

MODERN GENETICS

Francisco J. Ayala
John A. Kiger, Jr.

University of California, Davis

SECOND EDITION

Ф. АЙАЛА, Дж. КАЙГЕР

Современная ГЕНЕТИКА

В трех томах

Том 2

Перевод с английского
канд. биол. наук А. Г. Имашевой,
канд. хим. наук А. Л. Остермана и
д-ра биол. наук Н. К. Янковского

под редакцией
д-ра биол. наук Е. В. Ананьева

ББК 28.04

А37

УДК 575

Айала Ф., Кайгер Дж.

А37 **Современная генетика: В 3-х т. Т. 2. Пер. с англ.—М.: Мир, 1988.—368 с., ил.**

ISBN 5-03-000495-5

Учебное издание по генетике, написанное известными американскими учеными на уровне современных требований. Во втором томе рассмотрены проблемы экспрессии генетического материала (генетический код, регуляция экспрессии генов, генетика соматических клеток).

Для генетиков, молекулярных биологов, эволюционистов, а также для студентов биологических и медицинских вузов.

А $\frac{2002010000-384}{041(01)-88}$ подписное

ББК 28.04

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-000495-5 (русск.)

ISBN 0-8053-0316-2 (англ.)

© 1984 and 1980 by The Benjamin/Cummings
Publishing Company, Inc.

© перевод на русский язык, «Мир», 1988

Экспрессия генетического материала

Генетические функции

Преформация и эпигенез

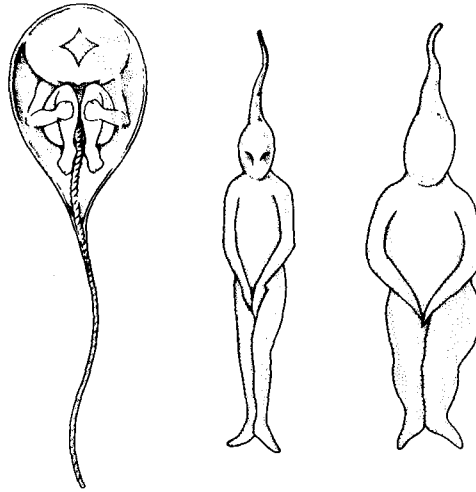
Известно, что генетический материал клетки (ДНК) обладает способностью к самовоспроизведению (репликации). Более того, именно в ДНК живых организмов заключена информация об особенностях их строения и жизнедеятельности. Вторая часть этой книги посвящена в основном проблемам, связанным с процессами реализации генетической информации.

Каким образом ничтожные количества вещества, содержащиеся в человеческой зиготе, управляют процессами превращения единичной зародышевой клетки в целый организм? В рамках этого процесса можно выделить два различных уровня превращений. Это, во-первых, *клеточная пролиферация* или *рост* – из одной зародышевой клетки уже к моменту рождения образуется около одного триллиона (10^{12}), а зрелый организм содержит до 20 триллионов клеток. И во-вторых – *клеточная дифференцировка*. Как мы знаем, клеткам, формирующим различные части тела – руки, ноги, глаза, печень, почки и т. д., – присуще весьма значительное структурное и функциональное разнообразие.

Проблема пролиферации клеток решается, по всей видимости, просто за счет многократного клеточного деления. Однако при этом остается непонятным, каким образом единичная клетка может одновременно порождать различные типы дочерних клеток; каким образом процесс клеточного деления может приводить к тому, что из одной и той же зиготы образуются и нервные клетки, и мышечные клетки, и костные клетки.

Возникшая в XVIII в. теория *преформизма* предложила наиболее радикальное решение проблемы, сводившееся попросту к отказу от представлений о существовании какой-либо дифференцировки. В конце

Рис. 10.1. Гомункулысы, которых, по утверждениям преформистов, можно увидеть в сперматозоидах человека. (С гравюр XVIII в.)



XVII в. естествоиспытатели, оснащенные слабым микроскопом и богатым воображением, готовы были поклясться, что своими глазами видели *гомункулуса* – миниатюрную человеческую фигурку, заключенную внутри сперматозоида. Голландский натуралист Ян Сваммердам (впервые обнаруживший существование яиц насекомых, а также эритроцитов) и швейцарский ученый Шарль Бонне на базе этого лжеоткрытия, «подтвержденного» и некоторыми другими учеными, склонными выдавать желаемое за действительное, развили теорию, основанную на представлении о преформации. Некоторые приверженцы этой теории считали, что уже в сперматозоидах находятся полностью сформированные человеческие тела и внутриутробное развитие сводится просто к росту гомункулуса до обычных к моменту рождения размеров (рис. 10.1). К этому сводились представления «сперматистов» (или анималькулистов). С точки зрения «овистов», гомункулысы заключены скорее не в сперматозоидах, а в яйцеклетках. Так, Бонне утверждал, что в яичниках любой женщины содержатся заранее сформированные зародыши всех ее потомков во всех последующих поколениях. Развитие подобных концепций приводит к довольно забавным выводам. Например, следует полагать, что в яйцеклетках Евы (или сперматозоидах Адама – как кому больше нравится) уже содержались зародыши всех грядущих поколений, упакованные по принципу китайской игрушки «коробочка в коробочке». Кстати, как вы думаете, какая именно из двух ваших бабушек носила ваш предварительно сформированный и ждущий своего часа зародыш?

Вместо теории преформизма Каспар Фридрих Вольф в XVIII в. и Карл Бэр в XIX в. развили теорию *эпигенеза*. Согласно этой теории, половые клетки представляют собой в основном гомогенные сгустки органического вещества и не содержат ничего такого, что по виду напоминало бы тот организм, который из них образуется. Развитие зародыша обусловлено как собственно ростом, так и дифференцировкой. В результате серии радикальных трансформаций из зиготы постепенно формируются различные ткани и органы. К. Бэру принадлежит детальное описание поэтапного развития куриного эмбриона как строго упо-

рядоченного процесса последовательных изменений от яйца к зародышу и далее вплоть до образования зрелой особи.

Сегодня мы знаем, что теория эпигенеза во многих отношениях более корректна, чем взгляды преформистов. Зигота действительно не содержит никакого предварительно сформированного зародыша. От родителей потомству достается не что иное, как ряд «указаний» в виде заключенной в ДНК генетической информации, которая во взаимодействии с окружением направляет ход развития организма. Само это развитие в определенном смысле напоминает процесс постройки некоего небоскреба в соответствии с архитектурным проектом. Едва ли кому-то придет в голову построить сначала миниатюрный домик, а затем «дорастивать» все его детали до необходимых размеров.

Генетическая информация

Генетическая информация кодируется с помощью последовательности оснований в нуклеиновых кислотах подобно тому, как информация, содержащаяся в книге, передается с помощью последовательности букв. Гены можно считать своего рода молекулярными «фразами», в которых «слова» – определенные фрагменты последовательности – построены из нуклеиновых «букв». Тогда всю заключенную в зиготе генетическую информацию действительно можно уподобить «книге», целиком состоящей из молекулярных «фраз».

Поскольку в состав ДНК входят нуклеиновые основания четырех видов, число различных последовательностей, которые можно составить из n нуклеотидов, достигает 4^n (см. табл. 10.1). Если учесть, что для индивидуальных генов значение n составляет не менее нескольких сотен, то следует признать, что число возможных комбинаций действительно необычайно велико. Однако, как мы узнаем из последующих глав, элементарными информационными единицами, детерминирующими аминокислотную последовательность любого белка, служат не отдельные основания, а так называемые *триплеты* – дискретные группы из трех следующих друг за другом оснований. Основания четырех видов могут образовывать $4^3 = 64$ различных триплета, заметная доля которых, впрочем, приходится на синонимы, несущие идентичную информационную нагрузку. Таким образом, существует 20 различных по смыслу ти-

Таблица 10.1. Возможные комбинации из четырех различных оснований

Число оснований в группе	Комбинации												Всего				
	A	C	G	T													
1															4		
2	AA	AC	AG	AT	CA	CC	CG	CT	GA	GC	GG	GT	TA	TC	TG	TT	16
3	AAA	ACA	AGA	ATA	CAA	CCA	CGA	CTA	GAA	GCA	GGA	GTA	TAA	TCA	TGA	TTA	64
	AAC	ACC	AGC	ATC	CAC	CCC	CGC	CTC	GAC	GCC	GGC	GTC	TAC	TCC	TGC	PTC	
	AAG	ACG	AGG	ATG	CAG	CCG	CGG	CTG	GAG	GCG	GGG	GTG	TAG	TCG	TGG	TTG	
	AAT	ACT	AGT	ATT	CAT	CCT	CGT	CTT	GAT	GCT	GGT	GTT	TAT	TCT	TGT	TTT	
n	$4 \times 4 \times \dots \times 4$ (n times)												4^n				

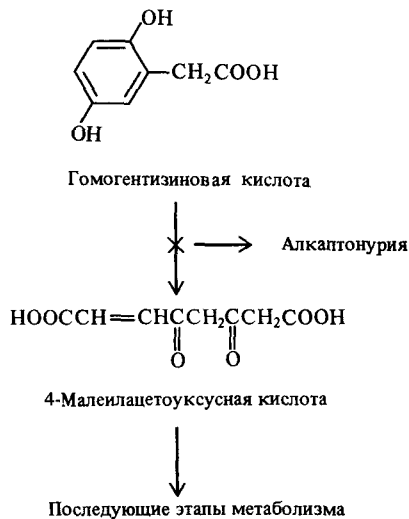
пов информационных единиц, кодирующих определенные аминокислоты. Полинуклеотидная цепь, состоящая из $n = 600$ нуклеотидов, содержит $n/3 = 200$ неперекрывающихся триплетов. Число различных аминокислотных последовательностей, которые могут кодироваться цепями такой длины, достигает соответственно $20^{n/3} = 20^{200} \approx 10^{260}$, что значительно превышает число всех протонов и нейтронов во Вселенной (по существующим оценкам — около 10^{76}). Таким образом, теоретически число различных структур, которое может быть закодировано в достаточно протяженных полинуклеотидных цепочках, поистине безгранично.

“Врожденные ошибки метаболизма” по Гэрроду

Сегодня мы можем определенно ответить на вопрос о том, каким образом гены управляют развитием и жизнедеятельностью организмов. Гены контролируют клеточный метаболизм за счет содержащейся в них информации о структуре ферментов и других клеточных белков, а ферменты выступают в роли биокатализаторов, управляющих всеми химическими процессами в живых организмах. Первым, кто выдвинул предположение о существовании непосредственной связи между генами и ферментами, был английский врач Арчибалд Гэррод. В 1902 году он впервые четко описал эту взаимосвязь в случае алкаптонурии — заболевания, которое наследуется в соответствии с законами Менделя.

