации:**
- разделение двойной спирали с участием **ДНК-геликазы + белка RPA** (аналогично ssp-белкам)
- Нарращивают цепи:
 - **ДНК-полимераза + RFC + PCNA**
- Репликационный фактор RFC состоит из пяти субъединиц различной молекулярной массы.
- Этот белок связывается с 3'-концом только что синтезированного праймера и блокирует его наращивание, выполняемое α -ДНК-полимеразой) при длине примерно 30 нуклеотидов. На этой стадии RFC способствует связыванию ДНК с белком PCNA.
- В результате этих процессов α -ДНК-полимераза вытесняется с 3'-конца растущей цепи.
- Дальнейший синтез продолжается другими ферментами – например, **δ -полимеразой**.
- Тройной комплекс **RFC-PCNA-ДНК-полимераза** обеспечивает элонгацию обеих цепей ДНК.
- Удаление праймеров и сшивание фрагментов Оказаки происходит с участием
 - ДНК-полимеразы,
 - РНКазы H,
 - ДНК-лигазы
 - Флэп-эндонуклеазы (FEN1).



ДНК-полимеразы эукариот

ДНК	Доп. активность	Локализация, функция
α (альфа)	ДНК-праймаза	Ядро, репликация (инициация в районе <i>ori</i> и фрагментов Оказаки)
β (бета)	dRp-лиаза	Ядро, репарация
γ (гамма)	3'→5' –экзонуклеаза dRp-лиаза	Митохондрии, репликация и репарация (синтез мДНК)
δ (дельта)	3'→5' –экзонуклеаза	Ядро, репликация (элонгация лидирующей нити), PCNA - зависимая репарация
ϵ (эпсилон)	3'→5' –экзонуклеаза	Ядро, репликация (элонгация лидирующей нити), PCNA - зависимая репарация
ζ (дзета)	3'→5' –экзонуклеаза	Мутагенез (?)

