Организация генетического аппарата живых организмов. Гены прокариот и эукариот. Строение. Транскрипция. Трансляция. Регуляция. Формирование транскрипта. Сплайсинг.

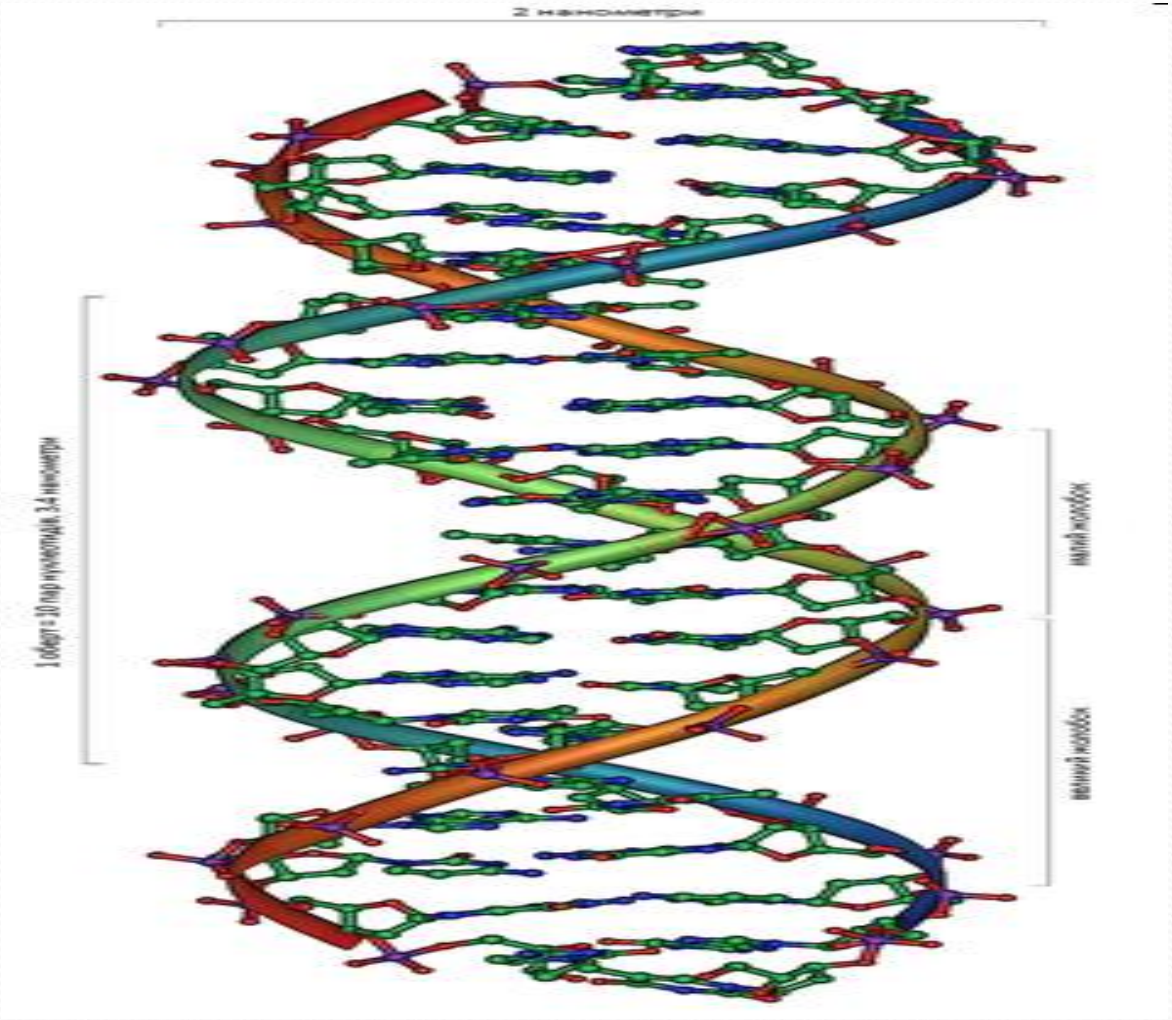
Историческая справка

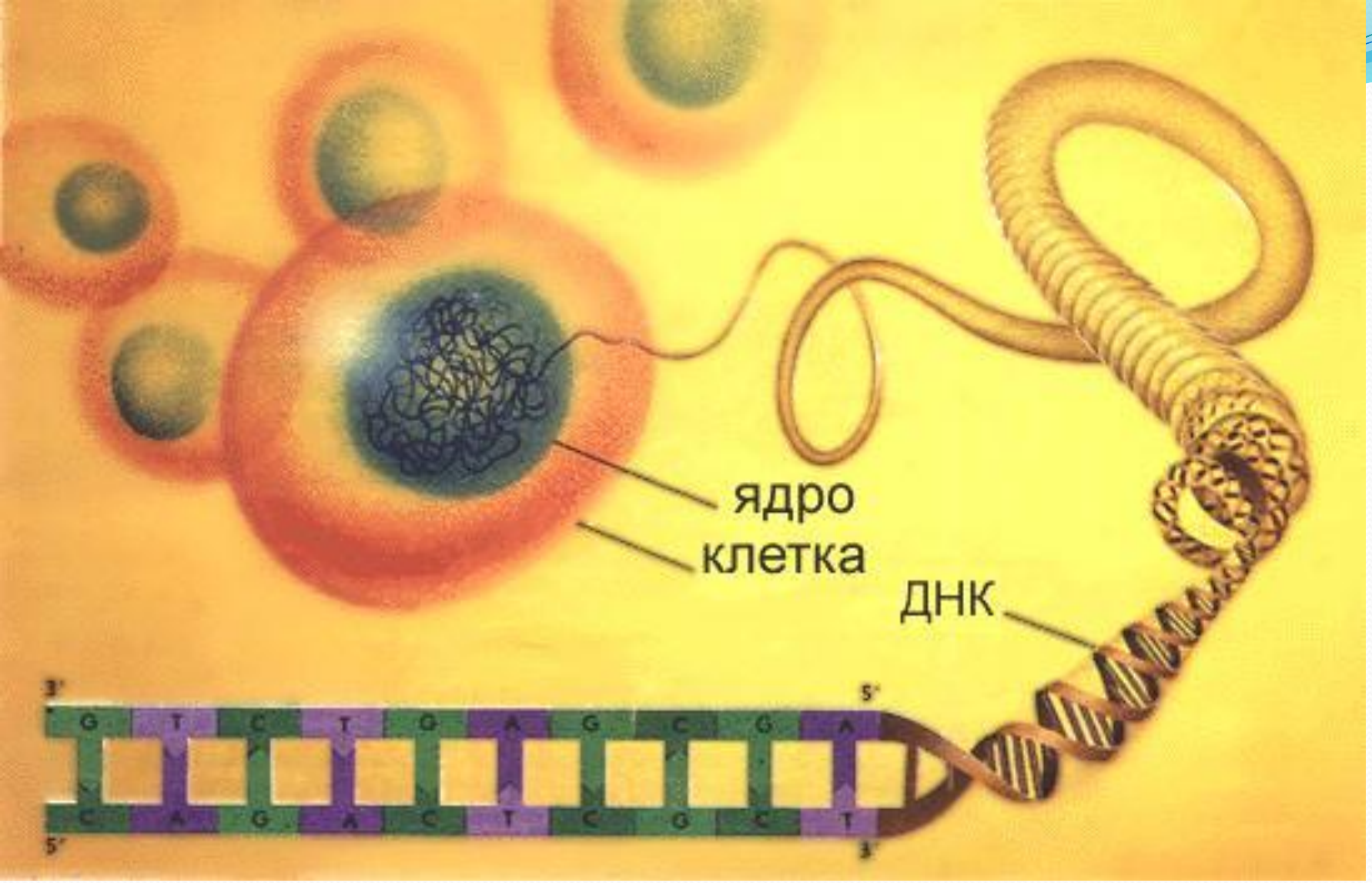
- 1865 г. – Мендель разработал основные законы генетики
- 1906 г. – Бэтсон предложил термин «генетика»
- 1909 г. – Бэтсон, Иогансон ввели понятие генотип, фенотип
- 1910-1925 гг. - Морган разработал хромосомную теорию, дискретность генов
- 1925 г. - Надсон. Филиппов установили мутагенное действие рентгеновских лучей в опытах на дрожжах
- 1944 г. – Эвери, Мак Коу, Мак Карти экспериментально обосновали роль ДНК в передаче наследственности
- 1953 г. – Уотсон, Крик раскрыли химическую структуру гена, код, репликацию, транскрипцию.

Материальная основа наследственности -

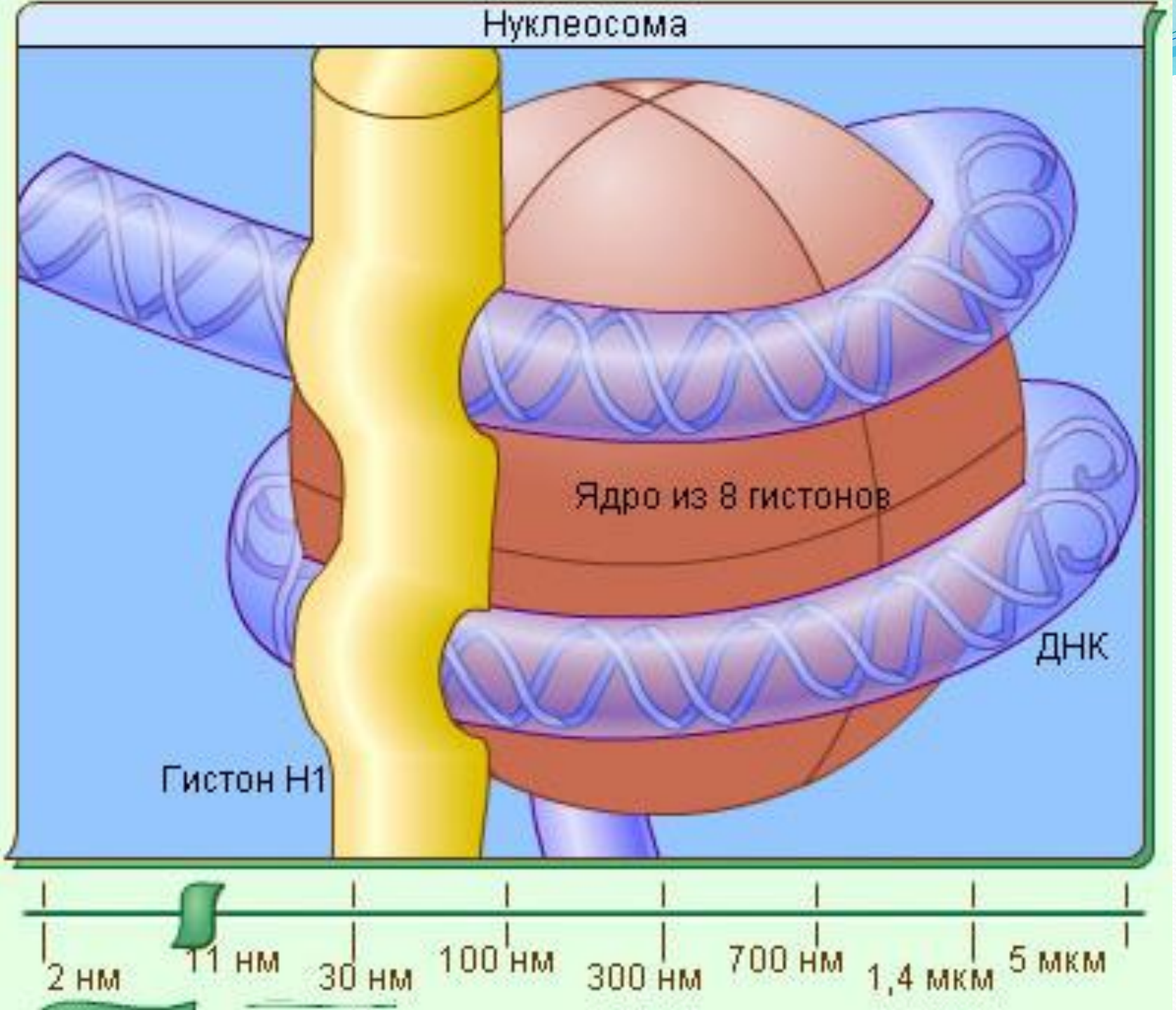
- **ДНК.**

Фрагмент ДНК





Молекула ДНК *состоит из двух цепей, построенных из нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов одной цепи комплементарна последовательности другой: А располагаются всегда против Т, а G против С. Благодаря комплементарности цепи удерживаются вместе.*


Нуклеосома
Ядро из 8 гистонов
ДНК
Гистон Н1
2 нм
11 нм
30 нм
100 нм
300 нм
700 нм
1,4 мкм
5 мкм

НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА

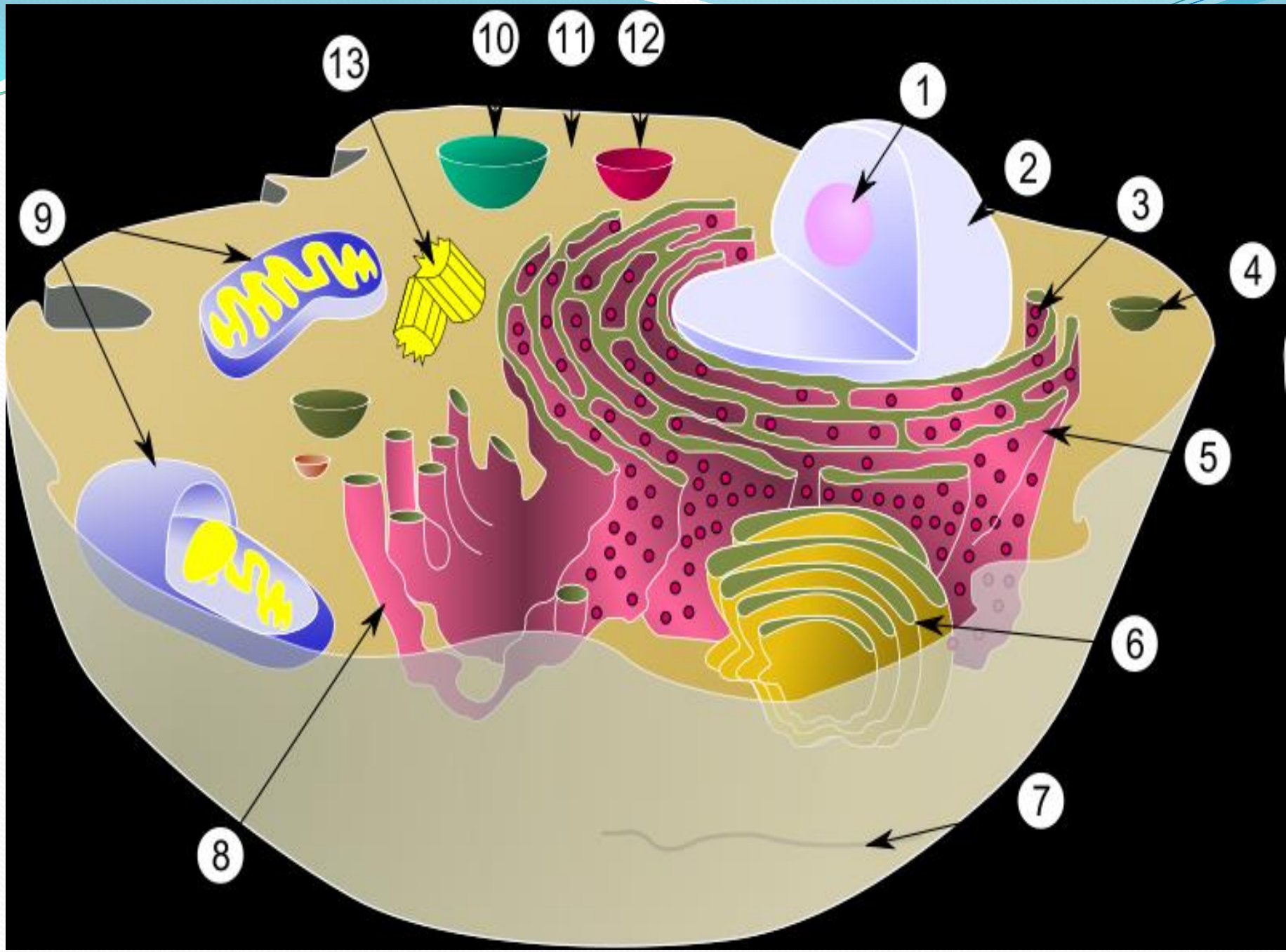
- **ДНК**
- **1. <u>Эукариоты</u> –** двунитчатая линейная.
- **2. <u>Прокариоты</u> –** двунитчатая кольцевая:
- * хромосомная
- * внехромосомная /плазмиды, мигрирующие генетические элементы/.
- **3. <u>Вирусы</u> –** дву- или однонитчатая /непрерывная или фрагментированная линейная или кольцевая/.

- **РНК**
- **<u>ВИРУСЫ:</u>**
- **1. Двунитчатая**
- **2. Однонитчатая** /непрерывная фрагментированная линейная кольцевая/.

Эукарио́ты, или Я́дерные (лат. Eukaryota от греч. εὐ- — хорошо и κάρυον — ядро)

- **— домен (надцарство) живых организмов, клетки которых содержат ядра.**

- К эукариотам относятся патогенные простейшие.

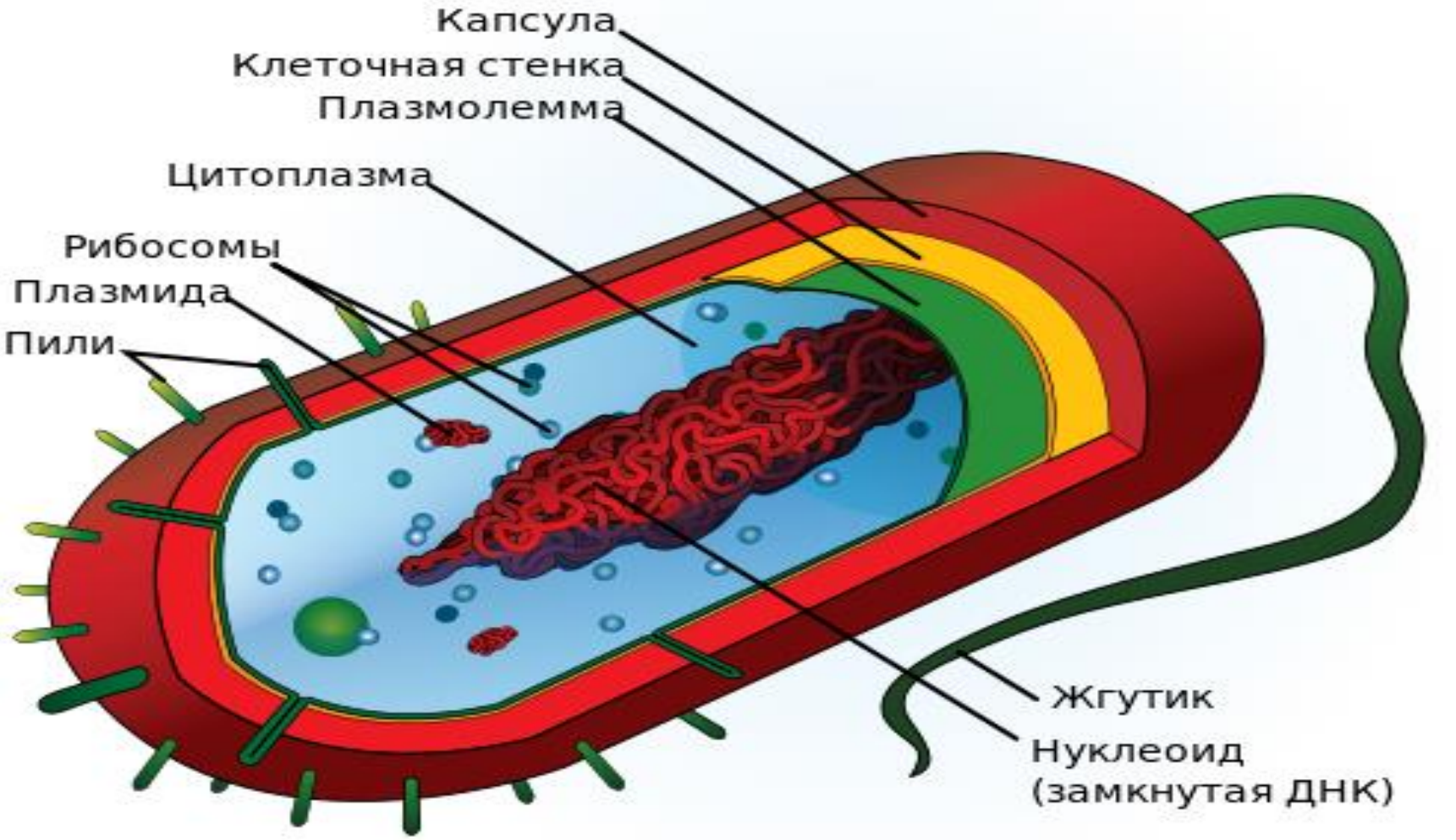

13
10
11
12
1
2
3
4
9
5
6
8
7

Прокариоты (лат. Procaryota, от др.-греч. πро «перед» и κάρυον «ядро»), или доядерные

- — одноклеточные живые организмы, не обладающие оформленным клеточным ядром и другими внутренними мембранными органоидами.

- **Для клеток прокариот характерно** отсутствие ядерной оболочки, ДНК упакована без участия гистонов.
- Единственная крупная кольцевая (у некоторых видов — линейная) двухцепочечная молекула ДНК, в которой содержится основная часть генетического материала клетки (так называемый нуклеоид) не образует комплекса с белками-гистонами (так называемого хроматина).

Схематическое строение прокариотической клетки



Основные отличия эукариот и прокариот

- 1. **Расположение генетического аппарата**.
- * **Эукариоты:** ГА находится в ядре и защищён ядерной оболочкой. ДНК эукариот линейная.
- * **Прокариоты:** ДНК кольцевая и находится в особой области клетки — нуклеоиде, не отделёна мембраной от остальной цитоплазмы.

- 2. **В жизненном цикле** эукариот обычно присутствуют две ядерные фазы (гаплофаза и диплофаза). Первая фаза характеризуется гаплоидным (одинарным) набором хромосом, далее, сливаясь, две гаплоидные клетки (или два ядра) образуют диплоидную клетку (ядро), содержащую двойной (диплоидный) набор хромосом. Спустя несколько делений клетка вновь становится гаплоидной. Такой жизненный цикл и в целом диплоидность **для прокариот не характерны**.

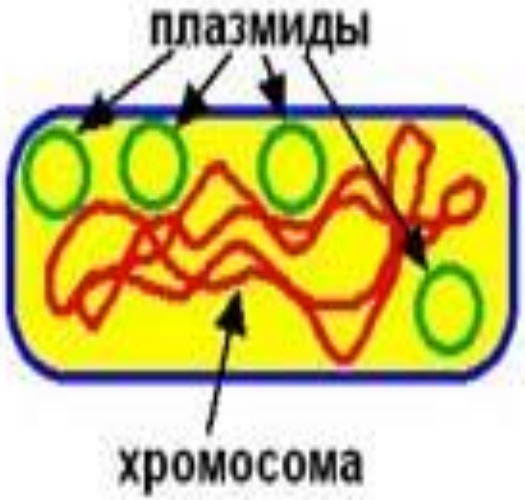
- 3. **Наличие у эукариотических клеток особых органелл**, имеющих свой генетический аппарат, размножающихся делением и окружённых мембраной — митохондрии и пластиды. Прокариоты - малое количество органелл, и ни одна из них не окружена двойной мембраной. В клетках прокариот *нет эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и лизосом.*

- 4. **Наличие у эукариот эндоцитоза**, в том числе у многих групп — фагоцитоза (способность захватывать, заключая в мембранный пузырёк, и переваривать самые разные твёрдые частицы) – защитная функция.
- 5. **Размеры** прокариотических клеток несоизмеримо меньше, и поэтому в процессе эволюционного развития эукариот у них возникла проблема снабжения организма большим количеством пищи (появление настоящих, подвижных хищников).

Геном - совокупность всей наследственной информации организма

Генетическая информация бактерии *Escherichia coli*

закодирована в единственной двуцепочечной кольцевой молекуле ДНК, содержащей 4.6 млн пар нуклеотидов



Мол. масса 3×10^6 Да

Длина молекулы ~ 1.5 мм

Время репликации - 20 мин.

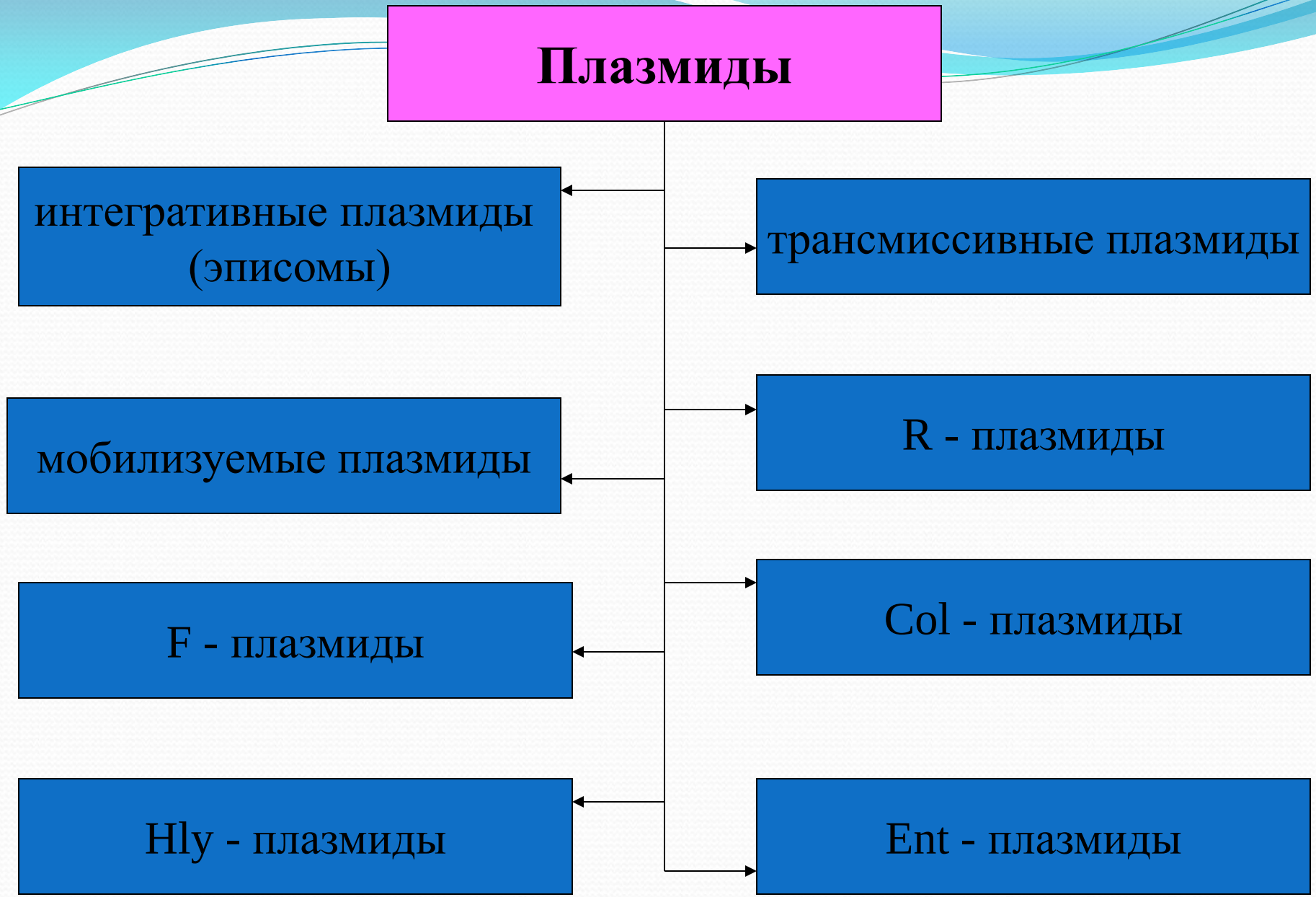
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ ГЕНОВ *E.coli*, выявленное по полной нуклеотидной последовательности генома

П л а з м и д ы:

- — дополнительные факторы наследственности, расположенные в клетках вне хромосом и представляющие собой кольцевые (замкнутые) или линейные молекулы ДНК.
- От 2000 до нескольких сот тыс.оснований.