В моче больных алкаптонурией, страдающих от артрита, содержатся вещества, чернеющие при стоянии на воздухе. Гэррод предположил, что алкаптонурия связана с блокированием некоего метаболического процесса. Ему удалось обнаружить, что у больных алкаптонурией с мочой выделяются большие количества (несколько граммов ежедневно) гомогентизиновой кислоты, и таким образом установить природу блокируемого процесса. Гэррод предположил, что больные алкаптонурией лишены фермента, в норме метаболизирующего гомогентизиновую

Рис. 10.2. Метаболический этап, блокируемый при алкаптонурии. Отсутствие фермента (оксидазы гомогентизиновой кислоты), катализирующего реакцию превращения гомогентизиновой кислоты в 4-малеилацетохлоридную кислоту, приводит к накоплению гомогентизиновой кислоты, которая затем выводится с мочой.



кислоту. Таким образом, он впервые отметил связь между геном и ферментом (рис. 10.2). Гэррод предложил аналогичную интерпретацию еще для трех аномалий, включая и альбинизм, который, по его мнению, вызывается блокированием метаболического пути, ведущего от тирозина к меланину.

Гэррод назвал эти наследственные биохимические аномалии *врожденными ошибками метаболизма*. Ему удалось сделать свои открытия благодаря осознанию того обстоятельства, что метаболический «блок» можно идентифицировать по накоплению в организме вещества, которое образуется на стадии, предшествующей этому блоку. В дальнейшем использование этого простого принципа сыграло важнейшую роль в изучении многочисленных метаболических процессов.

Гипотеза «один ген – один фермент»

Впервые представление о взаимосвязи между генами и ферментами точно сформулировали Джордж Бидл и Эдуард Татум в 1941 г. в рамках гипотезы «один ген – один фермент». За это открытие в 1958 г. они были удостоены Нобелевской премии. Бидл и Татум изучали биохимическую роль различных генов в опытах с обычной хлебной плесенью – *Neurospora crassa* (см. рис. 5.15). В норме этот микроскопический гриб может расти на определенной минимальной среде, содержащей сахар, некоторые минеральные соли, источник азота (аммонийные соли) и витамин биотин.

С помощью мутагенеза, индуцируемого рентгеновским излучением, Бидл и Татум получали и затем отбирали мутанты, для роста которых требовалось добавлять в среду некоторые дополнительные питательные вещества (рис. 10.3). Такие мутанты называются ауксотрофами в отличие от исходных прототрофов, способных расти на минимальной среде. (Мутации, изменяющие питательные потребности бактерий, специально обсуждаются в главе 8.) Подход, использованный Бидлом и Татумом для подтверждения наследуемого характера мутаций, приводящих к ауксотрофности, проиллюстрирован на рис. 10.4.

Первые три мутанта, выделенные Бидлом и Татумом, были обозначены *rab*, *pdx* и *thi*. Для их роста на минимальной среде требовались добавки *n*-аминобензойной кислоты, пиридоксина и тиамин соответственно. В каждом из трех случаев наблюдалось блокирование определенного этапа метаболизма, в норме приводящего к образованию соответствующего недостающего питательного вещества. Таким образом, было установлено однозначное соответствие между генетической мутацией и исчезновением определенного фермента, необходимого на данной биохимической стадии метаболизма. Исходя из этого, Бидл и Татум и сформулировали гипотезу «один ген – один фермент»: каждый ген направляет синтез одного фермента (рис. 10.5). В ходе дальнейших исследований эта гипотеза в несколько модифицированном виде – «один ген – одна полипептидная цепь» – полностью подтвердилась.

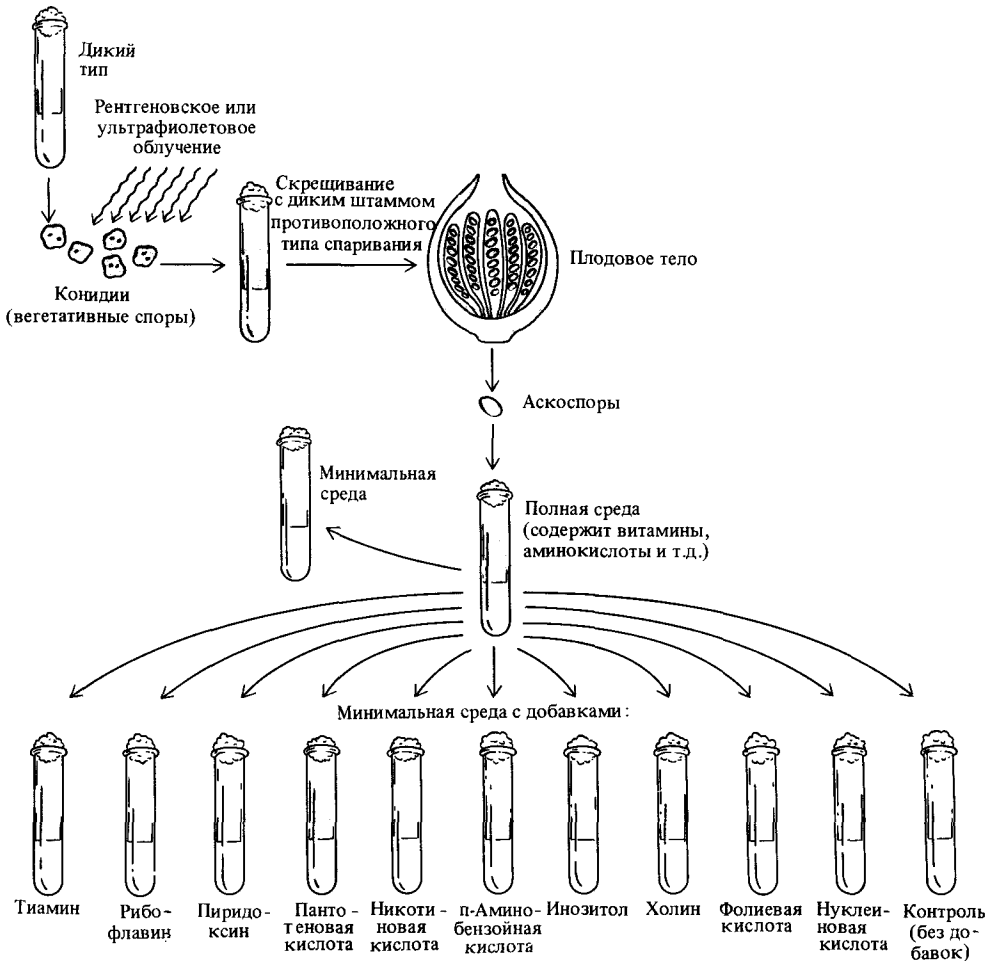


Рис. 10.3. Метод идентификации ауксотрофных мутаций у *Neurospora*. Конидии подвергают воздействию мутагенов (например, рентгеновскому или ультрафиолетовому облучению) и скрещивают с конидиями дикого типа. Затем на полной среде выращивают гаплоидные споры. Полученные культуры высевают на минимальную среду. Отсутствие роста на минимальной среде указы-

вает на возникновение ауксотрофной мутации. Для установления природы этой мутации испытываемые штаммы высевают на минимальную среду с теми или иными питательными добавками (аминокислоты, витамины и др.). В представленном на рисунке примере мутантный штамм оказывается способен расти на минимальной среде с добавлением пантотеновой кислоты.

Биохимические превращения при метаболизме

Различные ауксотрофные штаммы, растущие при добавлении к минимальной среде одного и того же вещества, не обязательно содержат мутации в одном и том же гене. Так, все три мутанта *Neurospora*, отме-

Рис. 10.4. Метод, позволяющий подтвердить генетическую природу питательной потребности. Мутантный штамм, полученный, как показано на рис. 10.3, скрещивают со штаммом дикого типа. Гаплоидные споры высевают на минимальную среду. При этом оказывается, что на четыре споры, способные расти, приходится четыре, неспособные расти на минимальной среде. Это подтверждает, что неспособность расти на минимальной среде является результатом генетической мутации.

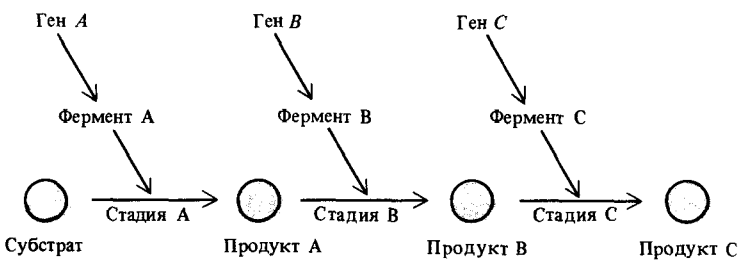
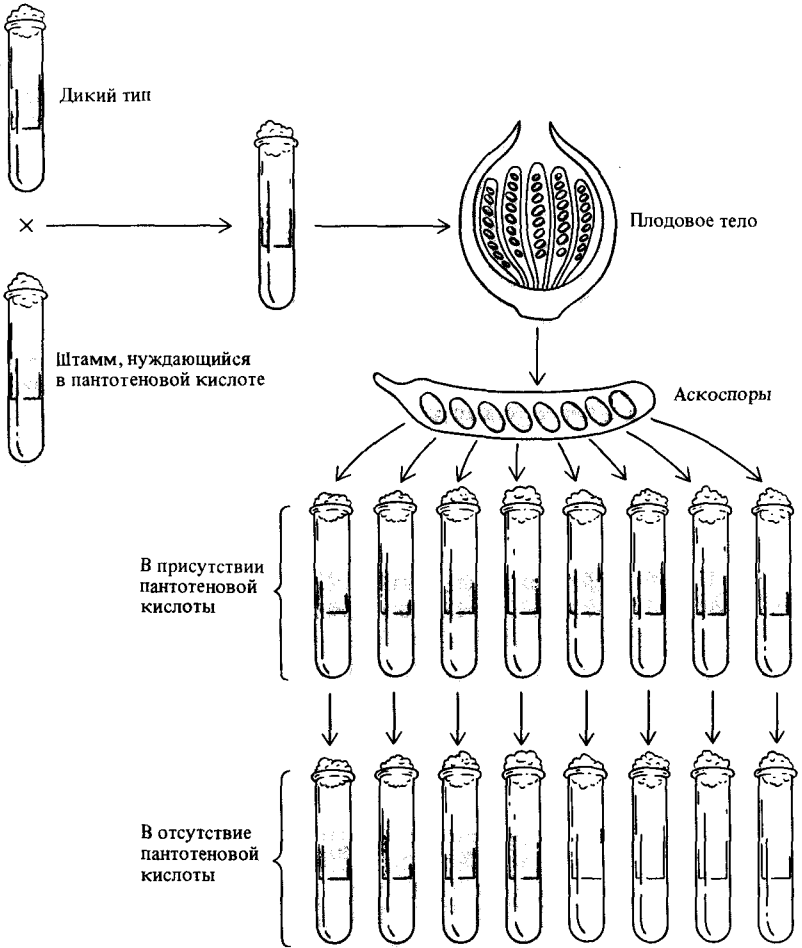


Рис. 10.5. Гипотеза «один ген – один фермент». Каждый ген направляет синтез одного фермента. Мутация в одном из генов приводит к образованию нефункционального фермента, прерывая тем самым цепь метаболических превращений. Так, мутация в гене В приведет к возникновению блока на стадии превращения

продукта А в продукт В. При этом продукт А будет накапливаться, а продукты В, С и пр. не образуются вовсе. Благодаря накоплению продукта А удастся идентифицировать тот этап, на котором возникает блок в данной цепи метаболических превращений.