Model of a eukaryotic replication fork



Транскрипци
я

Транскриптон - функциональная единица генома у эукариот

Матричная нить ДНК

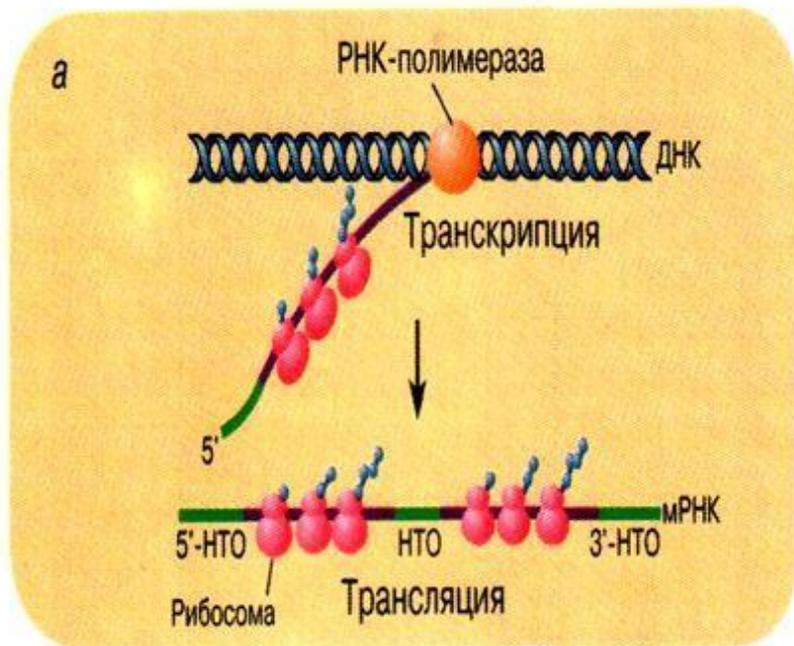


ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

У прокариот

Этапы

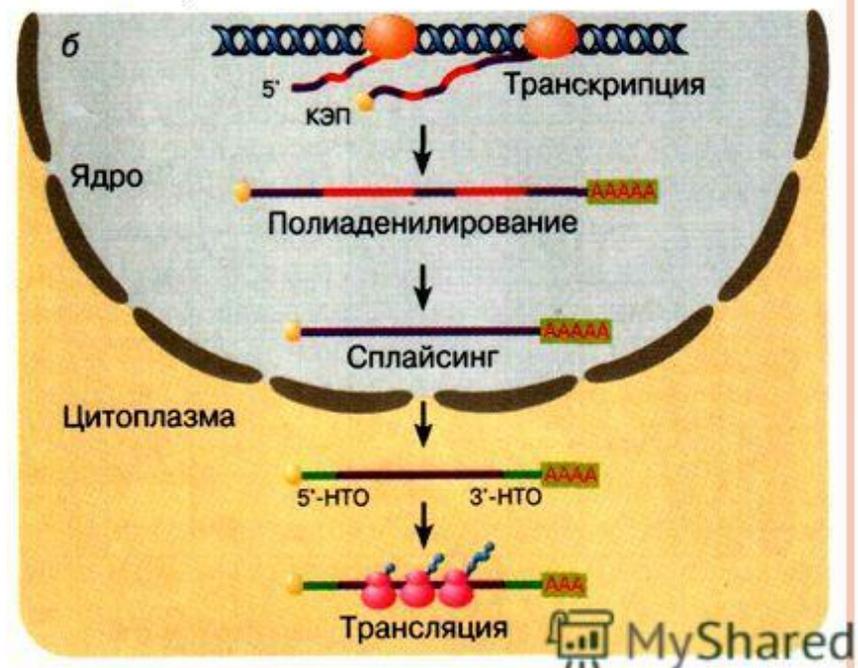
- ❖ Транскрипция
- ❖ Транспорт аминокислот
- ❖ Трансляция



У эукариот

Этапы

- ❖ Транскрипция
- ❖ Процессинг
- ❖ Транспорт аминокислот
- ❖ Трансляция



Синтез РНК у эукариот осуществляют три различных фермента:
РНК-полимеразы I, II и III.

РНК-полимераза I необходима для синтеза 18S-, 5,8S- и 28S-рибосомальных рНК;

РНК-полимераза II участвует в синтезе мРНК, некоторых мяРНК;

РНК-полимераза III необходима для синтеза 5S рРНК, тРНК и некоторых мяРНК.

У эукариот ни одна из РНК-полимераз не способна самостоятельно связываться с промоторами транскрибируемых ими генов. Для этого необходимы специфичные TF-факторы.

ТАТА-бокс (блок Хогнесса)

СААТ-бокс

ГЦ-бокс

Цис-регуляторные элементы

Энхансеры и Сайленсеры



Образование **иницирующего транскрипционного комплекса** связано с последовательным присоединением **белков** (базовых факторов транскрипции) **с промотором**

Инициация

1. С ТАТА-боксом первым связывается белок **TBP**, входящий в состав фактора **TFIID**
2. Затем присоединяется белок **TFIIB**
3. После этого с промотором связываются **TFIIF** и **РНК-полимераза II**
4. Затем факторы **TFIIE** и **TFIIN (геликаза)** завершают сборку иницирующего комплекса

Элонгация

В клетках эукариот синтез РНК и белка разобщен.

Сразу после начала транскрипции первый нуклеотид (гуаниловая кислота) РНК с 5'-конца метилируется – образуется 7-метилгуанозин – этот процесс называется **кэпированием**.

Терминация

С РНК-полимеразой II взаимодействует белковый **стоп-сигнал**, который замедляет транскрипцию. Далее фермент катализирует синтез на 3'-конце РНК последовательности ААУААА и следующие за ней 15 нуклеотидов, после чего завершает свою работу.

В процессе отделения транскрипта от матрицы ДНК экзонуклеаза отщепляет терминальные 15 нуклеотидов, а фермент полиА-полимераза достраивает к последовательности ААУААА около 150-200 полиадениловых нуклеотидов (**полиА-хвост**).

Процессинг мРНК

1. **Кэпирование** (7-метилгуанозин= РНК-трифосфатаза+ Гуанилтрансфераза+ 7-метилтрансферазой)
2. **Полиаденилирование** (полиА-«хвост»)
3. **Сплайсинг** (процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле)
4. **Редактирование** (эдитинг) (содержащаяся в молекуле РНК изменяется путём химической модификации оснований)

Регуляция экспрессии генов у эукариот

Уровни регуляции:

- Претранскрипционный
- Транскрипционный
- Посттранскрипционный
- Трансляционный
- Посттрансляционный

Экспрессия генов — это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.

Регуляция экспрессии генов позволяет клеткам контролировать собственную структуру и функцию и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации.

Экспрессия генов является субстратом для эволюционных изменений, так как контроль над *временем, местом и количественными* характеристиками экспрессии одного гена может иметь влияние на функции других генов в целом организме

Экспрессия ГЕНОВ

Количественный анализ экспрессии генов — анализ транскриптома, измерение транскрипционной активности гена, с помощью определения количества его продукта, матричной РНК (мРНК), универсальной для большей части генов.