Плазмиды

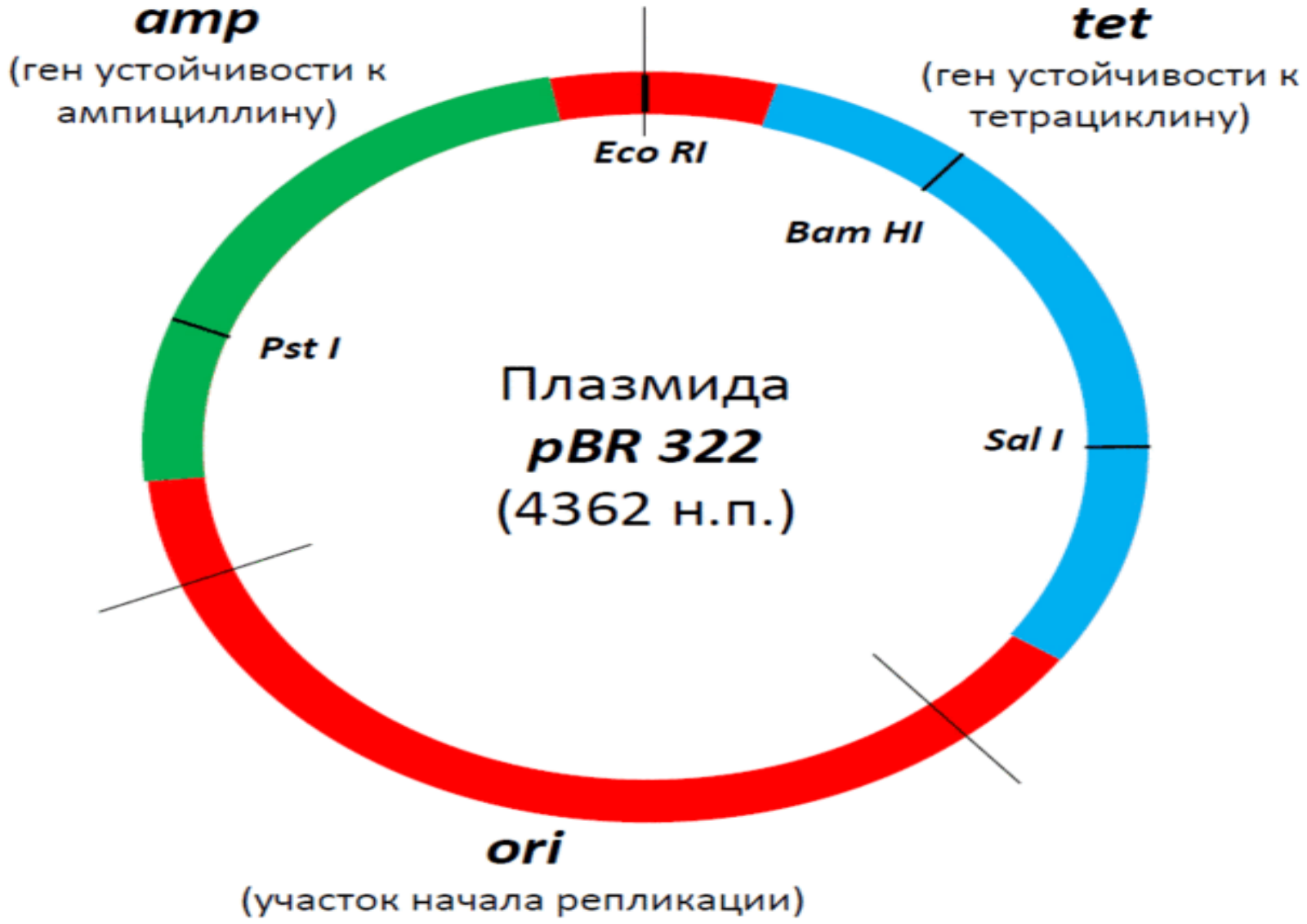
- **1. Дают возможность бактериям:**
- * расти в присутствии антибиотика;
- * использовать для метаболизма более широкий круг субстратов;
- * защиты от бактериофагов;
- * устранение конкурентов путем синтеза бактериоцинов (Col).
- 2. Плазмида поддерживается благодаря своей приспособленности к условиям внутри клетки.
- 3. Некоторые плазмиды придают бактериям **патогенные свойства** (Hly, Ent).


Плазмиды
интегративные плазмиды (эписомы)
трансмиссивные плазмиды
мобилизуемые плазмиды
R - плазмиды
F - плазмиды
Col - плазмиды
Hly - плазмиды
Ent - плазмиды

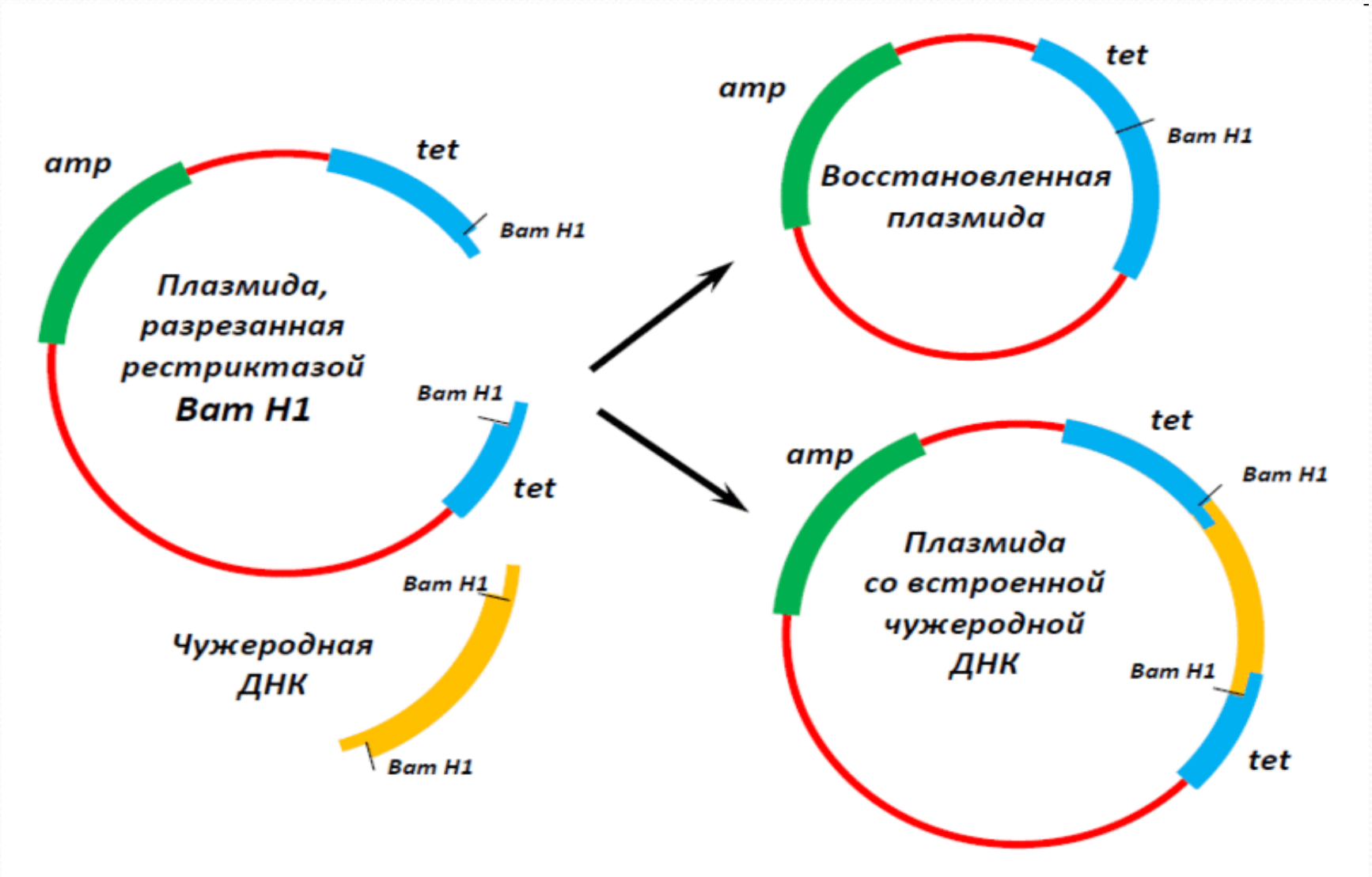
Функции плазмид в клетке.

1. перенос генетического материала при конъюгации — *F-плазмида*;
2. плазмиды бактериоциногенности контролируют синтез белков,
3. летальные для других бактерий — *Col-плазмиды*;
синтез гемолизинов — *Hly-плазмиды* (являются конъюгативными);
4. устойчивость к тяжёлым металлам;
5. устойчивость к антибиотикам (*R-плазмиды*);
6. синтез энтеротоксинов — *Ent-плазмиды*;
7. устойчивость к УФ-излучению;
8. синтез антигенов, обеспечивающих адгезию бактерий на клетках в организме человека и животных — *плазмиды антигенов колонизации*;

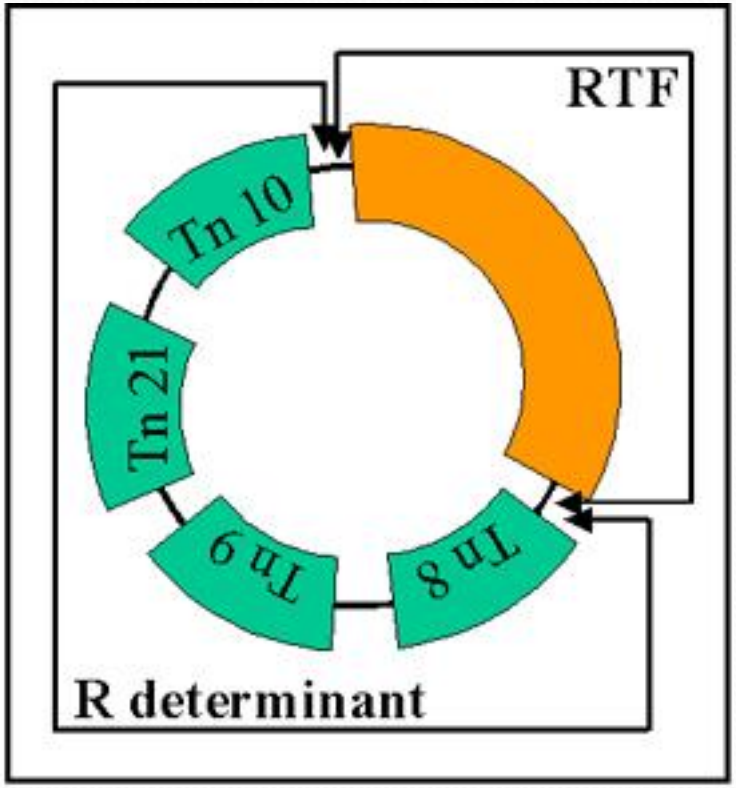
и др.


amp
(ген устойчивости к ампициллину)
tet
(ген устойчивости к тетрациклину)
Eco RI
Bam HI
Pst I
Sal I
Плазмида
pBR 322
(4362 н.п.)
ori
(участок начала репликации)