Таблица 10.2. Три мутантных штамма *Neurospora crassa*, нуждающихся в аргинине

Мутант	Вещество, необходимое для роста
1	Аргинин, цитруллин или орнитин
2	Аргинин или цитруллин
3	Аргинин

ченные в табл. 10.2, могут расти на минимальной среде с аргинином. В то же время мутант № 2 может расти также на минимальной среде с цитруллином, а мутант № 1 растет и на аргинине, и на цитруллине, и на орнитине. Следовательно, второй мутант может синтезировать аргинин при наличии в среде готового цитруллина, а первый мутант способен также синтезировать аргинин из орнитина. Биосинтез этих трех веществ происходит в рамках одной и той же метаболической цепи биохимических превращений в последовательности, показанной на рис. 10.6. (В настоящем обсуждении мы опускаем стадию биосинтеза еще одного промежуточного продукта — аргининосукцината.)

Мутация в гене *arg E* блокирует цепь превращений перед стадией биосинтеза орнитина. Этот блок можно обойти, добавив к среде орнитин (из которого клетка сама может синтезировать цитруллин, а затем и аргинин), цитруллин или аргинин. Мутацию в гене *arg F*, блокирующую стадию превращения орнитина в цитруллин, с помощью добавки орнитина подавить не удастся. Однако такой мутант способен расти как на аргинине, так и на цитруллине. В то же время мутант по гену *arg H*

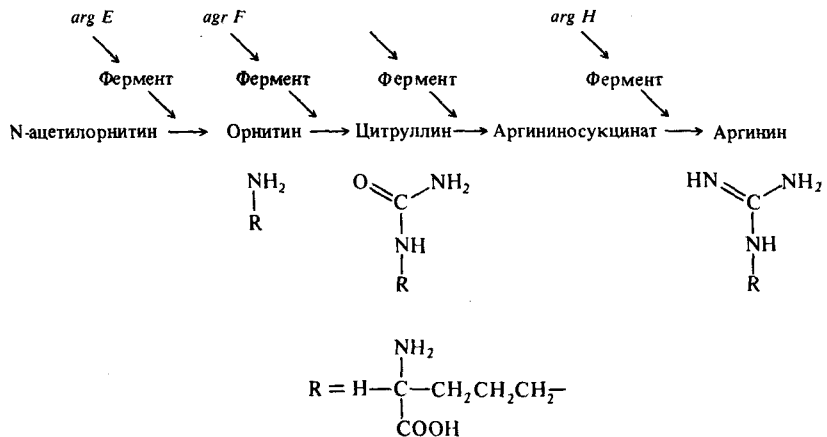


Рис. 10.6. Путь биохимических превращений, ведущий к образованию аргинина. В результате мутации в гене *arg E* может возникнуть блок на стадии синтеза орнитина, который удастся обойти, добавляя к питательной среде орнитин или какой-либо из последующих продуктов (цитруллин, аргининосукцинат или сам аргинин)

данной цепи метаболизма. Проявление мутаций в гене *arg F* можно подавить, добавляя к среде цитруллин или какой-либо из последующих метаболитов, но нельзя подавить с помощью орнитина. Рост мутантов по гену *arg H* может наблюдаться только в присутствии самого аргинина.

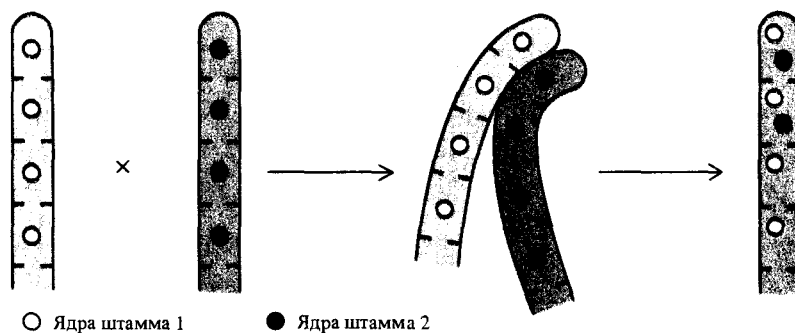


Рис. 10.7. Образование гетерокарионов у *Neurospora*. При совместном выращивании контакт между гифами различных штаммов может приводить к слиянию клеток без слияния соответствующих ядер.

растет только в присутствии аргинина и не растет ни на одном из двух других промежуточных метаболитов. Это отражает очень важную общую закономерность, которая заключается в том, что различные мутанты, способные расти при добавлении одного и того же вещества, в действительности могут характеризоваться наличием блоков на различных этапах метаболического пути превращений, приводящих в итоге к синтезу этого вещества.

Дальнейшее изучение роли различных генов в определенной последовательности биохимических превращений можно проводить с использованием комплементационных тестов, обсуждавшихся в предыдущих главах. Один из модифицированных вариантов комплементационного тестирования применяется при работе с *Neurospora*. При совместном культивировании различных штаммов в результате контакта между гифами может происходить их слияние, приводящее к образованию гетерокарионов — гибридных клеток, в цитоплазме которых одновременно присутствуют ядра из клеток различных штаммов (рис. 10.7). Если исходные штаммы несут мутации в различных генах, то образующиеся гетерокарионы могут приобрести способность расти на минимальной среде. И наоборот, если мутации аллельны, то при комплементационном тестировании не будет наблюдаться образования гетерокарионов с «диким» фенотипом, растущих на минимальной среде. Так, комплементационное тестирование многочисленных мутантов *Neurospora*, нуждающихся в аргинине, позволило установить, что в метаболический путь биосинтеза этой аминокислоты вовлечены семь различных генов.

Питательные потребности некоторых мутантных штаммов бактерий *Salmonella typhimurium*, дефектных по биосинтезу триптофана, показаны в табл. 10.3. Ни один из этих мутантов не может расти на минимальной среде, и все они растут в присутствии триптофана. В то же время мутант *trp8* может расти и на среде с добавкой антралиловой кислоты, индолглицерофосфата (ИГФ) или индола. Мутанты *trp2* и *trp4* не могут расти на минимальной среде с антралиловой кислотой, но растут в присутствии ИГФ или индола. Эти мутанты, кроме того, способны накапливать промежуточный метаболит — антралиловую кислоту. Мутант *trp3* растет только в присутствии индола (или триптофана), ему свойственно накапливать ИГФ. Остальные мутанты растут только при до-

Таблица 10.3. Питательные потребности триптофановых мутантов *Salmonella typhimurium* триптофане

Мутант	Минимальная среда	Добавки в среде				Накапливаемое вещество
		Антраниловая кислота	Индолглицерофосфат	Индол	Триптофан	
8	—	+	+	+	+	—
2, 4	—	—	+	+	+	Антраниловая кислота
3	—	—	—	+	+	Индолглицерофосфат
1, 6, 7, 9, 10, 11	—	—	—	—	+	Индол

«+» — рост, «—» — отсутствие роста

бавлении к среде триптофана и накапливают ИГФ и индол. Таким образом, искомым последовательность биохимических превращений можно представить следующей схемой: антраниловая кислота → ИГФ → индол → триптофан (рис. 10.8).

Одна из первых работ по биохимии метаболических путей была п

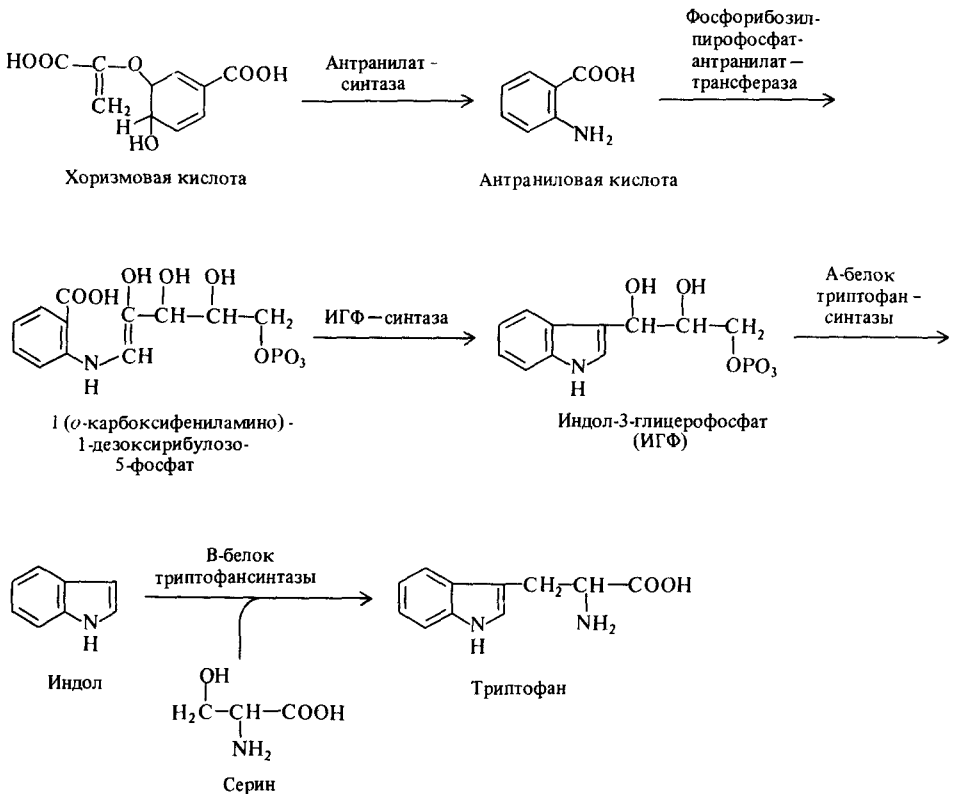


Рис. 10.8. Часть метаболического пути биосинтеза триптофана у бактерий. Фермент триптофансинтаза состоит из субъединиц А и В, каждая из которых обладает собственной ферментативной активностью.