Для измерения количества мРНК разработаны надежные методы:

1. **количественная ПЦР в реальном времени (qPCR)**, применяют для анализа уровня экспрессии нескольких генов;
2. **сравнительная геномная гибридизация на чипах (CGH)**, позволяет видеть количественные изменения экспрессии генов прямо на хромосомах;
3. **микрочипы**, с их помощью можно получать данные по уровню экспрессии большого количества генов;
4. **высокопроизводительное секвенирование РНК (RNA-Seq)**.

Генетические исследования

Зонирование помещений ПЦР лаборатории



Лабораторный бокс «грязная зона», в котором осуществляется выделение ДНК из периферической крови



Лабораторный бокс «чистая зона», необходим для подготовки реакционной смеси для проведения ПЦР

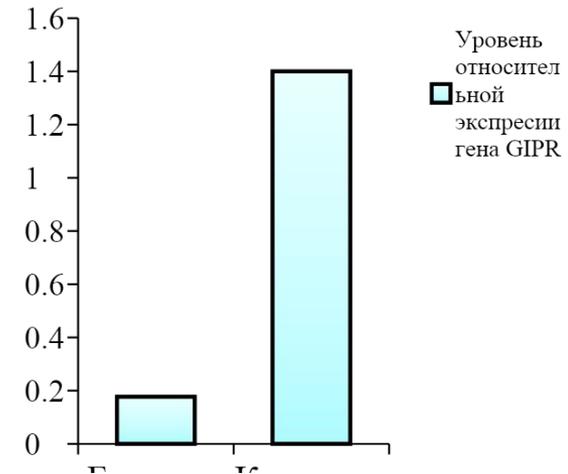
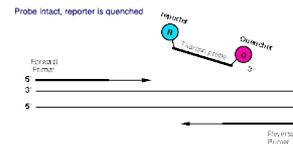
Метод ПЦР

- **Метод ПЦР – это способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).**
- **В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (in vitro).**
- **Происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце**

Экспрессия гена - перенос генетической информации от ДНК через РНК к полипептидам и белкам.