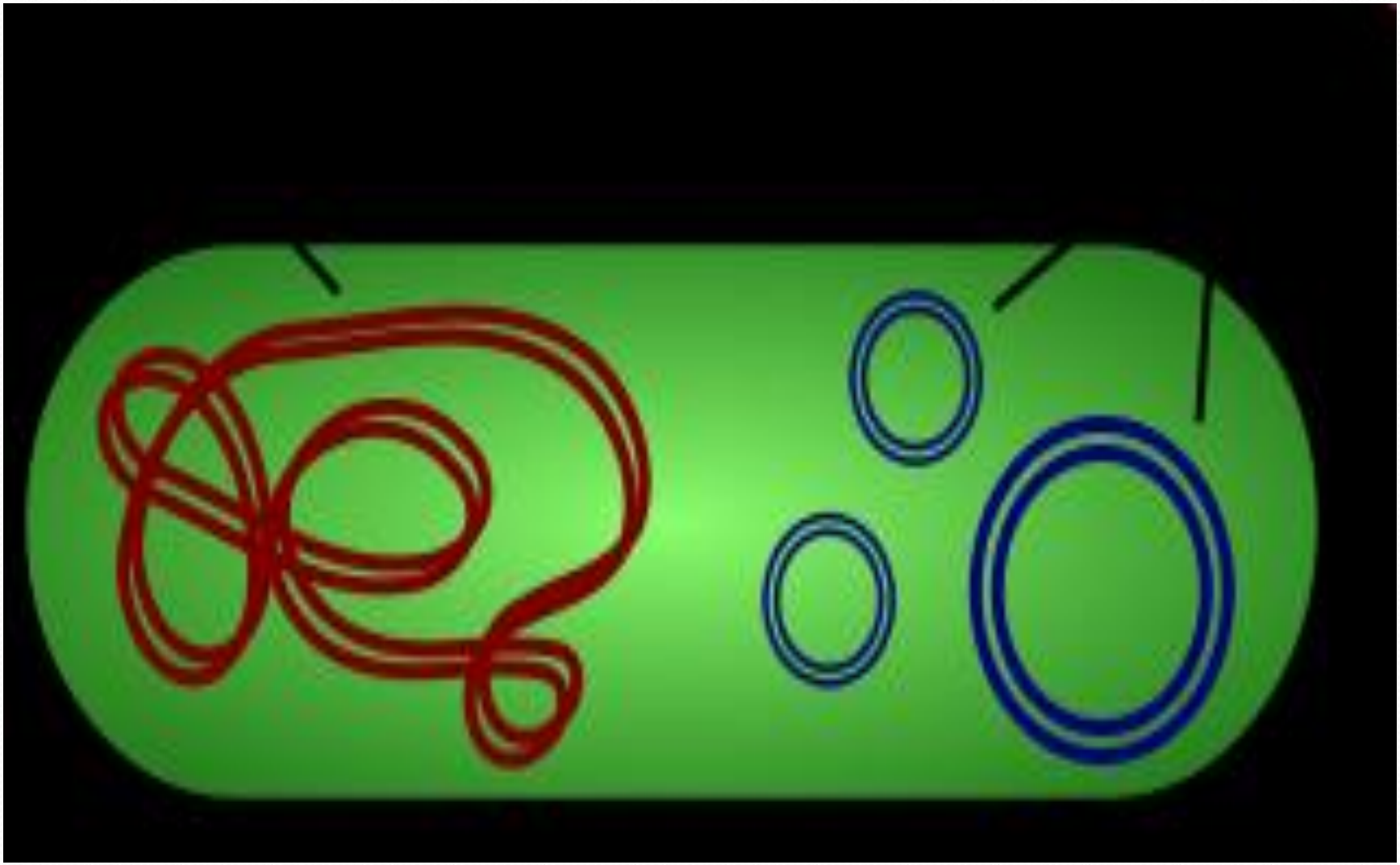
Взаимодействие плазмиды с чужеродной ДНК



Строение R плазмиды



Хромосомная ДНК и плазмиды



Мигрирующие генетические элементы

- 1. Транспозоны.
- 2. Умеренный (дефектный) бактериофаг – аналог транспозона.

Транспозоны (1951 г. Барбара Мак-Клинток, Нобелевская премия 1983 г.).

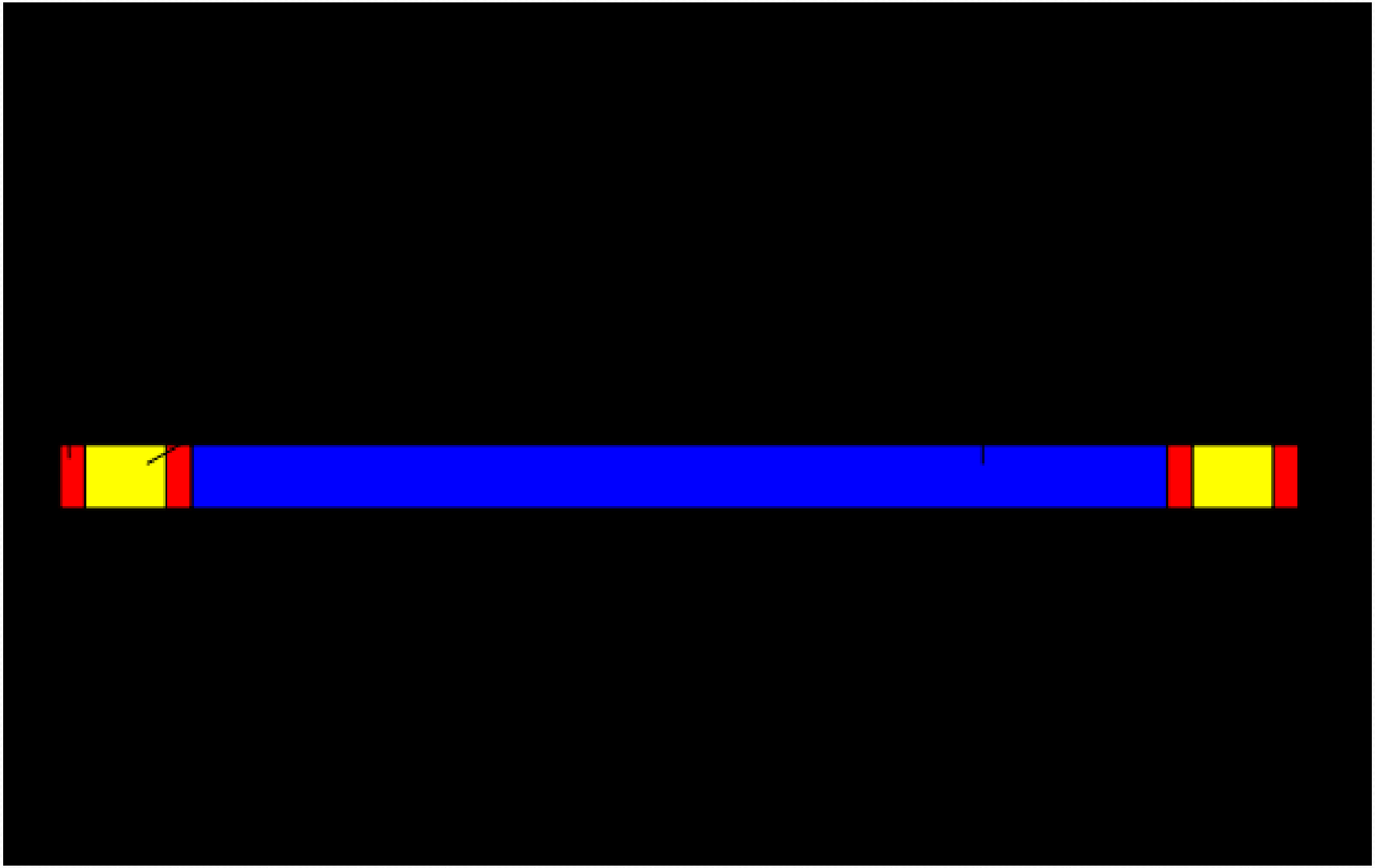
- Транспозо́н — последовательность ДНК, способная перемещаться внутри генома в результате процесса, называемого транспозицией.

Транспозоны -

- один из классов мобильных элементов генома, которые, встраиваясь в геном, могут вызывать мутации, в том числе и такие значительные как хромосомные перестройки.
- Играют важную роль в процессах переноса лекарственной устойчивости среди микроорганизмов, рекомбинации, и обмена генетическим материалом между различными видами микроорганизмов.

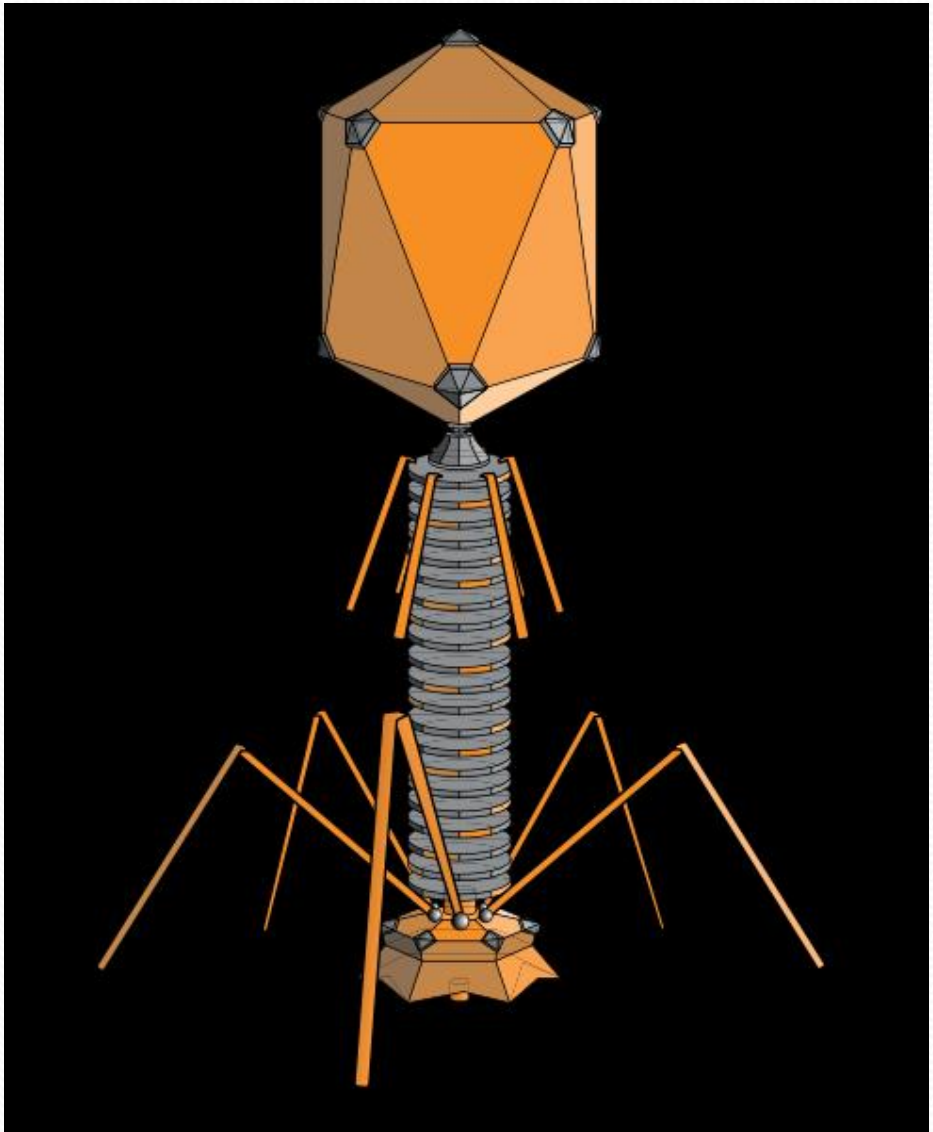
- **Транспозоны** обычно состоят из двух прямых или инвертированных повторяющихся последовательностей ДНК, необходимых для транспозиции, между которыми находятся белок-кодирующие гены.

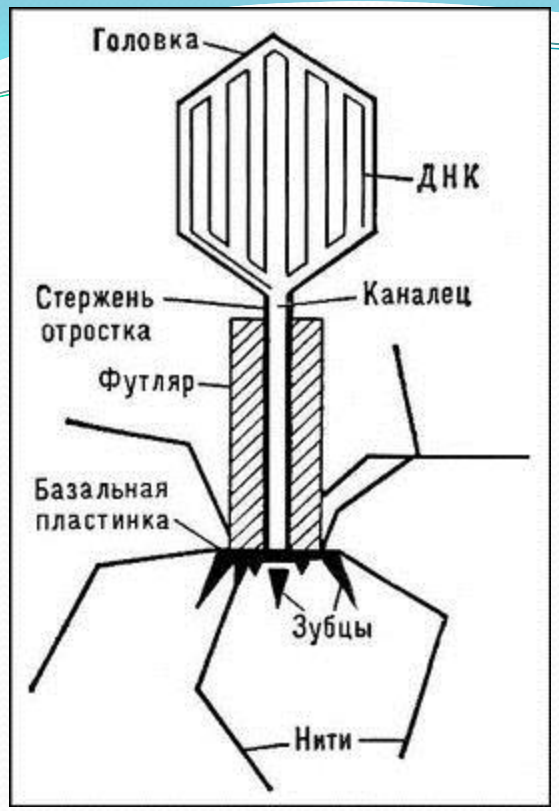
Схематическое строение



Умеренный бактериофаг

Аналог транспозона. Применяются в качестве векторов, переносящих участки ДНК. Возможна естественная передача генов между бактериями посредством некоторых фагов (трансдукция).