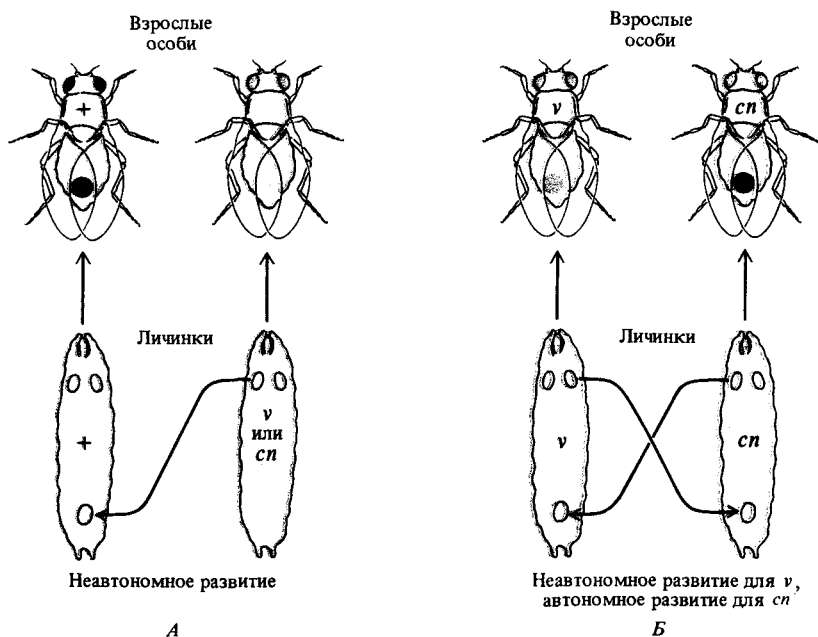


Рис. 10.9. Опыты по трансплантации, проводимые с *Drosophila melanogaster*. Трансплантируют имагинальные глазные диски от одной личинки в брюшко другой личинки. А. У личинок дикого типа, которым имплантируют глазные диски от личинок типа *vermilion* (*v*) или *cinnabar* (*cn*), развиваются глаза с окраской дикого типа. Такой тип развития окраски называется *неавтономным*, поскольку окраска глаз у имплантата в этом случае не зависит от свойств донора, а определяется только самим реципиентом. Б. Трансплантация *v* → *cn* приводит к развитию окраски глаз дикого типа, т.е. также представляет собой пример неавтономного развития. Напротив, трансплантация от

личинок *cn* к личинкам *v* сопровождается развитием окраски типа *cn*, т.е. в личинках *v* происходит автономное развитие глаз типа *cn*. Это значит, что личинки *cn* могут поставлять имагинальным дискам типа *v* некое вещество, необходимое для развития окраски дикого типа, в то время как личинки *v* оказываются неспособными снабдить имагинальные диски *cn* веществом, необходимым для синтеза нормального глазного пигмента. Таким образом, метаболический этап, блокируемый у личинок *v*, находится на пути биосинтеза глазного пигмента дикого типа, раньше, чем тот, который блокирован у личинок типа *cn*.

священа изучению биосинтеза глазного пигмента у плодовой мушки *Drosophila*. Экспериментальные подходы, которые Бидл и Эфрусси разработали для решения этой задачи, в дальнейшем удалось использовать и при работе с *Neurospora*. У взрослых особей *Drosophila* и других насекомых отряда *Diptera* многие структурные образования, такие, как крылья, ноги и глаза, развиваются из различных групп клеток (зачатков или *имагинальных дисков*), которые на стадии развития личинки остаются недифференцированными (см. гл. 17). Имагинальный диск сложного глаза можно трансплантировать от одной личинки к другой, где впоследствии и произойдет его полное развитие. После соответствующих превращений реципиентной личинки можно изучить морфологию пере-



Рис. 10.10. Локализация метаболических блоков на пути биосинтеза глазных пигментов (оммохромов) *Drosophila* у мутантных линий *v* и *sn*.

саженных глаз (рис. 10.9). В случае пересадки глазных дисков от личинки с мутациями типа *vermilion* (*v*) или *cinnabar* (*sn*) личинкам с глазами немутантного (дикого) типа трансплантаты развиваются в глаза с обычной окраской. Очевидно, что это происходит благодаря проникновению в пересаженные мутантные клетки некоторого вещества от нормальных клеток реципиента, которое и обеспечивает их нормальную пигментацию. Глазные диски типа *vermilion*, трансплантированные личинкам *cinnabar*, также развиваются в глаза с окраской дикого типа. Однако при пересадке глазных дисков *cinnabar* личинкам *vermilion* наблюдается развитие мутантной формы *cinnabar*. Эти результаты свидетельствуют о том, что для нормальной пигментации глаз требуются два вещества, биосинтез которых обеспечивается аллелями дикого типа локусов *v* и *sn*. Можно также заключить, что *v*-мутанты отличаются наличием метаболического блока на более ранней стадии пути биосинтеза глазного пигмента, чем у *sn*-мутантов, поскольку именно личинки *cinnabar* могут поставлять личинкам *vermilion* недостающее вещество, но не наоборот (рис. 10.10).

Подводя итоги, следует отметить, что изучение биохимических мутантов различных организмов подтвердило гипотезу Гэррода о том, что наличие активных ферментов контролируется определенными генами, а сами ферменты в свою очередь контролируют метаболические процессы.

Гены и белки

В работе Бидла и Татума было выдвинуто предположение о том, что каждый ген отвечает за образование одного фермента. Соображения о природе взаимосвязи между генами и белками были впервые высказаны в связи с изучением одного из тяжелейших заболеваний человека — серповидноклеточной анемии. Люди, страдающие серповидноклеточной анемией, как правило, погибают, не достигнув зрелого возраста. При низком парциальном давлении кислорода эритроциты больных приобретают характерную серповидную форму, благодаря которой болезнь и получила свое название. У родителей больных наблюдаются некоторые признаки серповидноклеточности — их эритроциты также имеют несколько искаженную форму, однако они не страдают тяжелой формой анемии.

В 1949 г. Джеймс Нил и Е. Бит независимо высказали предположение о том, что серповидноклеточность связана с мутацией определенного гена, который у больных анемией существует в гомозиготном состоянии, а у носителей отдельных симптомов серповидноклеточности — в гетерозиготном. В том же году Нобелевский лауреат Лайнус Полинг

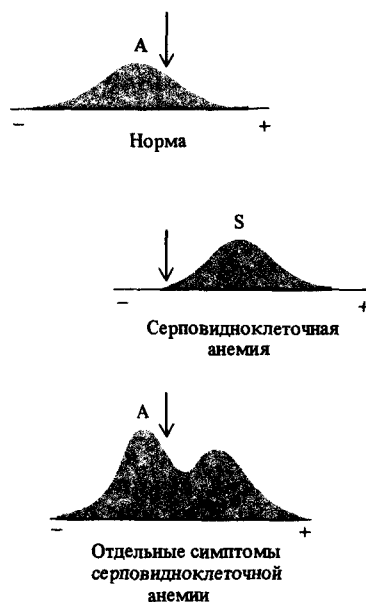


Рис. 10.11. Электрофоретическая подвижность гемоглобина здорового человека (*вверху*) и больного серповидноклеточной анемией в тяжелой (*в середине*) или легкой (*внизу*) форме. Препарат, содержащий гемоглобин, помещают в электрическое поле на участке, помеченном стрелкой. Нормальный гемоглобин (A) мигрирует

в сторону катода, а серповидноклеточный гемоглобин (S) — в сторону анода. В препаратах, полученных от пациентов с отдельными признаками серповидноклеточной анемии, обнаруживаются оба вида гемоглобинов. (По Pauling L., Itano H. A., Singer S. J., Wells I. C. 1949. Science, 110, 543.)

и трое его коллег обнаружили, что гемоглобины нормальных индивидов и больных серповидноклеточной анемией заметно различаются по подвижности в электрическом поле (рис. 10.11). При этом оказалось, что гемоглобин пациентов с отдельными симптомами серповидноклеточности представляет собой смесь примерно равных количеств нормального и мутантного гемоглобинов. Таким образом, стало ясно, что мутация, вызывающая серповидноклеточность, связана с определенными изменениями химической структуры молекул гемоглобина. При гомозиготности по данной мутации в организме присутствуют только измененные молекулы гемоглобина, а при гетерозиготности — как измененные, так и нормальные молекулы.

Гемоглобин A, представляющий собой основной тип гемоглобина у взрослого человека, состоит из четырех полипептидных цепей — двух идентичных α -цепей и двух идентичных β -цепей ($\alpha_2\beta_2$). В 1957 г. Вернон Ингрэм показал, что нормальный и серповидноклеточный гемоглобины содержат одинаковые α -цепи, но различные β -цепи. В шестом положении β -цепи нормального гемоглобина находится остаток глутаминовой кислоты, у серповидноклеточного гемоглобина он заменен на остаток валина (рис. 10.12). В данном случае различия между нормальным и мутантным аллельными вариантами являются следствием единственной аминокислотной замены в соответствующем белке. Таким образом, ста-



Рис. 10.12. Первые семь аминокислотных остатков β -цепи человеческого гемоглобина, состоящей из 146 аминокислотных остатков. Замещение глутаминовой кислоты в шестом положении на валин приводит к тяжелому заболеванию – серповидноклеточной анемии.

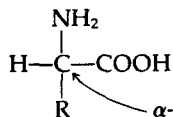
ло ясно, что гены определяют аминокислотную последовательность белков.

Полипептидные цепи α - и β -субъединиц гемоглобина кодируются различными генами. Многие другие белки и ферменты (хотя и не все) также состоят из двух или более полипептидных цепей, кодируемых разными генами. На этом основании Ингрэм предложил уточнить формулировку гипотезы «один ген – один фермент» в виде «один ген – одна полипептидная цепь».

Структура белков

Белки играют важнейшую роль в жизнедеятельности любых организмов. Многообразие и сложность живой материи, по сути дела, отражают многообразие и сложность самих белков. Каждый белок имеет свою уникальную функцию, которая определяется присущими ему структурой и химическими свойствами. Некоторые белки являются *ферментами*, то есть катализаторами биохимических реакций в живых организмах. Каждая химическая реакция катализируется определенным ферментом. Без участия ферментов подобные реакции не происходят вовсе или протекают слишком медленно, чтобы обеспечить саму возможность существования живых организмов. Другие белки (*структурные*) выполняют в организме роль строительных белков – или сами по себе (например, коллаген), или в комплексе с нуклеиновыми кислотами (*нуклеопротеины*), углеводами (*гликопротеины*) или липидами (*липопротеины*). Некоторые белки, такие, как, например, миоглобин и гемоглобин, вовлеченные в систему запасаения и транспорта кислорода, связываются с функционально важными металлсодержащими органическими молекулами. Так, миоглобин и гемоглобин специфически связывают железосодержащую группировку, называемую *гемом*.