РНК ->
кДНК



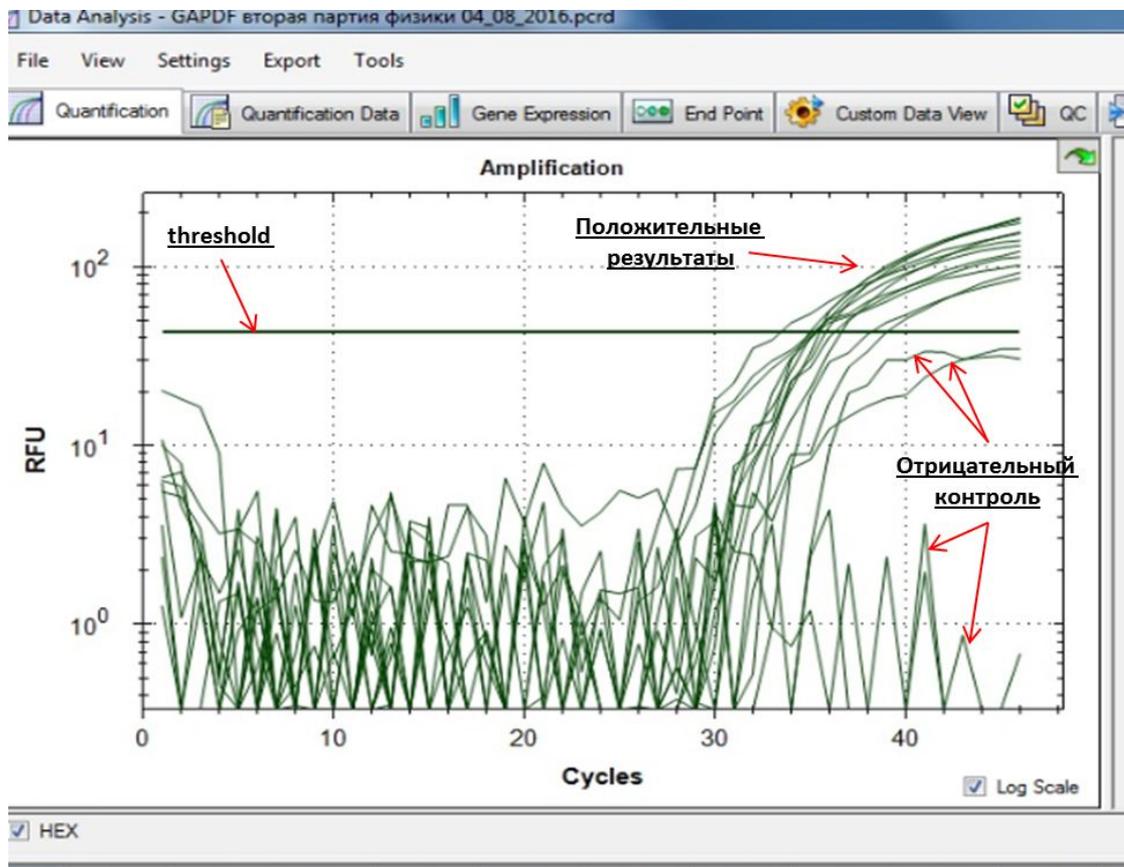
Выделение РНК из биологического образца

Постановка реакции обратной транскрипции = cDNA

Постановка реакции ПЦР

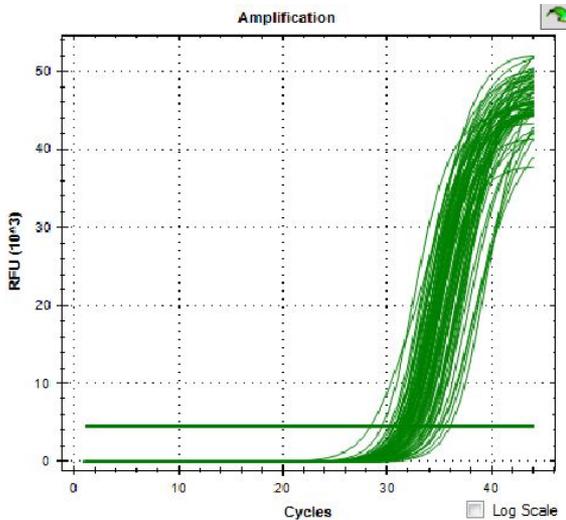
Анализ результатов



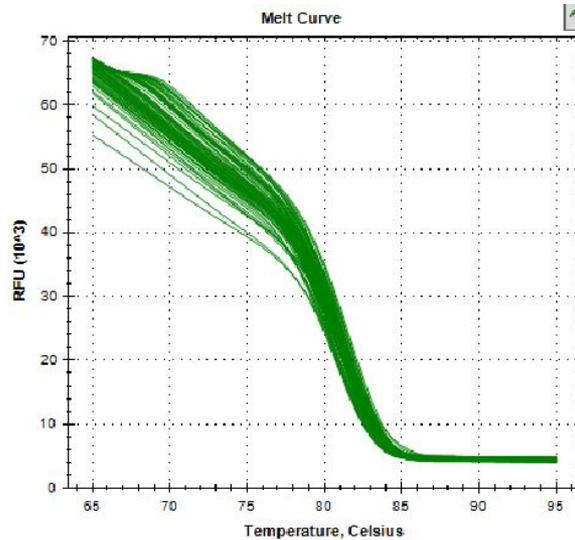


Кривые накопления флуоресценции в ПЦР «в реальном времени»: зависимость интенсивности флуоресценции (в нескольких пробирках — на каждую своя кривая) от номера цикла (Print Screen с амплификатора Bio-Rad).

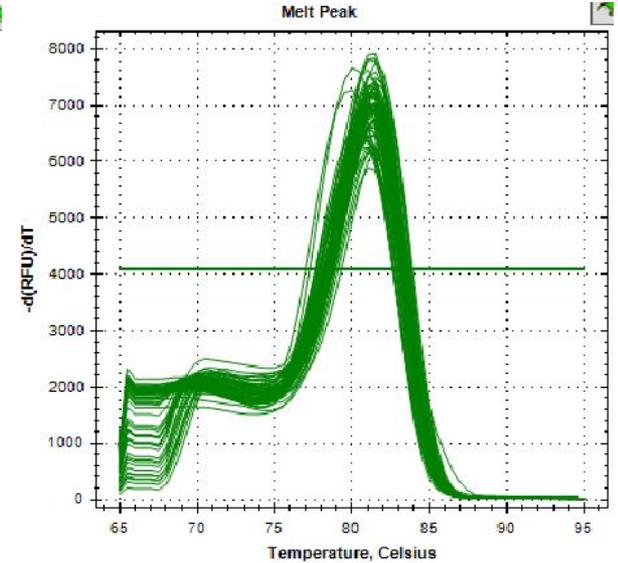
Кривые плавления ПЦР продукта



а



б



в

Параметры реакции амплификации фрагмента кДНК гена GIPR.