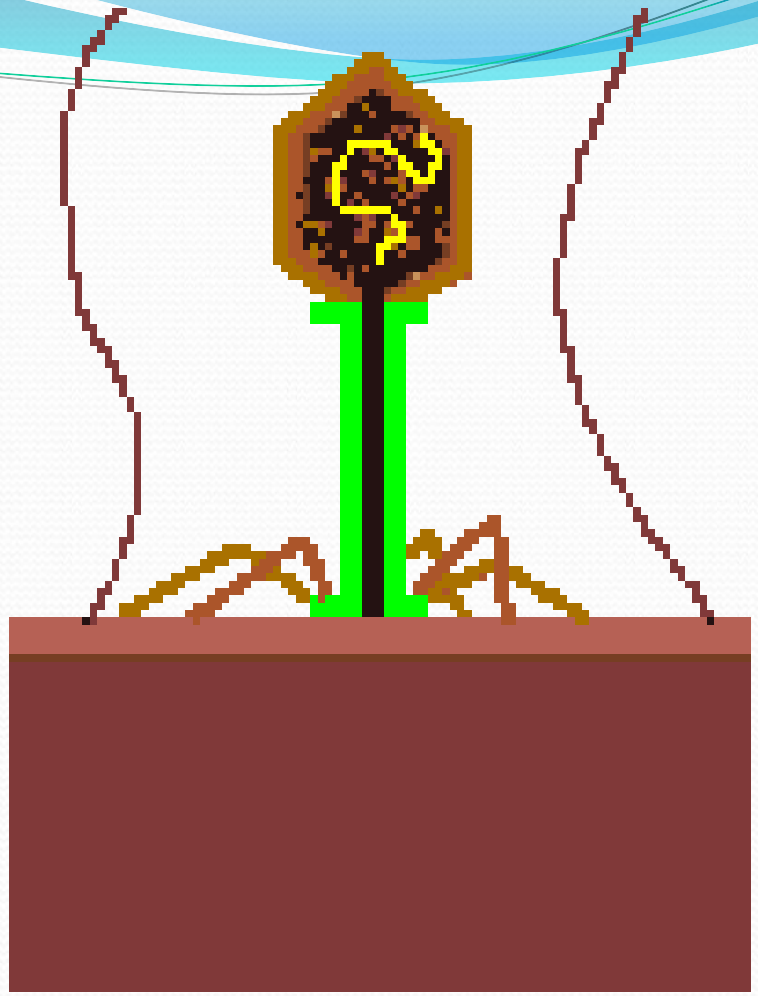
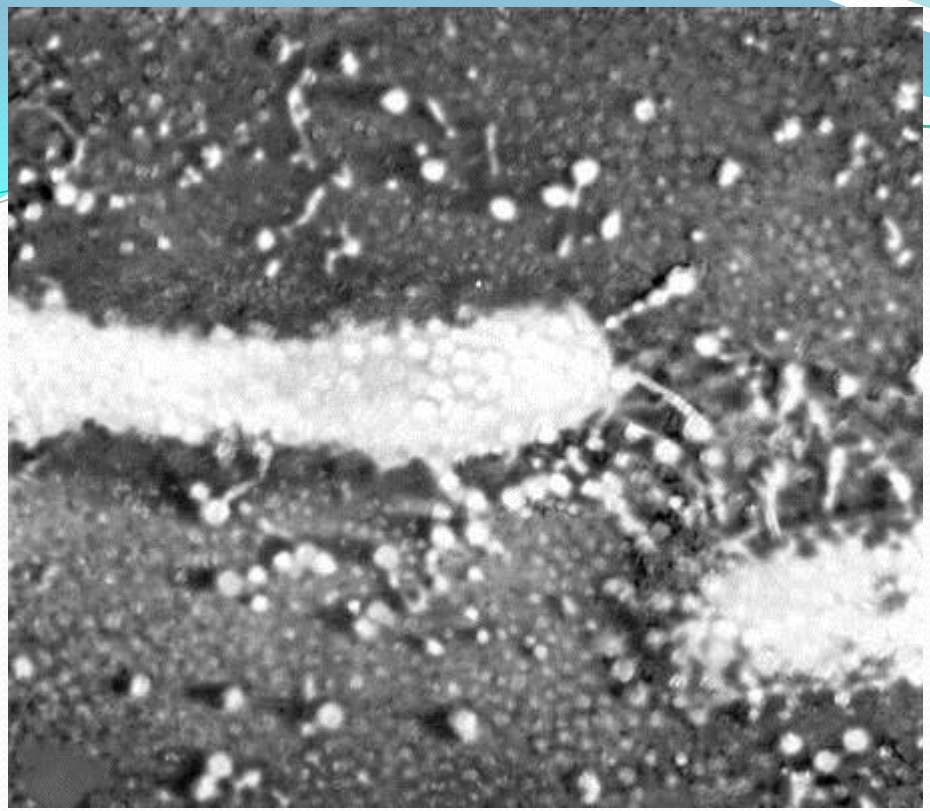
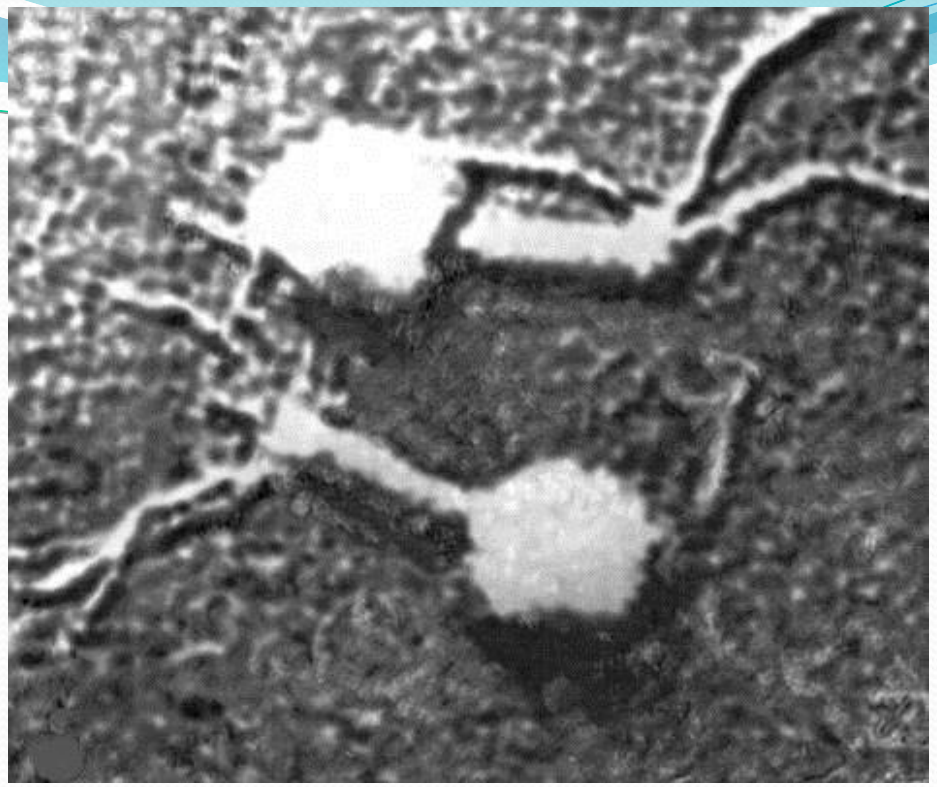


Схема строения частицы бактериофага Т2 кишечной палочки.

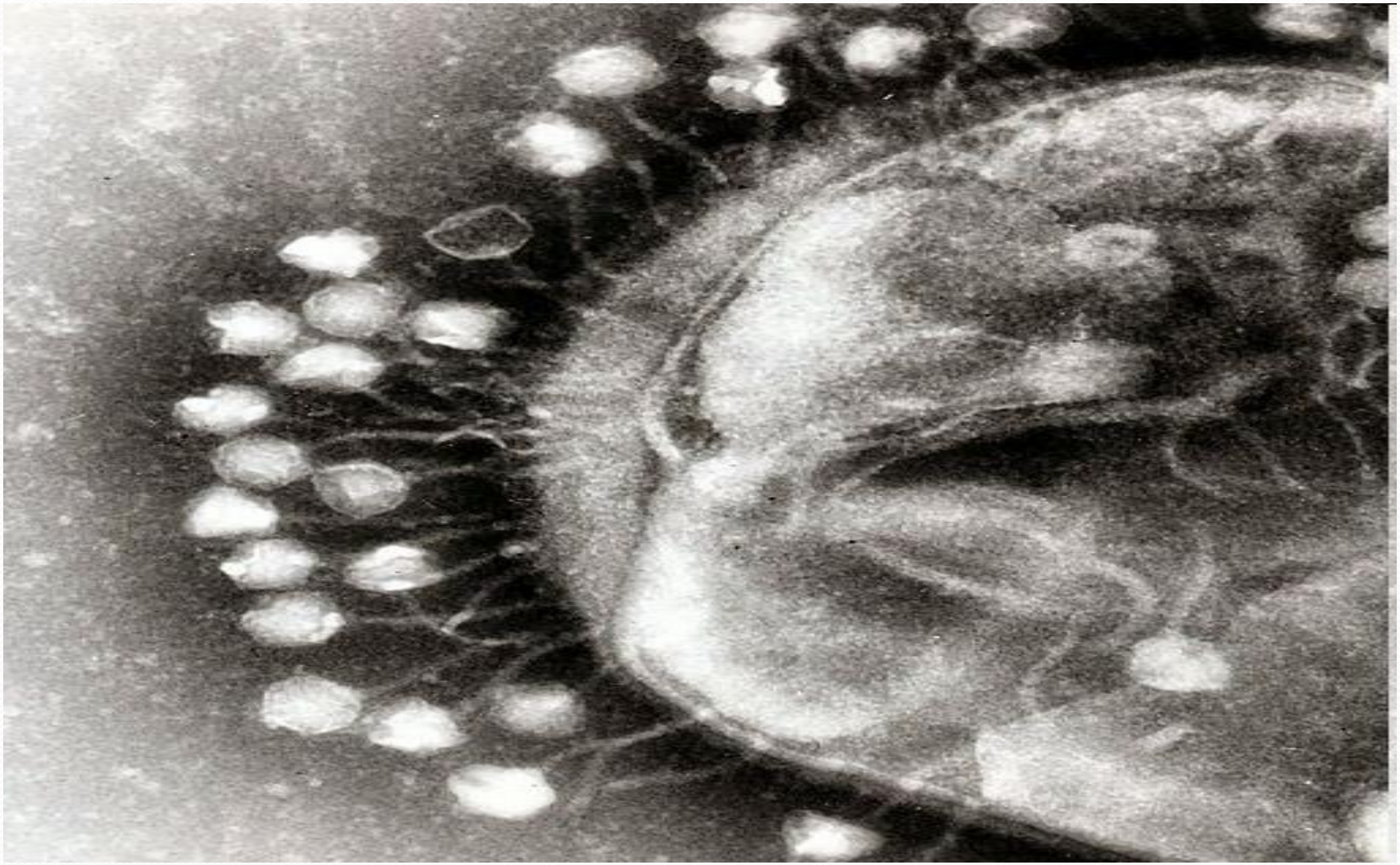


Электронная микрофотография кишечной палочки, окруженной частицами заражающего её фага Т2.



Электронная микрофотография фага Т2 при большем увеличении.

Бактериофаги атакуют бактериальную клетку



Рекомбинации —

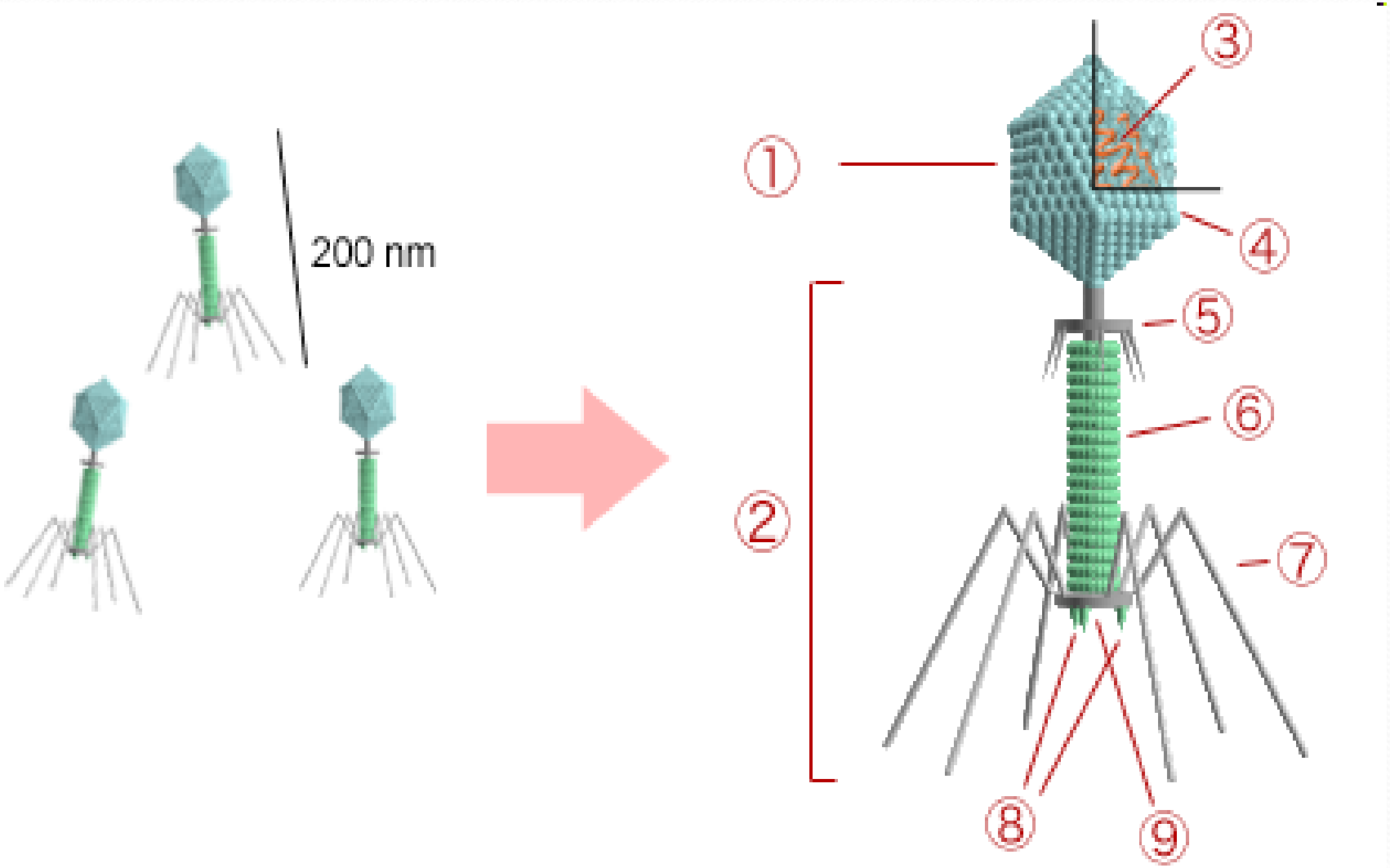
- процесс обмена генетическим материалом путем разрыва и соединения разных молекул.
- * трансдукция
- * трансформация
- * конъюгация.
- У вирусов возможна рекомбинация между молекулами РНК их геномов.