Белки – это большие полимерные молекулы, построенные из мономерных аминокислотных звеньев. В состав белков входят двадцать различных видов аминокислот. Все белковые аминокислоты (за исключением одной – пролина) характеризуются общей структурой типа



обязательными элементами которой являются *аминогруппа* ($-\text{NH}_2$) и *карбоксильная группа* ($-\text{COOH}$), связанные с центральным углеродным атомом. С этим же атомом углерода связаны также атом водорода ($-\text{H}$) и боковая группа (радикал, обозначенный символом R). Подробнее о свойствах аминокислот см. в *дополнении 10.1*.

Дополнение 10.1. Химическая структура аминокислот

Двадцать аминокислот, обычно входящих в состав белков, можно классифицировать различными способами. Избранный нами способ классификации, проиллюстрированный на рис. 10.13, помогает выявить некоторые важные в биологическом отношении свойства аминокислотных остатков в белках. *Эти свойства определяются исключительно природой боковых групп.*

Восемь аминокислот объединены в группу *неполярных* или *гидрофобных* (т. е. отталкивающих воду). Обратите внимание на то, что одна из них — пролин — в структурном отношении существенно отличается от 19 остальных аминокислот. Из двенадцати *полярных* или *гидрофильных* аминокислот (образующих энергетически выгодные контакты с молекулами воды) семь при физиологических значениях pH электрически нейтральны, три аминокислоты являются *основными* и, следовательно, склонны нести избыточный положительный заряд, а две другие — *кислотными* (склонны нести отрицательный заряд). В боковых цепях обеих кислотных аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) находится карбоксиль-

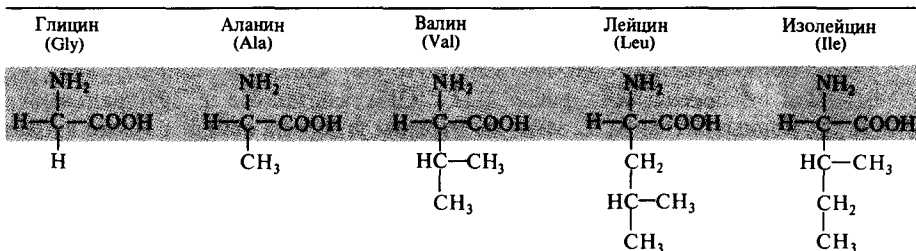
ная группа ($-\text{COOH}$). Две основные аминокислоты (лизин и аргинин) содержат в своих боковых цепях аминогруппу ($-\text{NH}_2$). Эти карбоксильные и аминогруппы при физиологических значениях pH в значительной степени подвергаются ионизации. ($-\text{COOH}$)-группа теряет протон с образованием карбоксил-иона ($-\text{COO}^-$), а ($-\text{NH}_2$)-группа связывает протон с образованием замещенного аммониевого катиона ($-\text{NH}_3^+$).

Две аминокислоты — метионин (неполярная) и цистеин (полярная) содержат атом серы. Атом водорода — SH-группы цистеина легко удаляется, благодаря чему между двумя остатками цистеина может возникнуть *дисульфидный* ($-\text{S}-\text{S}-$) мостик.

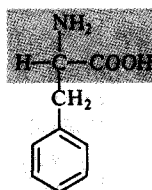
Три аминокислоты — фенилаланин (неполярная), а также тирозин и триптофан (полярные) — являются *ароматическими*, т. е. содержат в боковой цепи ароматические радикалы. (У триптофана полярность выражена настолько слабо, что его иногда относят к неполярным аминокислотам.)

Аминокислоты в белках связаны между собой прочными ковалентными *пептидными связями*, возникающими в результате химического взаимодействия между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой следующей аминокислоты (рис. 10.14). Образующийся в результате такого взаимодействия двух или нескольких аминокислот олигомер называется пептидом. Дипептид состоит из двух аминокислот, трипептид — из трех и т. д. Аминокислоты, входящие в состав пептида, часто называют *аминокислотными остатками*. Структурную основу любого пептида составляет зигзагообразный остов, образованный атомами углерода и азота (рис. 10.15). Направленные вовне по отношению к остову боковые R-группы любых соседних аминокислотных остатков

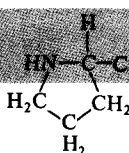
Нейтральные – Неполарные



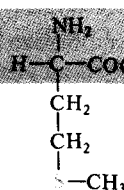
Фенилаланин (Phe)



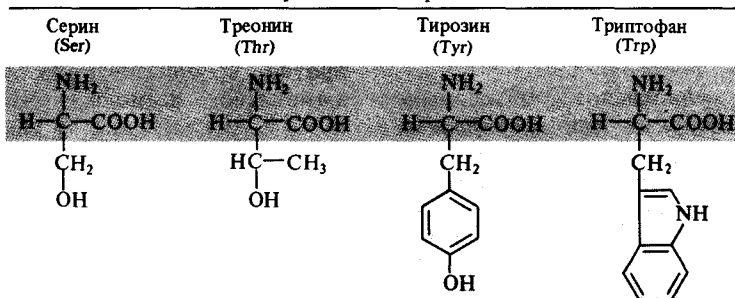
Пролин (Pro)



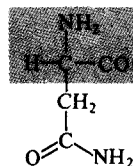
Метионин (Met)



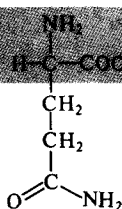
Нейтральные – Полярные



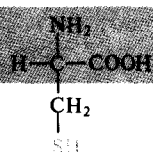
Аспарагин (Ash)



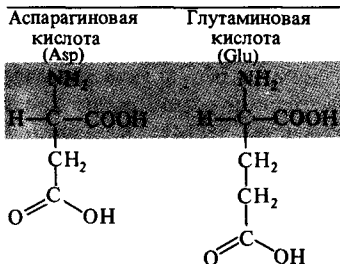
Глутамин (Gln)



Цистеин (Gys)



Кислотные



Основные

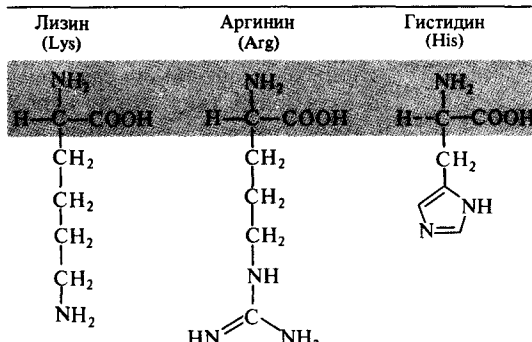
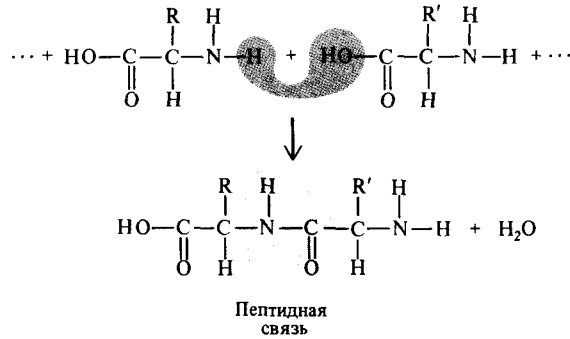


Рис. 10.13. 20 аминокислот, входящие в состав всех белков. Структуры, расположенные ниже серой полосы, – это боковые (R-) группы. Цветом выделены три ароматические боковые группы.

Рис. 10.14. Образование пептидной связи между двумя аминокислотами.



ориентированы в противоположные стороны. На одном конце в молекуле пептида находится свободная аминогруппа (N-конец), а на другом конце — свободная карбоксильная группа (С-конец). Аминокислотные остатки, расположенные на N- и С-конце, называются соответственно *N-* и *С-концевыми аминокислотами*.

Полипептидами обычно называют пептиды, состоящие из множества [до тысячи и более] аминокислотных остатков. Последовательность аминокислот в полипептиде называется его *первичной структурой*. Полипептидные цепи самопроизвольно формируют определенную вторичную структуру, которая определяется природой боковых групп аминокислотных остатков. Один из важнейших типов вторичной структуры, который обнаруживается по крайней мере на отдельных участках цепи во многих полипептидах, известен под названием *α-спирали*. Полипептидный остов образует правостороннюю спираль, на каждый виток α-спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, боковые R-группы которых направлены наружу. Эта структура стабилизируется за счет внутримолекулярных водородных связей (рис. 10.16, А). Другой тип вторичной структуры, также характерный для полипептидов, получил название *складчатого β-слоя*. Структуры этого типа формируются параллельными сегментами полипептидной цепи, сцепленными между собой

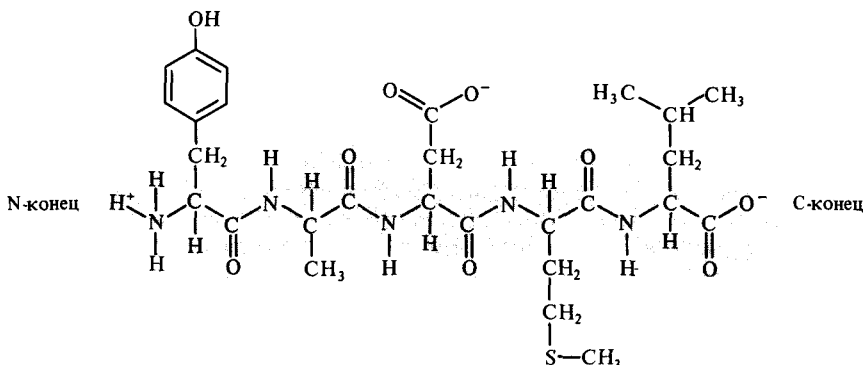


Рис. 10.15. В состав изображенного пентапептида входят следующие пять аминокислот (слева направо): тирозин, аланин, аспарагиновая кислота, метионин и лейцин. Цветом выделен полипептидный остов, образуемый пептидными связями. Кислотные и основные группы изображены в ионизованной форме, в которой они действительно находятся при физиологических значениях pH.