а) Графическое представление кинетики накопления продукта ПЦР при амплификации экспериментальных образцов.

б) Графическое представление кривой плавления продукта ПЦР при амплификации экспериментальных образцов.

в) Проекция значений C_t серии двукратных разведений для построения калибровочной кривой

5 trxr_prx_cdk4_cdk3_b2m_act

Файл Главная Вставка Разметка страницы Формулы Данные Рецензирование Вид

Вырезать Копировать Вставить Формат по образцу

Буфер обмена Шрифт Выравнивание

Microsoft Sans St 8,5

Перенос текста Объединить и поместить

S23

	A	B	C	D	E	F	G	I	J	K
1		Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq			
2	A01	SYBR			Unkn	TRXR	32,41		Control_1	
3	B01	SYBR			Unkn	TRXR	32,16		Control_2	
4	C01	SYBR			Unkn	TRXR	32,58		Control_3	
5	D01	SYBR			Unkn	TRXR	31,76		Control_4	
6	E01	SYBR			Unkn	TRXR	31,89		Control_5	
7	F01	SYBR			Unkn	TRXR	32,43		Target_1	
8	G01	SYBR			Unkn	TRXR	32,20		Target_2	
9	H01	SYBR			Unkn	TRXR	32,10		Target_3	
10	A02	SYBR			Unkn	TRXR	38,46		Target_4	
11	B02	SYBR			Unkn	TRXR	35,66		Target_5	
12	C02	SYBR			Unkn	act	20,85		Control_1	
13	D02	SYBR			Unkn	act	21,33		Control_2	
14	E02	SYBR			Unkn	act	19,59		Control_3	
15	F02	SYBR			Unkn	act	21,44		Control_4	
16	G02	SYBR			Unkn	act	20,66		Control_5	
18	A03	SYBR			Unkn	act	21,52		Target_1	
19	B03	SYBR			Unkn	act	22,10		Target_2	
20	C03	SYBR			Unkn	act	19,17		Target_3	
21	D03	SYBR			Unkn	act	20,84		Target_4	
22	E03	SYBR			Unkn	act	20,00		Target_5	
23										
24										
25										
26										

Контрольная группа

Исследуемая группа

Контрольная группа

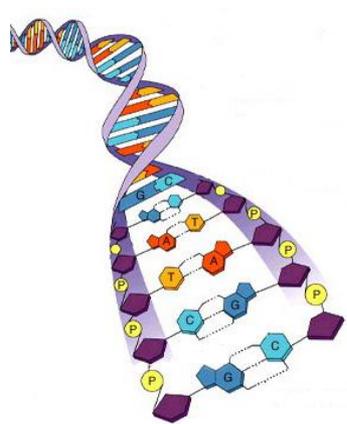
Исследуемая группа

Где TRXR – таргетный ген,
act - референсный

- Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации [Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR // Nucleic Acids Research. 2001. Vol. 29(9). P. 45.]:
- **Ratio = (E_{иссл})^{ΔC_{Тарг}(контр-иссл)} / (E_{реф})^{ΔC_{реф}(контр – иссл)}** , где
 - Ratio – относительный уровень экспрессии мРНК;
 - E – эффективность праймеров;
 - C_p – значение индикаторного цикла;
 - иссл – исследуемая группа;
 - контр – контрольная группа;
 - тарг –таргетный (исследуемый) ген;
 - реф –референсный ген (β2-microglobulin).
 - Относительный уровень экспрессии исследуемого гена вычисляется, исходя из его эффективности ПЦР в реальном времени (E) и разности (Δ) точек пересечения (C_p) неизвестного образца по сравнению с контрольным (ΔC_p=C_pисследуемого образца – C_pконтрольного образца).
 - Используемый относительный количественный анализ (Relative Quantification) основан на отношении экспрессий исследуемого к экспрессии референсного гена и является достаточным для большинства целей исследовать физиологические изменения в уровнях экспрессии генов

X = E^(ΔC_q исслед группы по референсу - ΔC_q контрольной группы по референсу) / E^(ΔC_q исслед группы по таргету - ΔC_q контрольной группы по таргету)

$$X = 2^{(21,52 - 20,85)} / 2^{(32,43 - 32,41)}$$



Область применения ПЦР

Генотипирование (скрининг мутаций или полиморфизмов)

1. Выявление генотипов повышенного риска развития мультифакторных заболеваний
2. Скрининг наследственных генетических заболеваний
3. Определение терапевтической эффективности определенным классом препаратов

Анализ активности (экспрессии) генов

1. Диагностика маркеров для выявления раковых заболеваний.