Трансдукция

(от лат. transductio — перемещение)

- — процесс переноса бактериальной ДНК из одной клетки в другую **бактериофагом**.
- Используется в генетике бактерий для картирования генома и конструирования штаммов.
- К трансдукции способны как умеренные фаги, так и вирулентные, последние, однако, уничтожают популяцию бактерий, поэтому трансдукция с их помощью имеет значение при лечении бактериальных инфекций (дизентерия, сальмонеллез, эшерихиоз).

Схема строения бактериофага



Пути развития фагов в бактериальной клетке

- **Литический** — после попадания в бактерию ДНК фага сразу же начинается его репликация, синтез белков и сборка готовых фаговых частиц, после чего происходит **лизис клетки (**вирулентные – для лечения инфекционных заболеваний).
- **Лизогенный** — попавшая в бактериальную клетку ДНК фага встраивается в её хромосому или существует в ней как **плазмида**, реплицируясь при каждом делении клетки. Такое состояние бактериофага носит название **профаг** (умеренные фаги – привносят новую информацию – синтех экзотоксина дифтерийной палочки).

Трансформация

- — процесс поглощения клеткой организма свободной молекулы ДНК из среды и встраивания её в геном, что приводит к появлению у такой клетки новых для неё наследуемых признаков (набл. только в лаборатории).

Схема опыта трансформации in vivo
(Грифффит, 1928 г.)

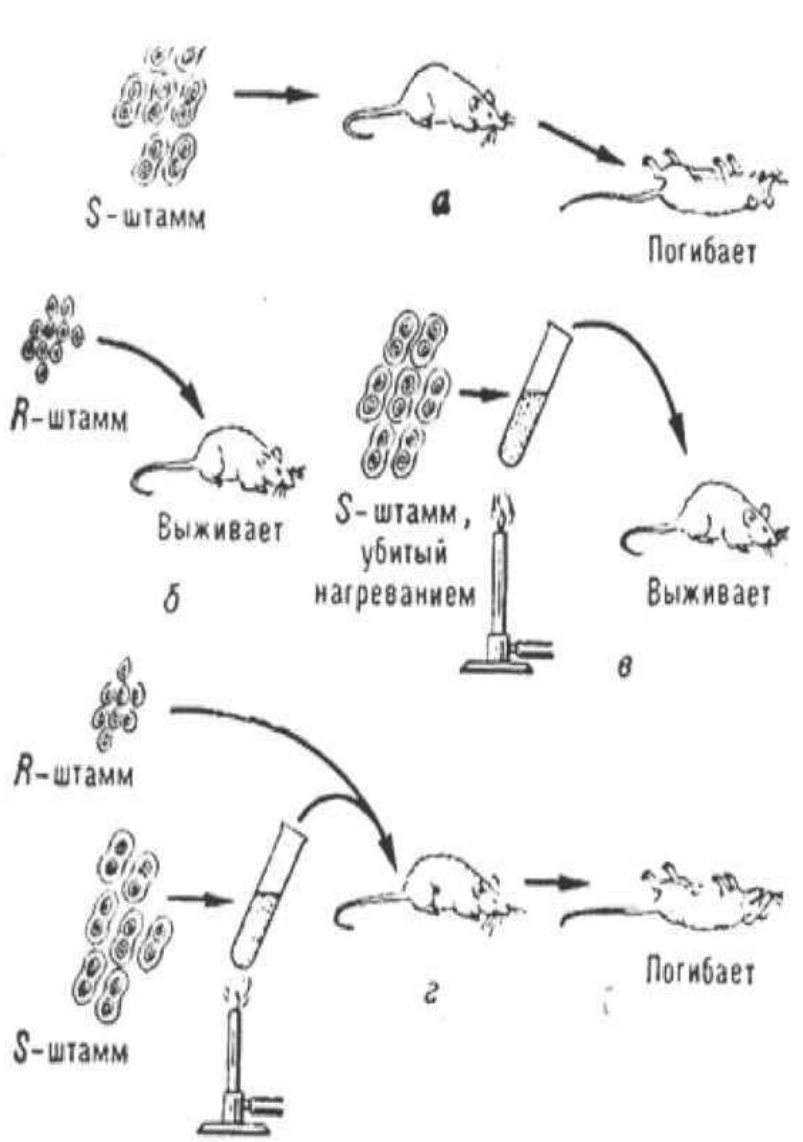


Схема эксперимента: а — мышь, которой введена культура патогенного капсулированного штамма S пневмококков, погибает; б — мышь, которой введена культура непатогенного бескапсульного R—мутанта нормального S—штамма, не погибает; в — мышь, которой введена культура S— штамма, убитого предварительно нагреванием, не погибает; г — мышь, которой Введена смесь живой культуры R—мутанта и убитой нагреванием культуры нормального S—штамма, погибает; в этом случае присутствие убитых нагреванием S—бактерий вызвало трансформацию живых R—бактерий, в результате чего у них восстановилась способность к образованию капсулы и патогенность.

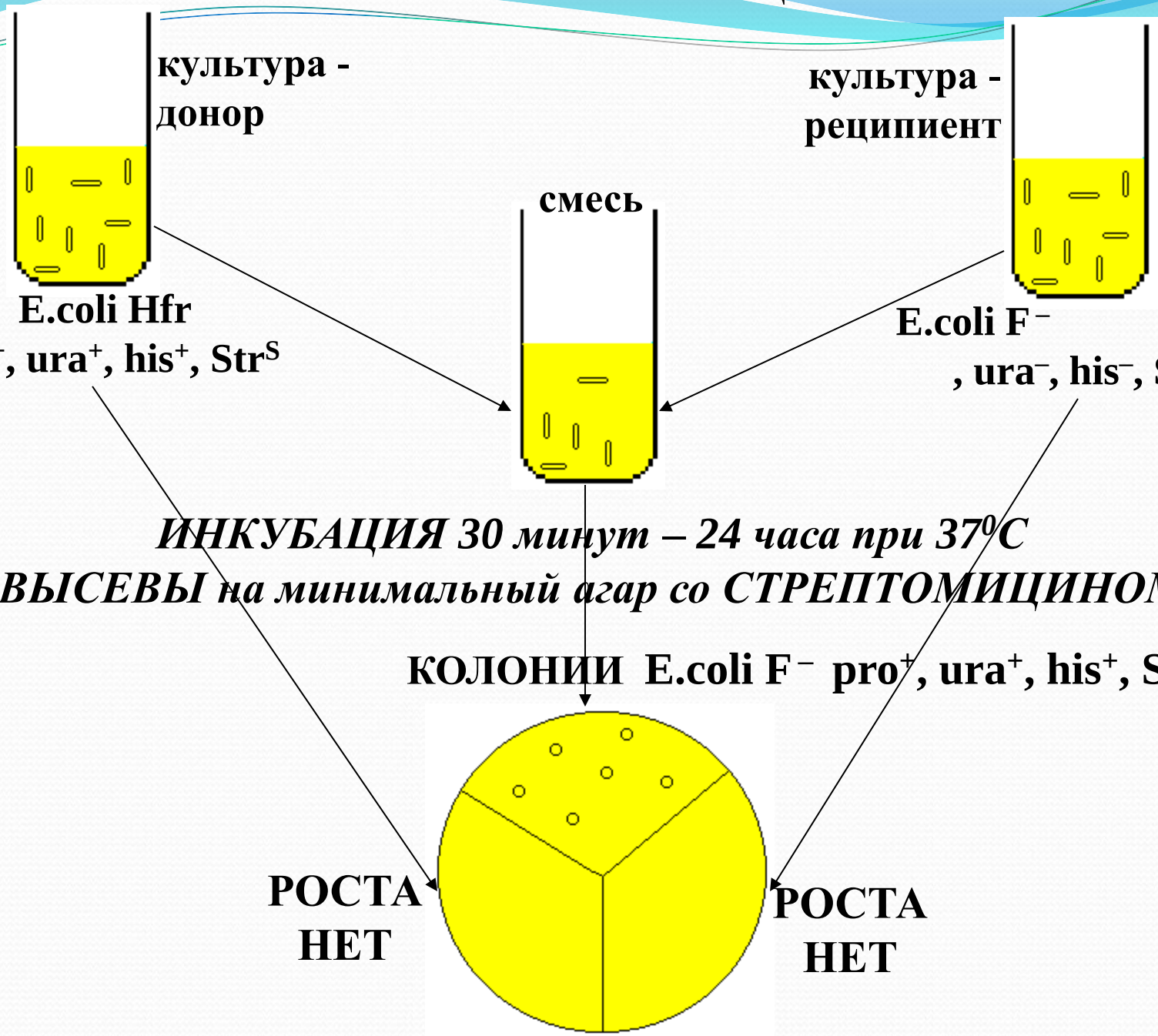
Конъюга́ция

(от лат. conjugatio — соединение, 1946 г.)

- - парасексуальный процесс — однонаправленный перенос части генетического материала (плазмид, бактериальной хромосомы) при непосредственном контакте двух бактериальных клеток.
- Позволяет передавать наибольшее количество генетической информации.

- Для успешного установления контакта двух клеток в клетке-доноре должна присутствовать конъюгативная (половая, трансмиссивная) плазмида.
- Первой из них была открыта F-плазмида: эписома (способная встраиваться в бактериальную хромосому), длиной около 100 тыс. пар оснований.
- Плазмида несёт гены, кодирующие ряд функций:
- 1. образование половых пилей, отвечающих за приклепление к клетке-реципиенту;
- 2. препятствие прикреплению пилей бактерий другого вида.

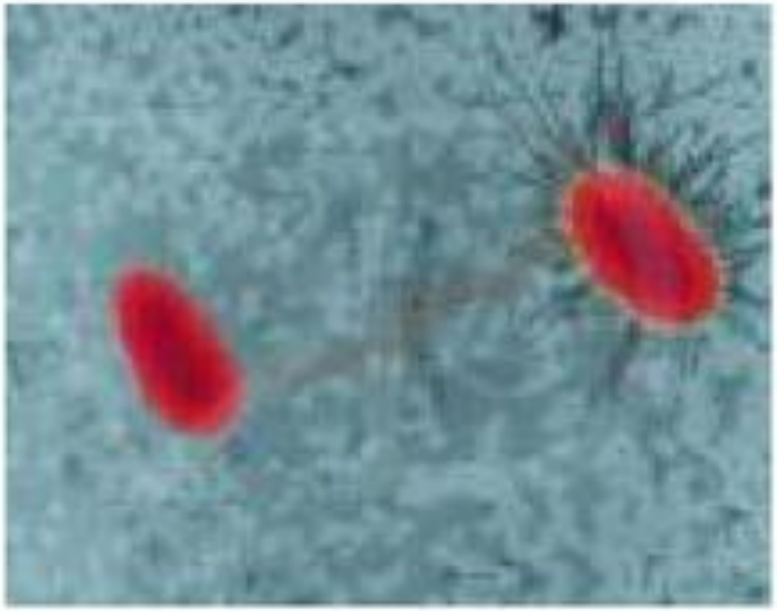
ОПЫТ КОНЪЮГАЦИИ

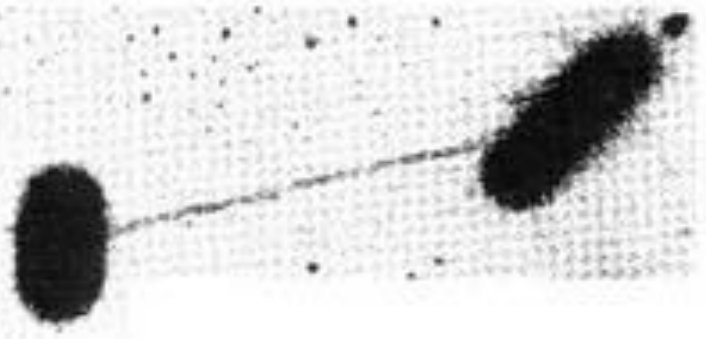


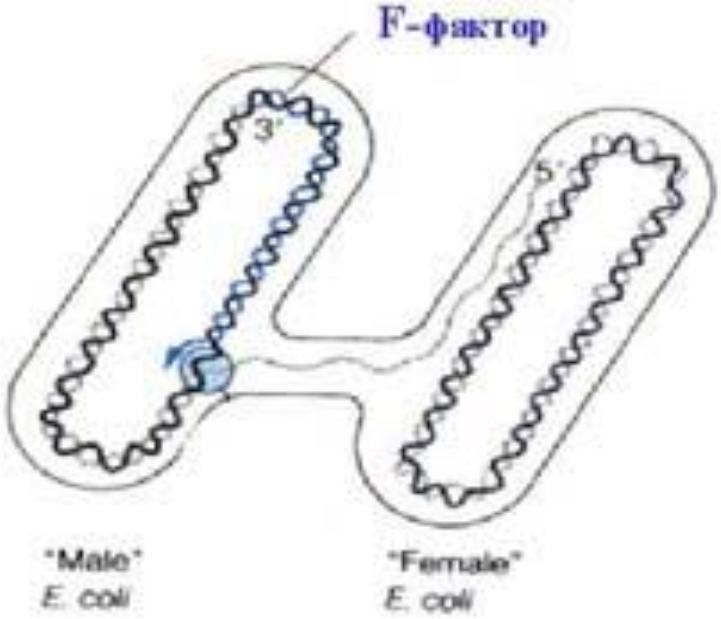
Электронномикроскопическое изображение конъюгации у кишечной палочки; удлинённая клетка — донор, круглая — реципиент.

Половой процесс у бактерий

Бидл и Тейтум, 1946; У. Хейс, 1952







Кольцевая ДНК, называемая F-фактор (fertility factor) способна встраиваться в геном бактерии. Содержащие F-фактор клетки образуют особые F-пили (половые ворсинки), с помощью которых поприкрепляются к клеткам, не имеющим F-фактора, образуя конъюгационный мостик. При репликации встроенного F-фактора бактериальная хромосома также реплицируется. F-фактор "мобилизует" ее и переносит часть хромосомы через конъюгационный мостик в другую клетку.