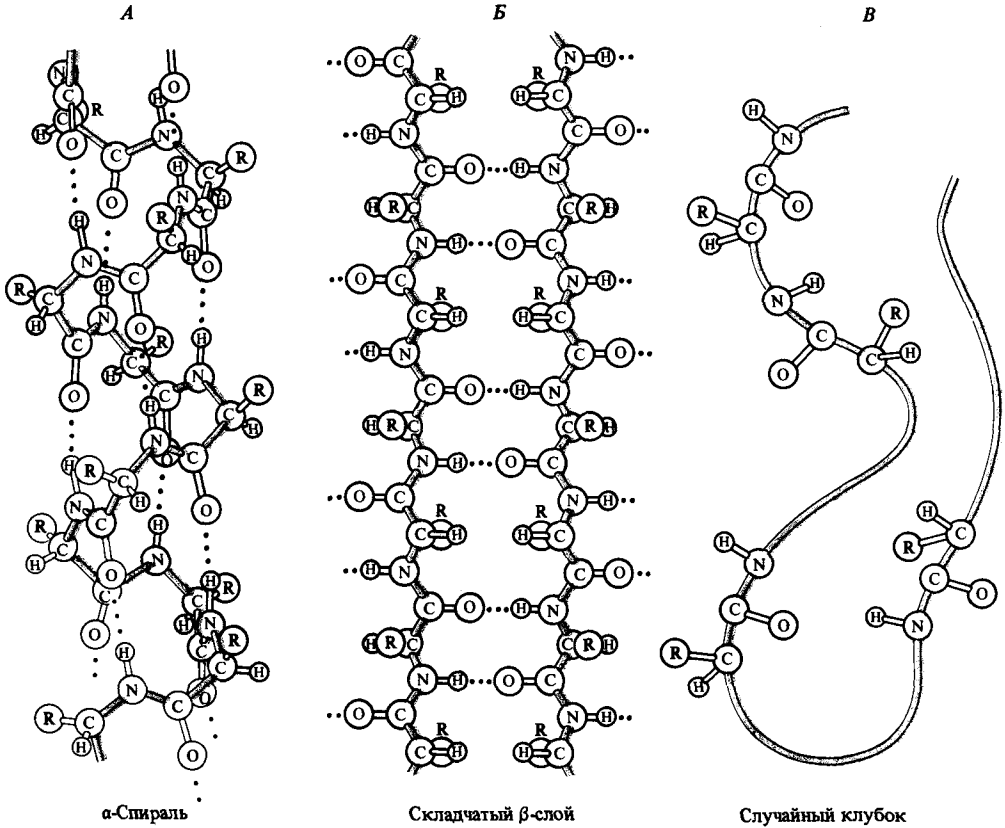
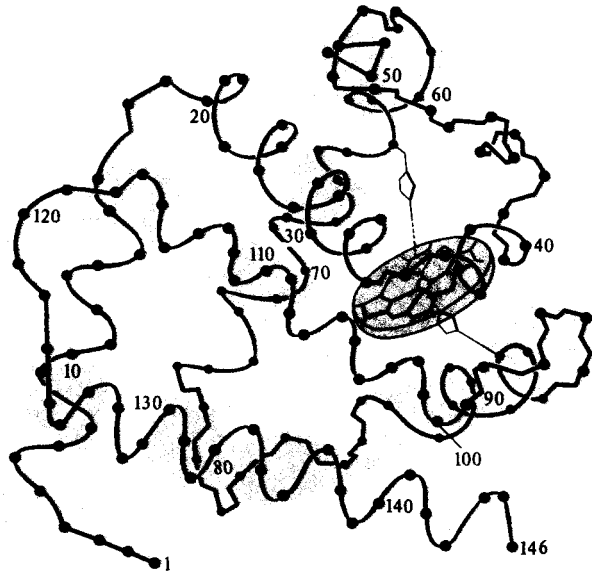
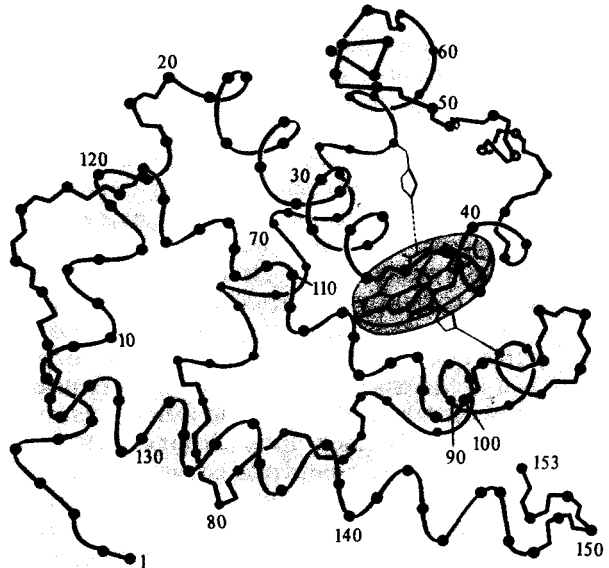


Рис. 10.16. А. Полипептидная цепь в конфигурации α -спирали. Обратите внимание на водородные связи (отмечены точками), стабилизирующие эту конфигурацию. Б. Конфигурация складчатого β -слоя. Обратите внимание на водородные связи, которые в дан-

ном случае образуются между параллельными близлежащими сегментами полипептидной цепи. В. Конфигурация случайного клубка. Изображен фрагмент полипептидной цепи, на котором отмечено положение некоторых аминокислотных остатков.

системой водородных связей. Боковые группы аминокислотных остатков располагаются над и под плоскостью образующегося таким образом складчатого слоя (рис. 10.16, Б). Модели этих структур были предложены Л. Полингом. Наличие в полипептидной цепи по соседству нескольких аминокислотных остатков с очень объемистыми боковыми группами (например, изолейцин) или одноименно заряженных остатков (например, глутаминовая и аспарагиновая кислоты) может в результате их взаимного отталкивания привести к тому, что данный участок структуры примет конфигурацию *случайного клубка*.

Таким образом, именно характер распределения различных боковых групп вдоль цепи обуславливает реализацию на том или ином ее участке вторичной структуры данного типа (α -спирали или β -слоя) или же отсутствие какой бы то ни было упорядоченной структуры (случайный клубок). Структурные особенности остатков пролина способствуют возникновению изгибов в полипептидной цепи. Все эти и другие струк-

 β -Цепь гемоглобина

Миоглобин

Рис. 10.17. Пространственная структура β -цепи человеческого гемоглобина и эволюционно отдаленного родственного белка, отвечающего за запасание кислорода, — миоглобина. Обратите внимание на сходство

представленных структур. Железосодержащая группировка — гем — изображена в виде диска. (По Perutz M.F. 1964. Scientific American, November, p. 64.)

Рис. 10.18. Структурная модель человеческого гемоглобина. Показано, как две α -цепи и две β -цепи связываются между собой с образованием четвертичной белковой структуры. (По Perutz M.F. 1964. Scientific American, November, p. 64.)



турные факторы определяют некоторую фиксированную трехмерную конфигурацию, которую называют *третичной (или пространственной) структурой* полипептида, отражающей по сути дела способ укладки данной полипептидной цепи в трехмерном пространстве (рис. 10.17).

Белок может состоять из одной или нескольких полипептидных цепей. Белки, состоящие из двух и более цепей (или субъединиц) и называемые *олигомерными белками*, характеризуются также определенной *четвертичной структурой*. Под этим термином подразумевают общую конфигурацию белка, возникающую при ассоциации всех входящих в его состав полипептидных цепей (рис. 10.18).

Конкретная конфигурация (вторичная, третичная и четвертичная структуры) любого белка полностью определяется первичной структурой входящих в его состав полипептидных цепей и зависит от химических свойств боковых групп аминокислотных остатков. Так, при укладке полипептидной цепи неполярные (*гидрофобные*) боковые группы склонны ориентироваться во внутреннюю область белка, в то время как полярные (*гидрофильные*) группы стремятся быть экспонированными на поверхности белковой глобулы. Пространственная структура белка стабилизируется за счет химических взаимодействий, в том числе гидрофобных контактов, водородных связей и дисульфидных мостиков ($-S-S-$). Последние, как правило, образуются, когда в процессе укладки цепи боковые группы остатков цистеина оказываются достаточно сближенными (рис. 10.19).

Образование характерной трехмерной конфигурации данного полипептида является спонтанным процессом. При разрушении стабилизирующих структуру водородных связей и дисульфидных мостиков проис-

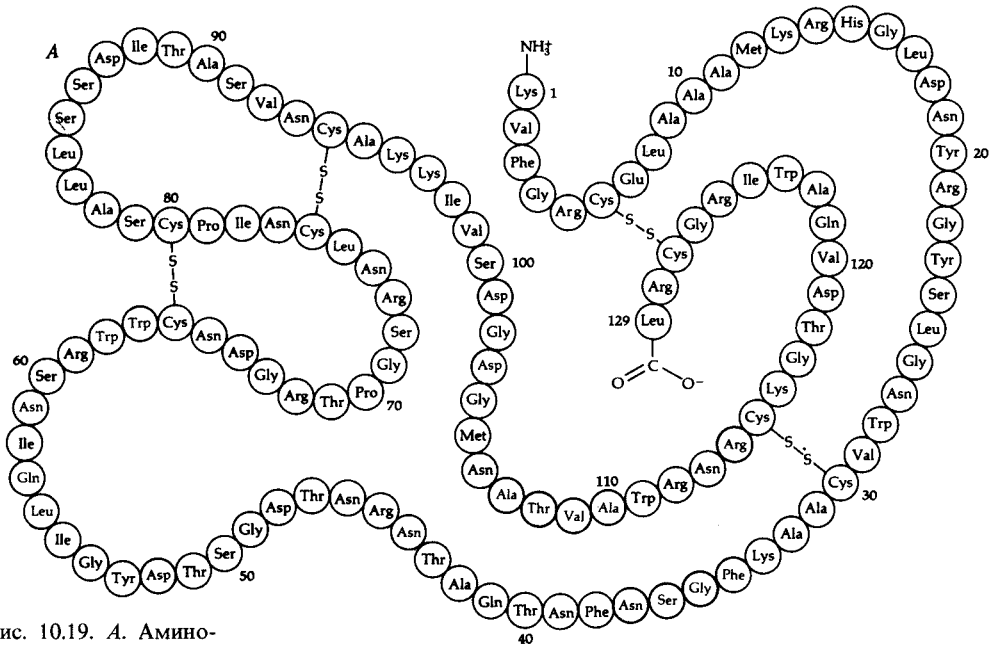
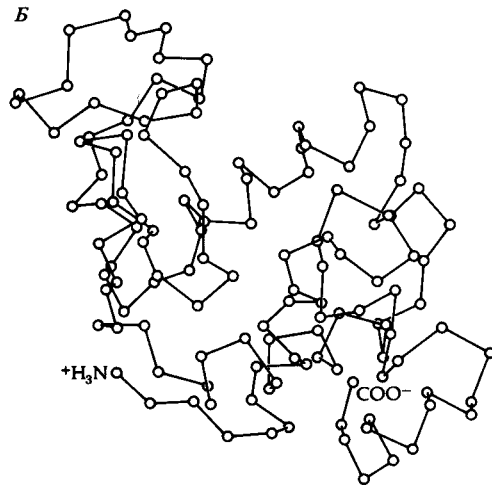


Рис. 10.19. А. Аминокислотная последовательность лизоцима — фермента, содержащегося в курином яичном белке. Цветом выделены аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра. Обратите внимание на расположение дисульфидных связей. Б. Диаграмма, отражающая пространственное строение лизоцима. Показаны только α -атомы полипептидного остова фермента. (По Stryer L. 1975. *Biochemistry*, Freeman W. H., San Francisco.)



ходит денатурация белка. Однако при соответствующих химических условиях может иметь место также спонтанная ренатурация с восстановлением исходной пространственной конфигурации (рис. 10.20).

Функциональные особенности белков, например устройство активного центра фермента, задаются пространственной структурой молекулы, которая в свою очередь определяется первичной структурой полипептидной цепи. Одни генетические мутации могут блокировать синтез все-

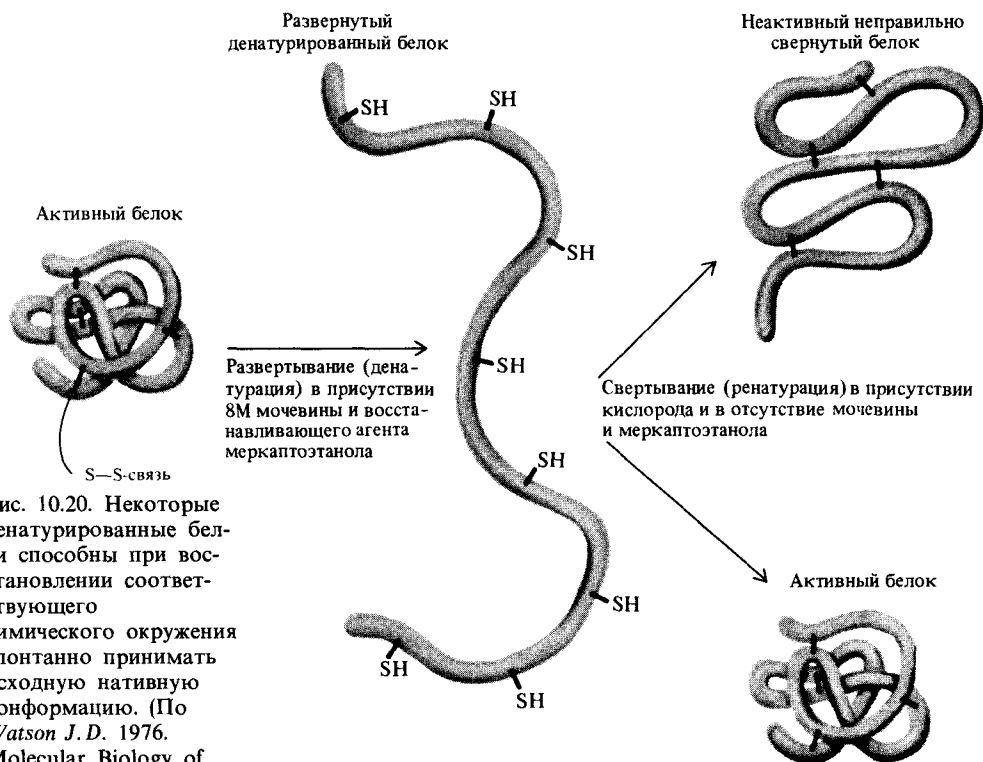


Рис. 10.20. Некоторые денатурированные белки способны при восстановлении соответствующего химического окружения спонтанно принимать исходную нативную конформацию. (По Watson J. D. 1976. *Molecular Biology of the Gene*, 3rd ed., W. A. Benjamin, Menlo Park, Calif.)

го полипептида или некоторой его части. Воздействие других мутаций на организм связано с аминокислотными заменами в полипептидной цепи, кодируемой данным мутантным геном (рис. 10.12). Аминокислотные замены могут, в частности, затрагивать и функционально важные аминокислотные остатки, а также вызывать заметные искажения пространственной структуры. В зависимости от того, насколько сильно эти искажения сказываются на структуре функционально важных участков, может наблюдаться снижение и даже полное исчезновение ферментативной или какой-либо иной функциональной активности белка. Мутации, чувствительные к температуре, могут быть связаны с аминокислотными заменами на участке, существенном для стабилизации вторичной и третичной структуры данного белка. Нормальная конфигурация, присущая при перmissive температуре мутантным полипептидам этого типа, при переходе в область рестриктивных температур может подвергнуться существенным искажениям.

Функциональные белки далеко не всегда синтезируются в активной форме. Так, многие гидролитические (пищеварительные) ферменты синтезируются в форме неактивных предшественников, которые называют *зимогенами*. Активация зимогенов происходит посредством сайт-специфического ограниченного протеолиза, сопровождающегося отщеплением определенного фрагмента аминокислотной последовательности. В качестве одного из примеров можно назвать также полипептидный

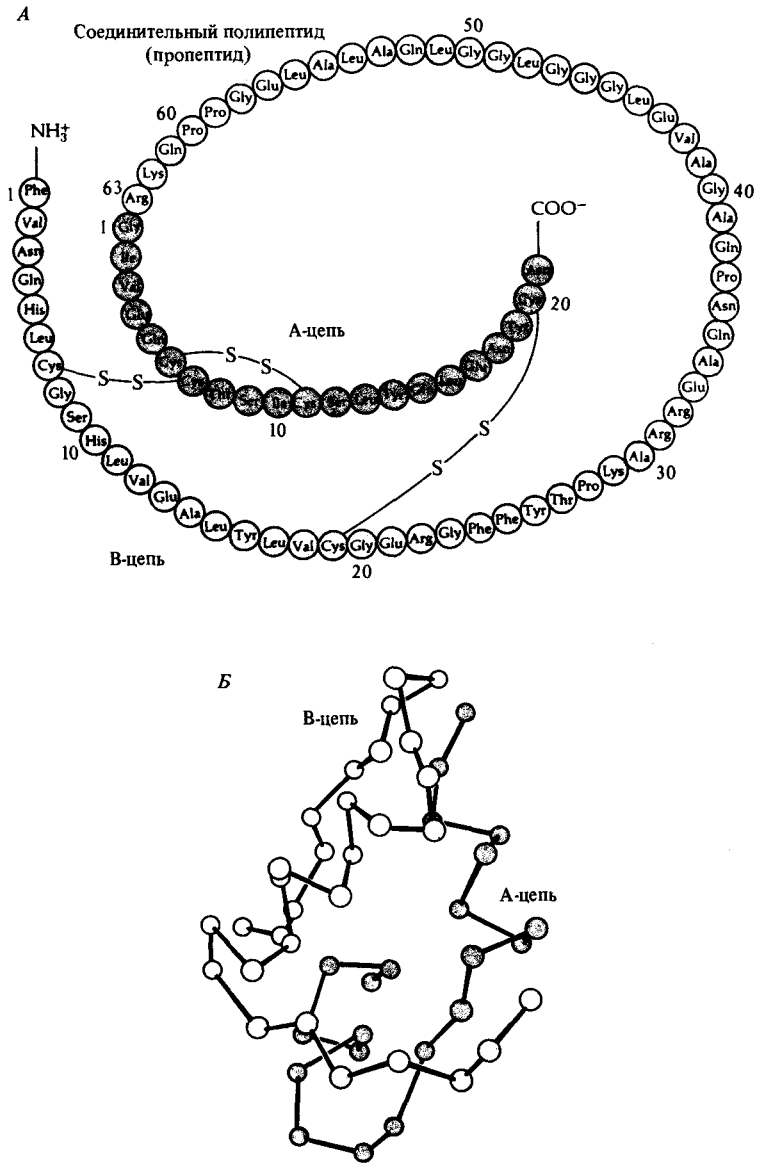


Рис. 10.21. А. Аминокислотная последовательность свиного проинсулина. Активный инсулин состоит из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. В структуре проинсулина обе цепи объединены в одну через связующий дополнительный полипептидный участок, выщепляемый при действии протеиназ. (По Chance

B. et al. 1968. *Science*, 161, 165.) Б. Пространственная структура инсулина. Показаны только положения α -углеродных атомов полипептидного остова. Атомы А-цепи выделены темным цветом, атомы В-цепи – светлым. (По *Stryer L.* 1975. *Biochemistry*, W. H. Freeman, San Francisco.)

гормон инсулин, который синтезируется в виде неактивного предшественника (проинсулина) и затем подвергается активации с помощью ограниченного протеолиза (рис. 10.21).

Внутригенная комплементация

Многие белки представляют собой олигомеры, т. е. состоят из двух или нескольких идентичных полипептидных цепей, взаимодействующих между собой с образованием функционально активной четвертичной белковой структуры. В простейшем случае это — димер (α_2), состоящий из двух одинаковых субъединиц (α). Это обстоятельство может осложнять комплементационный анализ мутантных структурных генов, кодирующих такие белки. Ранее при обсуждении опытов по комплементации мы исходили из того, что комплементация невозможна при наличии в диплоиде двух гетероаллельных мутаций, вызывающих различные аминокислотные замены, каждая из которых независимо инактивирует соответствующий полипептид (см. главу 6). Для примера рассмотрим случай, когда оба мутантных аллеля, m_1 и m_2 , в условиях гомозиготности приводят к некоторому мутантному фенотипу (например, к отсутствию определенной ферментативной активности). На основании сформулированных ранее представлений следовало бы полагать, что поскольку обе мутации затрагивают один и тот же ген, то и двойные гетерозиготы типа $m_1 + / + m_2$ также будут иметь мутантный фенотип. В большинстве случаев, в том числе и для генов, кодирующих олигомерные белки, это действительно так. В то же время известно и доста-

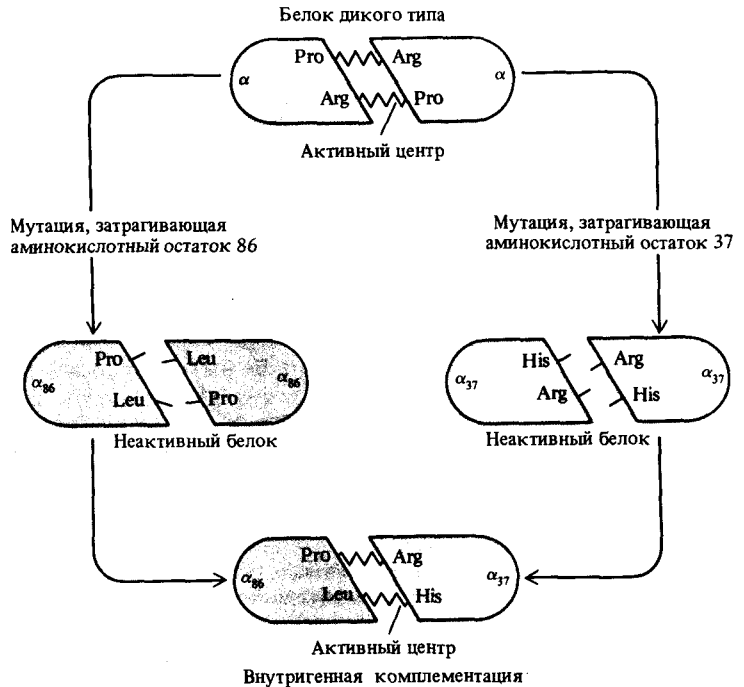


Рис. 10.22. Схема, иллюстрирующая процесс внутригенной комплементации на примере двух мутантных полипептидов, взаимодействующих в цитоплазме двойной гетерозиготы с образованием олигомерного белка с восстановленной функцией. (По Goodenough U. 1978. Genetics, 2nd ed., Holt, Rinehart and Winston, New York.)