Схематическое изображение конъюгации у *E.coli*

Генетическая инженéрия (генная инженерия) —

- совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

- Генетическая инженерия - является инструментом биотехнологии, используя методы таких биологических наук, как молекулярная и клеточная биология, цитология, генетика, микробиология, вирусология.

Задачи генной инженерии состоят в разработке:

- 1. Методов получения элементов, несущих новую полезную генетическую информацию.
- 2. Разработка способов переноса этих генетических элементов в другую клетку.
- 3. Способов контроля за функционированием таких элементов в рекомбинантной клетке.

Опасности генной инженерии

- 1. Изменение свойств м/о приводит к нарушению биоценоза.
- 2. Создание аномально устойчивых к антибиотикам м/о.
- 3. Возможность выхода из под контроля процесса передачи генно-инженерной информации от одного вида бактерий к другому.

Биотехнология -

- - дисциплина, изучающая возможности использования живых организмов, их систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач, а также возможности создания живых организмов с необходимыми свойствами методом генной инженерии.

- – изучает процессы модификации биологических организмов для обеспечения потребностей человека, начиная с модификации растений и одомашненных животных путем искусственного отбора и гибридизации: улучшить качество пищевых продуктов и увеличить продуктивность живых организмов.

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Генетический аппарат клетки

- Геном- генетический материал ядра в гаплоидном наборе хромосом.
- Геном – суммарная длина ДНК в гаплоидном наборе хромосом.

Термин «геном» - Г. Винклер

Функциональная единица- ген

Размеры генома

- Мелких ДНК-содержащих вирусов 0,4-1 мкм (1200-3000 п.н.)
- Геном пластид и митохондрий – 5-100 мкм (15000-300000 п.н.).
- Бактерий – 1000-2000 мкм (3-6 млн. п.н.)
- E.coli – 1200 мкн (1,2 мм)
- Saccharomyces cerevisiae – 13390 т.п.н
- Геном млекопитающих – 3×10^9 п.н.
- Геном человека – 1990 создана Международная организация по изучению генома человека.

3,2 млрд. п.н;

- **Геномика** - направление в молекулярной биологии, занимающееся исследованием структуры и функций всей совокупности генов организма или значительной их части.

Протеомика – наука, изучающая белковый состав биологических объектов, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул.

Геном прокариот

1. Объем генома E.coli – 1200 мкн (1,2 мм)
2. Информативная емкость генома – 2000-4000 генов
3. Нет дуплицирующихся генов
4. Классы генов по генопродуктам:

- Структурные – кодируют белки
- Регуляторные – кодируют белки-репрессоры
- Гены т-РНК – кодируют молекулы т-РНК
- Гены р-РНК – кодируют молекулы р-РНК

Геном эукариот

1. Σ длина молекулы ДНК человека -187 см

2. Классы генов по генопродуктам:

- Структурные – кодируют белки
- Регуляторные – кодируют белки-репрессоры
- Гены т-РНК – кодируют молекулы т-РНК
- Гены р-РНК – кодируют молекулы р-РНК
- Гены гистоновые – кодируют гистоновые белки

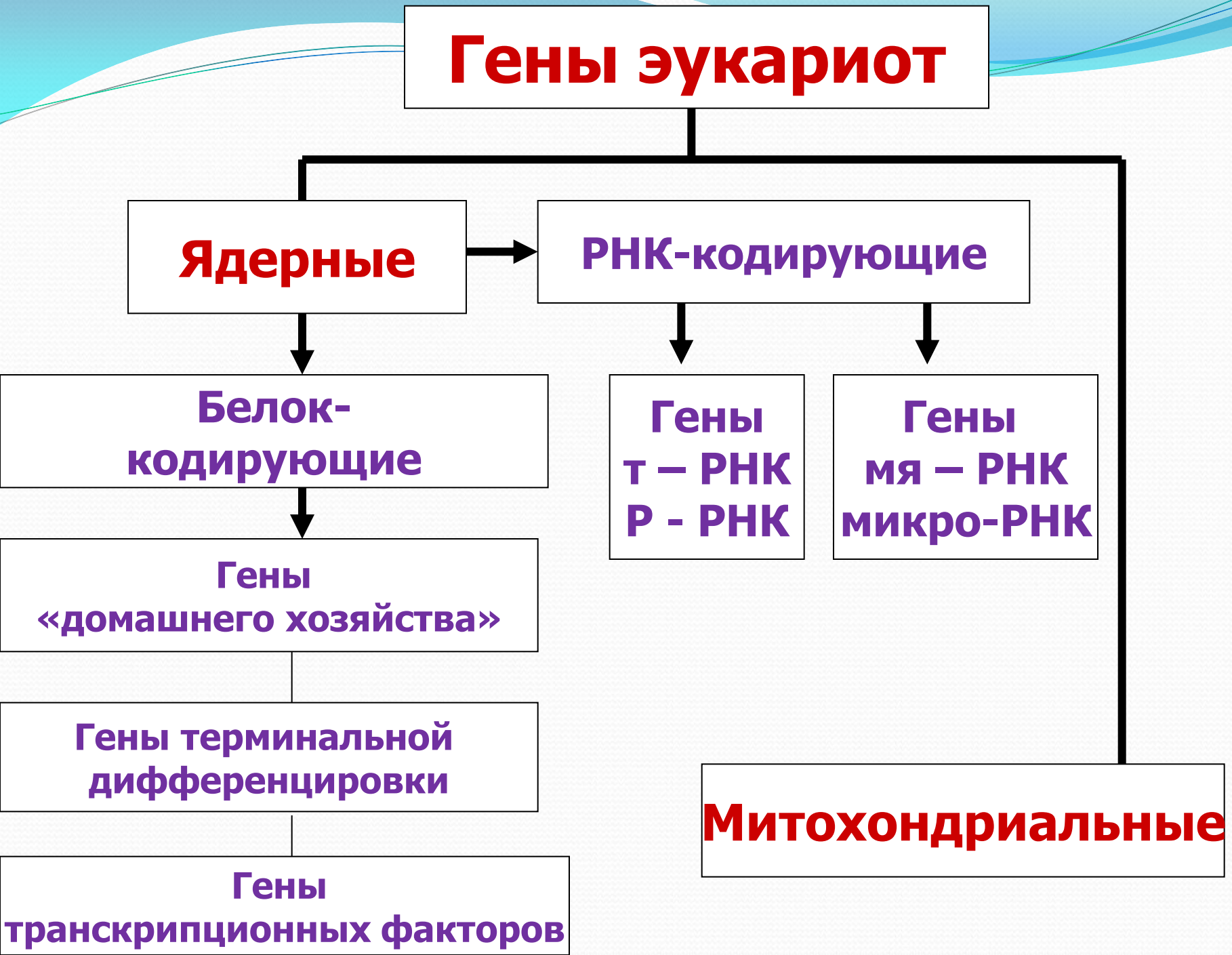
3. Информативная емкость генома – 27 тысяч генов (у человека)

4. Избыточность ДНК в геноме – наличие дуплицирующихся генов

По числу повторов:

- **Уникальные – до 10 повторов на геном (структурные гены)**
- **Умеренно повторяющиеся -10^2 - 10^5 на геном (регуляторные, гистоновые, гены т-РНК, гены р-РНК)**
- **Многократно повторяющиеся – более 10^5 на геном.**

В организации генома эукариот заложен принцип чередования уникальных и повторяющихся последовательностей (интерсперсия)


Гены эукариот
Ядерные
РНК-кодирующие
Белок-кодирующие
Гены «домашнего хозяйства»
Гены терминальной дифференцировки
Гены транскрипционных факторов
Гены т – РНК Р - РНК
Гены мя – РНК микро-РНК
Митохондриальные

Повторяющаяся ДНК

- **Тандемные повторы** - расположены друг за другом. У дрозофилы – повторяющиеся единицы в 5-7 п.н. (AATAT), (AATAG), (AATATC) и др.

1. Центромерная ДНК (альфоидная)
2. Теломерная ДНК – GGGTTA
3. Рибосомная ДНК

- **Диспергированные повторы** – разбросаны по всему геному: LINE и SINE – МГЭ

палиндромы

Словесные палиндромы:

КАЗАК

А РОЗА УПАЛА НА ЛАПУ АЗОРА

Палиндромы в нуклеиновых кислотах:

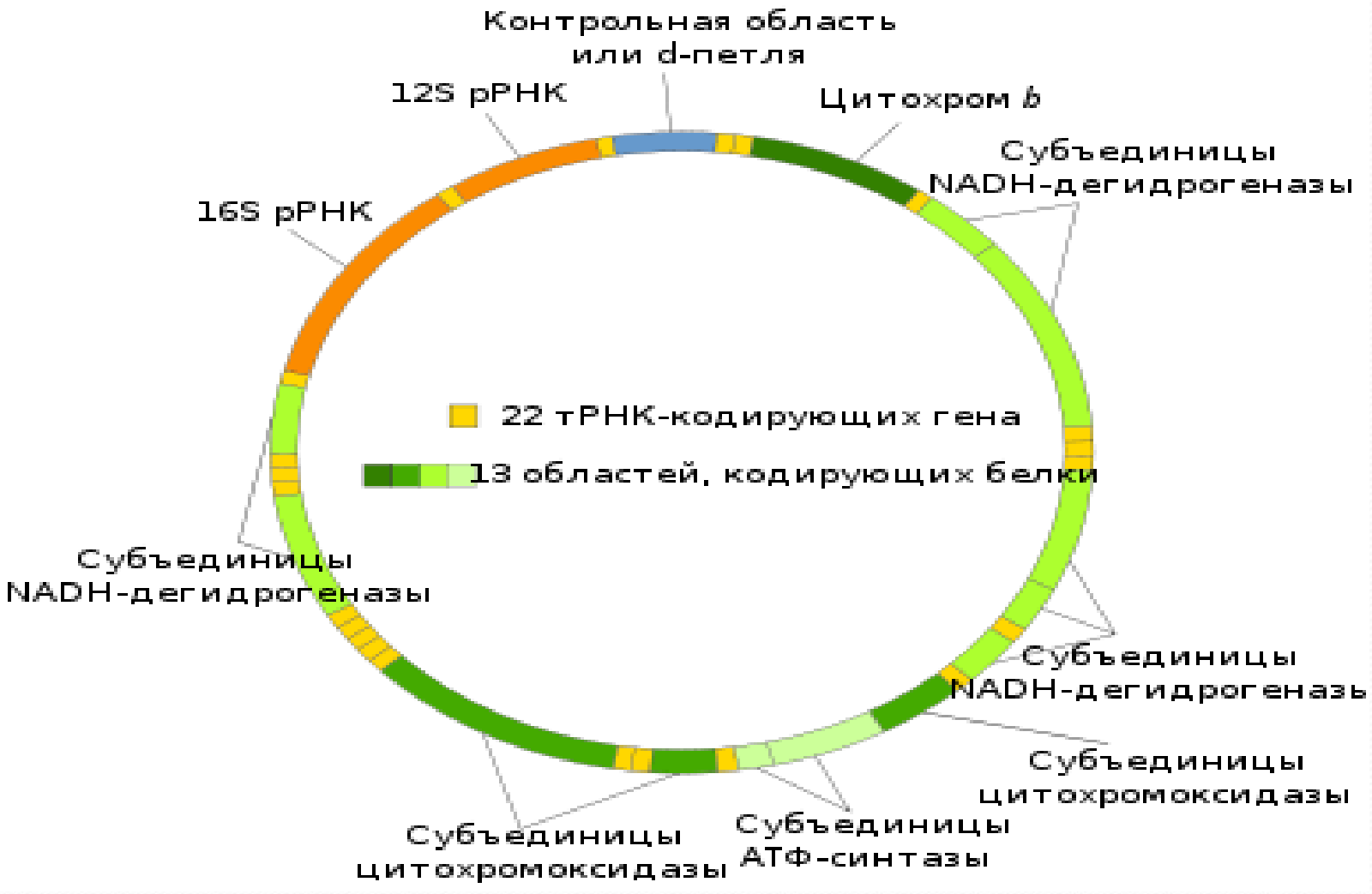
Роль мобильных генетических элементов

- Вызывают мутации генов
- Формируют хромосомные перестройки
- Изменяют активность и функции генов
- Достраивание хромосом после редупликации (дрозофилы)
- Используют для трансформации генов, клонировании генов.

ДНК митохондрий

- Секвенирована 1981 г.
- Кольцевая молекула, 16569 п.н.
- Содержит 37 генов: кодируют 13 белков, 22 молекулы т-РНК, 2 молекулы р- РНК
- Гены не содержат интронов
- Признаки наследуются по материнской линии и не являются менделирующими.

Митохондриальная ДНК человека



Особенности митохондриальной ДНК

- Чувствительна к активным формам кислорода
- Имеет высокую скорость мутирования
- Мутации митохондриальных генов могут быть причиной наследственных заболеваний, процессов старения и развития возрастной патологии.
- Определение нуклеотидной последовательности мит-ДНК позволяет установить эволюционное родство живых организмов.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПРОКАРИОТ и ЭУКАРИОТ

Ф.Жакоб и Ж.Моно 1961: общая теория регуляции генов

- Сущность теории сводится к «выключению» или «включению» генов как функционирующих единиц, к возможности или невозможности проявления их способности передавать информацию о структуре белка.
- У прокариот гены, контролирующие синтез белков-ферментов, катализирующих ход последовательных биохимических реакций, объединяются в структурно-функциональную единицу – оперон.

Виды оперонов

- Индуцибельный- регулятором является исходный продукт (субстрат). Субстрат стимулирует реакции своего метаболизма

- Репрессибельный- регулятором является конечный продукт (корепрессор). Он тормозит реакции, ведущие к его образованию.

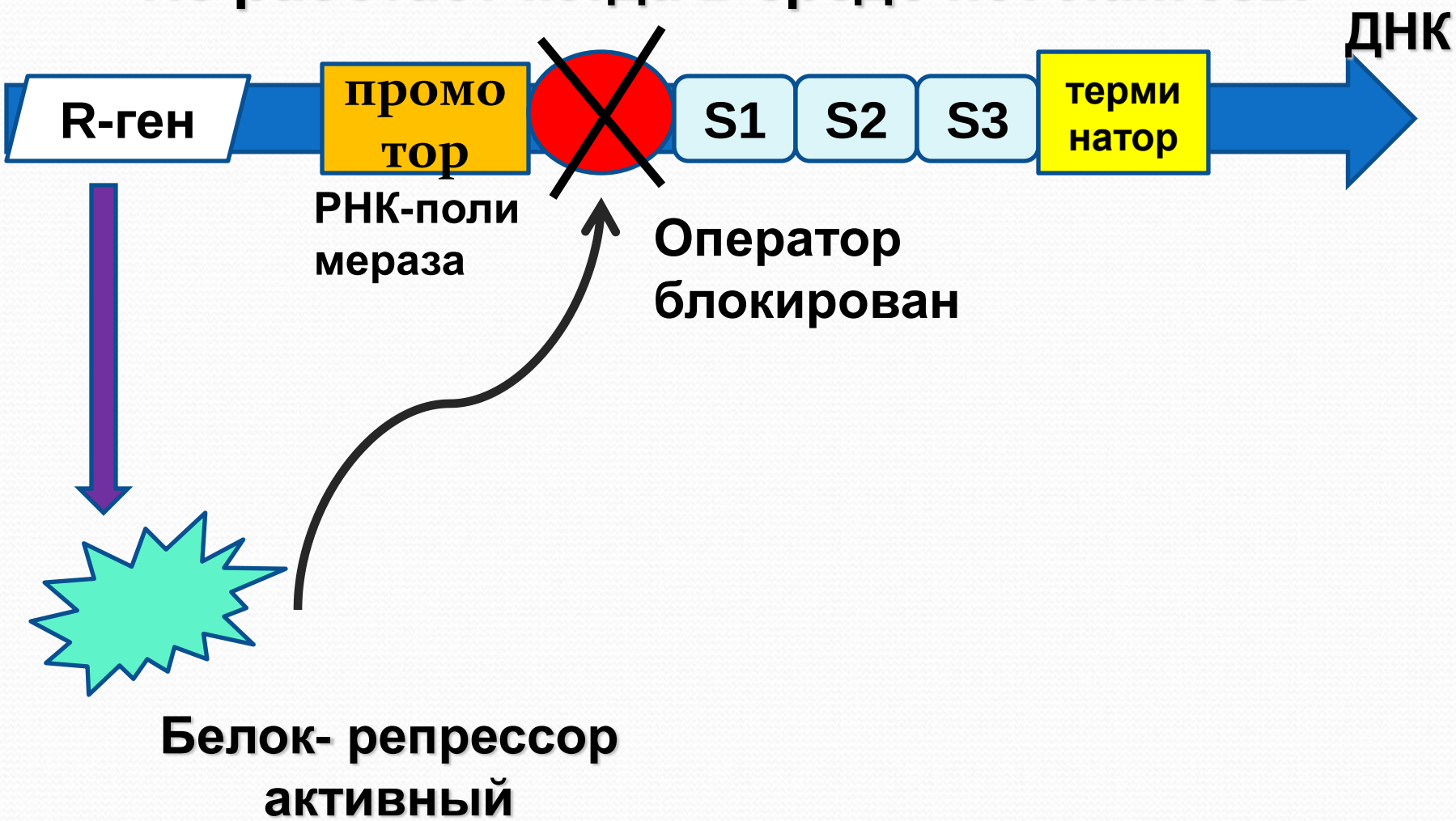
Состав индуцибельного оперона

- Структурные гены, кодирующие белки-ферменты
- Промотор – участок молекулы ДНК, к которому присоединяется РНК-полимераза
- Оператор – участок молекулы ДНК, место связывания с регуляторным белком-репрессором.
- Индуктор – метаболит, который связывается с белком-репрессором и переводит его в неактивную форму.

Синтез белка – репрессора контролируется геном-регулятором. Белок-репрессор обладает сродством и к оператору и к метаболиту.

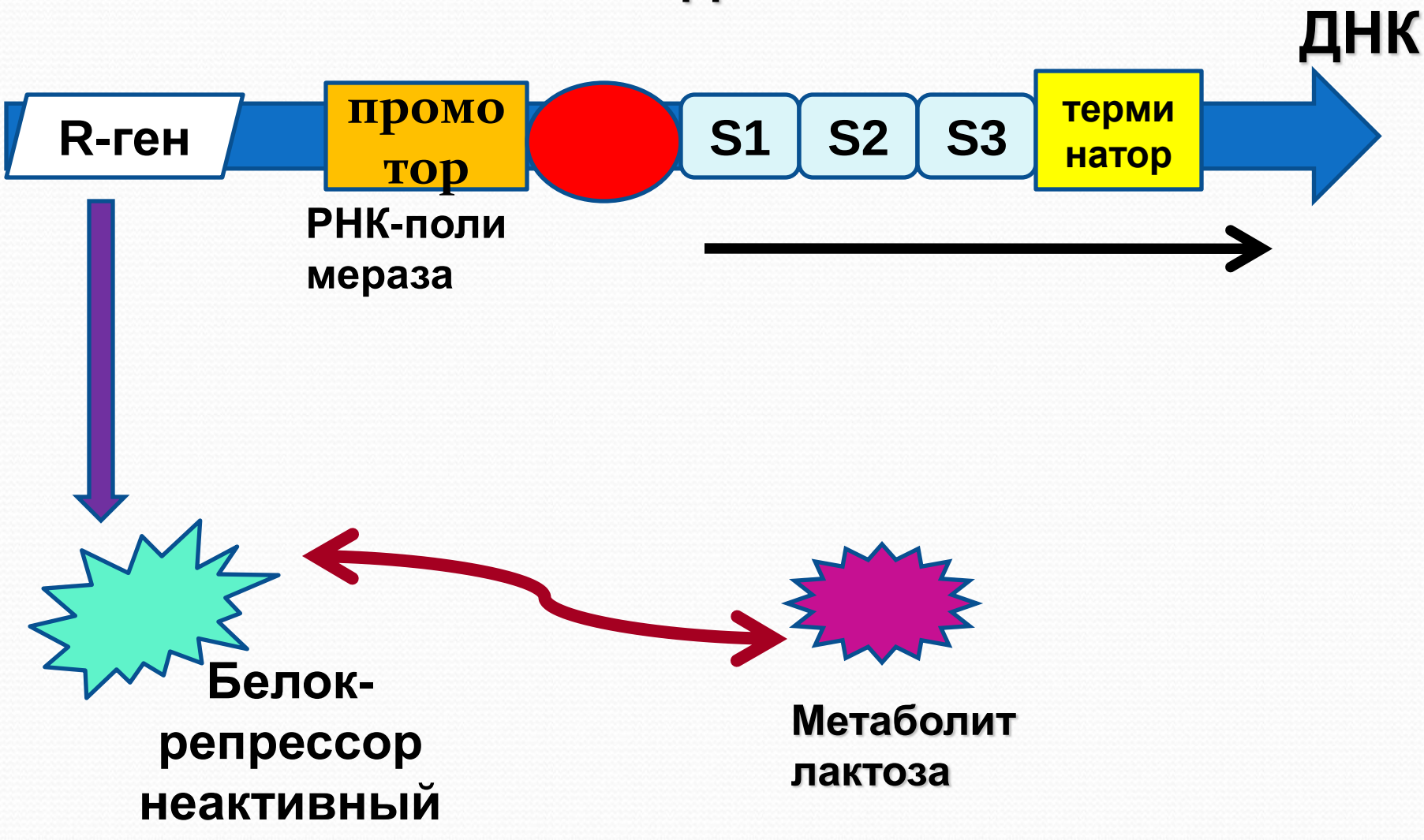
Лактозный оперон E.coli

Не работает когда в среде нет лактозы

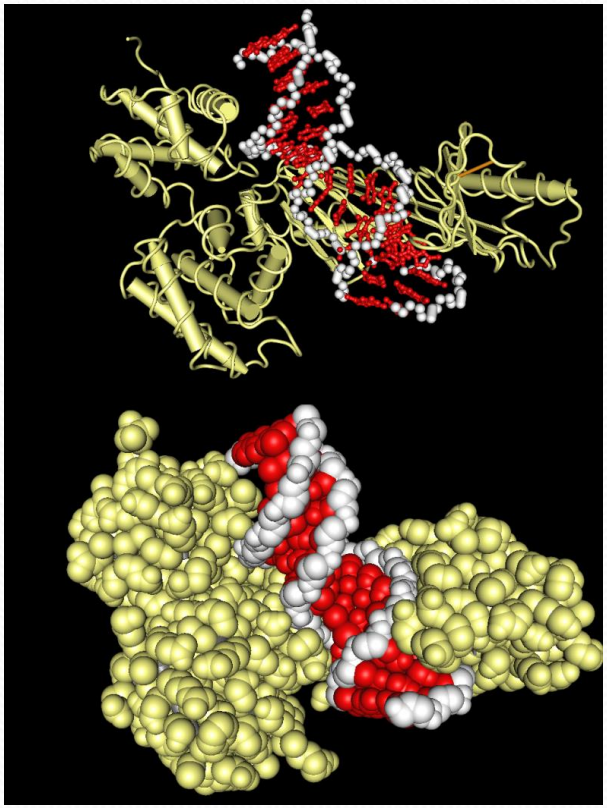


Лактозный оперон E.coli

- Работает когда есть лактоза



Регуляция экспрессии генов у эукариот



- На уровне транскрипции:

В основу регуляции положено взаимодействие определенных участков ДНК с белками - транскрипционными факторами (TF)

1. Связываются с промотором, обеспечивая присоединение РНК-полимеразы
2. Энхансеры- усилители транскрипции
3. Сайленсеры – ослабляют транскрипцию
4. Структура хроматина

- Для прохождения транскрипции необходима деконденсация хроматина на соответствующем участке ДНК. Происходит освобождение нуклеосомных белков от ДНК.
- Ремоделирование структуры хроматина. Процесс ремоделирования связан с модификацией гистонов Н3и Н4 (метилирование, ацетилирование, фосфорилирование) под действие ферментов (метилазы, ацетилазы, киназы фосфорилирования).
- Метилирование ДНК, обычно по цитозину в ЦГ парах, затрудняет транскрипцию.

Гормональная регуляция:

- Стероидные гормоны связываются с белком-рецептором в клетке, данный комплекс проникает в ядро, связывается с определенными участками ДНК, регулируя транскрипцию
- Пептидные гормоны связываются с белками – рецепторами на мембране и передают сигнал внутрь клетки на белки цитоплазмы, в ответ на внутриклеточные изменения в ядро поступает сигнал, регулирующий экспрессию

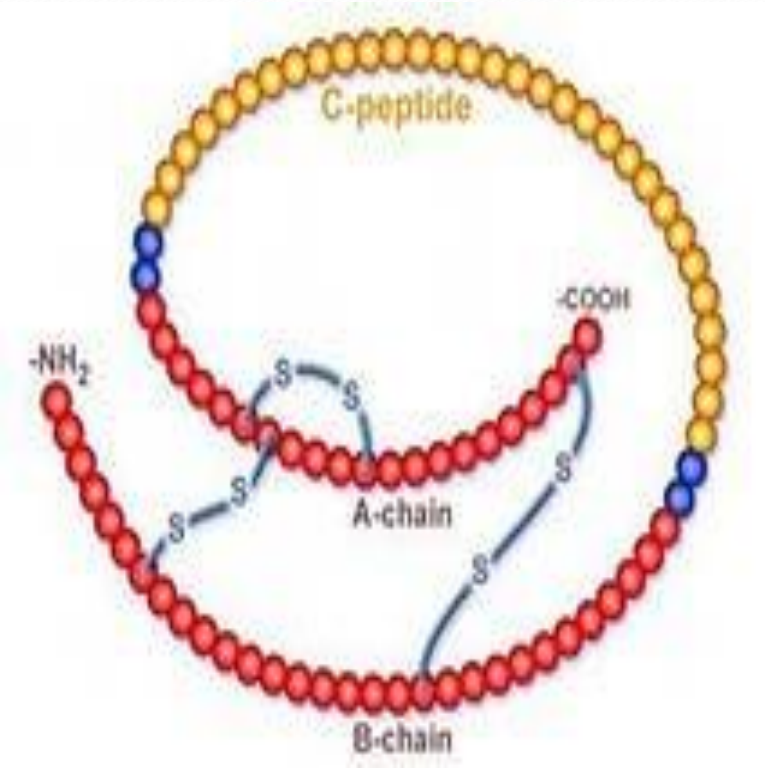
Точность сплайсинга обеспечивается взаимодействием белков-сплайсинга и мя-РНК (комплекс сплайосома). Сплайосома связывается с концевыми участками интрона (5′ -конец интрона почти всегда содержит ГУ, а 3′- конец интрона содержит АГ), что способствует точному вырезанию интронов ферментами рестриктазами

На уровне трансляции

- Редактирование РНК
- Общий контроль - факторы инициации соединяются с метилированным гуанином на 5-конце м-РНК, в результате происходит соединение с малой субъединицей рибосомы, другой набор белков - FI присоединяется к полиаденилатной последовательности на 3-конце. В этом случае м-РНК является активно транслируемой.
- Негативная регуляция: синтезируемый полипептид связывается с собственной м-РНК и блокирует дальнейший синтез.
- Фосфорилирование белков- факторов инициации (eIF) специальным ферментом приводит к нарушению связывания мет-тРНК с малой субъединицей рибосомы и синтез белка блокируется.

Изменение конформации белков – важнейший способ изменения их биологической активности! Обеспечение правильного фолдинга и рефолдинга принадлежит белкам - шаперонам.

- проинсулин



Спасибо за внимание.