точно примеров отклонения от этого правила. Оказалось, что в некоторых случаях две «дефектные» полипептидные цепи, кодируемые содержащимися в двойной гетерозиготе генами с различными мутациями, могут объединиться с образованием олигомерного белка, обеспечивающего более или менее нормальный фенотип. Это явление называют *внутригенной комплементацией*.

На рис. 10.22 схематически показано, как взаимодействие двух мутантных полипептидных цепей может привести к восстановлению активного центра фермента и таким образом обеспечить внутригенную комплементацию. Некоторые гетероаллели данного гена могут проявлять способность к комплементации такого рода, а некоторые – нет. Это зависит в том числе и от локализации конкретных мутаций, которые в одном случае могут затрагивать участки полипептидной цепи, ответственные за взаимодействие между субъединицами, а в другом – области, не участвующие непосредственно в процессе олигомеризации, но существенные для проявления функциональной активности данного белка.

При тщательном изучении обычно удается отличить внутригенную комплементацию от межгенной комплементации. В первом случае наблюдаемый уровень искомой ферментативной активности, как правило, намного ниже, чем в норме. Более того, белки, образующиеся в результате внутригенной комплементации, как правило, отличаются от нормальных белков и по некоторым другим параметрам, например по зависимости активности от рН или температуры.

Литература

- Beadle G. W., Ephrussi B.* (1937). Development of eye colors in *Drosophila*: diffusible substances and their interrelations, *Genetics*, **22**, 76–86.
- Beadle G. W., Tatum E. L.* (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **27**, 499–506.
- Beet E. A.* (1949). The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe, *Ann. Eugen.*, **14**, 279–284.
- Demerec M., Hartman Z.*, 1956. Tryptophan mutants in *Salmonella typhimurium*, Carnegie Institution of Washington Publ., No. 612, Washington, D. C., pp. 5–33.
- Dickerson R. E., Geis I.*, 1969. The Structure and Action of Proteins, W. A. Benjamin, Menlo Park, Calif.
- Fincham J. R. S.*, 1966. Genetic Complementation, W. A. Benjamin, New York.
- Harris H.*, 1975. The Principles of Human Biochemical Genetics, 2nd ed., Elsevier, New York.
- Neel J. V.* (1949). The inheritance of sickle-cell anemia, *Science*, **110**, 64–66.
- Pauling L., Itano H. A., Singer S. J., Wells I. C.* (1949). Sickle-cell anemia, a molecular disease, *Science*, **110**, 543–548.
- Scriver C. R., Clow C. L.* (1980). Phenylketonuria and other phenylalanine hydroxylation mutants in man, *Annu. Rev. Genet.*, **14**, 179–202.

Ключевые слова и понятия

Аминокислота
 Внутригенная комплементация
 «Врожденные ошибки метаболизма»
 Вторичная структура

Генетический анализ путей
 биохимических превращений
 Гетерокарион
 Гипотеза «один ген – один фермент»

Зимоген
Олигомерные белки
Пептидная связь
Первичная структура
Полипептид
Преформация

Протеолиз
Серповидноклеточная анемия
Третичная структура
Четвертичная структура
Эпигенез

Задачи

10.1. Рассчитайте число разных белков (различающихся по аминокислотной последовательности), которое может быть закодировано тремя генами, содержащими по 30, 300 и 3000 нуклеотидных пар в кодирующей области.

10.2. Известно, что пептид состоит из шести аминокислот — аланина, глицина, гистидина, лизина, метионина, триптофана. Однако порядок их расположения в пептидной цепи неизвестен. При химическом расщеплении этого пептида экспериментатору удалось идентифицировать три следующих трипептидных продукта деградации: Met-His-Trp, Lys-Ala-Gly и Gly-Met-His. Какова аминокислотная последовательность этого пептида?

10.3. Трансплантаты, полученные Бидлом и Эфрусси при работе с мутантными (и дикой) линиями *Drosophila melanogaster*, обладали следующими свойствами в отношении способности к автономному (а) или неавтономному (н) развитию. Обратите внимание на то, что *ca*-мутанты имеют глаза более яркого цвета из-за недостатка коричневого глазного пигмента, а у *bw*-мутантов недостает красного пигмента и имеется только коричневый глазной пигмент.

Имплантат	Реципиент				
	+	<i>bw</i>	<i>ca</i>	<i>cn</i>	<i>v</i>
+	а	а	н	а	а
<i>bw</i>	а	а			
<i>ca</i>	а		а		
<i>cn</i>	н	н	а	а	а
<i>v</i>	н	н	а	н	а

Предложите интерпретацию этих результатов.

10.4. Мутантный штамм *sus L* бакте-

риофага λ при выращивании на Su^- -хозяине не способен давать инфекционного потомства (см. гл. 7). Инфицированные клетки лизируются, однако, как показывает электронно-микроскопический анализ фаголизата, при этом выделяются нормальные фаговые головки, лишённые хвостовых отростков. Мутантный штамм фага $\lambda_{sus A}$ также не даёт инфекционного потомства на Su^- -хозяине, при этом электронное микроскопирование позволяет установить, что в лизате присутствуют хвостовые отростки, но отсутствуют фаговые головки. Если освобожденные от клеток лизаты, полученные при таком культивировании $\lambda_{sus L}$ и $\lambda_{sus A}$, смешать и проинкубировать несколько часов при $37^\circ C$, то происходит объединение головок $\lambda_{sus L}$ и хвостовых отростков $\lambda_{sus A}$ с образованием инфекционных фаговых частиц, которые можно обнаружить по способности давать негативные колонии (бляшки) на Su^+ -хозяине. Что будет, если клетки Su^- -хозяина одновременно инфицировать обоими мутантными фагами $\lambda_{sus A}$ и $\lambda_{sus L}$?

10.5. В приведенной ниже таблице показано число фаговых частиц, образующихся при смешивании лизатов, полученных при культивировании различных

Мутантный лизат	Число инфекционных фаговых частиц ($\cdot 10^{-7}$)	
	лизат <i>sus L</i>	лизат <i>sus A</i>
<i>sus W</i>	250	< 0,001
<i>sus C</i>	410	< 0,001
<i>sus Z</i>	< 0,01	350
<i>sus U</i>	< 0,001	560
<i>sus F</i>	200	< 0,01
<i>sus V</i>	< 0,001	310

λ *sus*-мутантов [*W*, *C*, *Z*, *U*, *F*, *V*] на *Su*⁻-хозяине, с лизатами λ *sus A* или λ *sus L* аналогично тому, как это описано в задаче 10.4. Определите, какого типа дефекты присущи каждому из λ *sus*-мутантов.

10.6. Смешивание лизатов, полученных при инфекции *Su*⁻-хозяиных клеток мутантными фагами λ *sus B* и λ *sus E*, с аналогичным образом полученным лизатом λ *sus A* (см. задачу 10.4) не приводит к образованию инфекционных фаговых частиц. Как следует построить эксперимент, чтобы выяснить, являются ли все три мутантных фага дефектными по одной и той же генетической функции?

10.7. Известно, что кровь больных, страдающих сцепленной с X-хромосомой гемофилией, в стеклянной пробирке свертывается гораздо медленнее, чем кровь здоровых людей. При обследовании одного мальчика оказалось, что его кровь характеризуется плохой свертываемостью. Это давало основания полагать, что он болен классической гемофилией. Однако при смешивании крови этого мальчика с кровью другого гемофилика наблюдалось быстрое образование сгустка за время, характерное для свертывания крови нормального донора. Предложите интерпретацию этого феномена.

10.8. Фермент сАМР-фосфодиэстераза (ФДЭ) превращает циклический нуклеотид сАМР в 5'-АМР. Измеряли активность ФДЭ у мутантных линий плодовой мушки *Drosophila*, гетерозиготных по некоторым концевым нехваткам (см. рис. 5.19), и сравнивали с ферментативной активностью, характерной для нормальных особей. В таблице приведены данные, отражающие отношение активностей у дефектных особей к активности в норме.

Дефектные линии	Относительный уровень ферментативной активности
<i>Df(1)NSt</i>	0,685 ± 0,066
<i>Df(1)N^{71h24-5}</i>	0,638 ± 0,077
<i>Df(1)N^{64j15}</i>	0,815 ± 0,063
<i>Df(1)N^{54l9}</i>	0,996 ± 0,089
<i>Df(1)w^{-67k30}</i>	1,12 ± 0,054
<i>Df(1)dm^{75e19}</i>	0,662 ± 0,028

Аналогично измерили активность ФДЭ у самок и самцов *Drosophila*, несущих дуплицированные хромосомы (рис. 5.19), и сравнили с ферментативной активностью самок и самцов с недуплицированными хромосомами. В таблице приведены отношения ферментативных активностей у особей с дуплицированными и недуплицированными хромосомами.

Дупликация	Относительный уровень ферментативной активности	
	самки	самцы
<i>Dp(1;3)G^{Spot}</i>	1,44 ± 0,040	1,77 ± 0,15
<i>Dp(1;2)w^{+51b7}</i>	1,58 ± 0,26	
<i>Dp(1;Y)w⁺</i>		1,89 ± 0,20

Предложите наиболее простое объяснение этих результатов.

10.9. Проводили изучение трех независимо полученных ауксотрофных мутантов *Neurospora* с тем, чтобы определить, какие промежуточные метаболиты могут восполнить потребность каждого из этих штаммов в метионине. В приведенной ниже таблице знаком «+» помечена способность данного штамма расти на минимальной среде с добавкой данного вещества, а знаком «-» отсутствие роста в этих условиях.

Мутант	Метионин	Гомосерин	Гомоцистеин	Цистатионин
1	+	-	+	-
2	+	-	-	-
3	+	-	+	+

Расставьте эти вещества в том порядке, в котором они должны располагаться на пути биосинтеза метионина.

10.10. Еще одна мутация *Neurospora*, подверженная менделевскому расщеплению, характерному для одиночного гена, привносит ауксотрофность как по метионину, так и по треонину. Обе эти питательные потребности можно удовлетворить, добавив к среде гомосерин. Дайте объяснение.

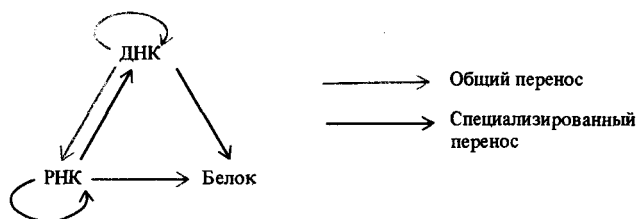
Передача информации в клетках

Представление о том, что первичная структура каждого белка в организме кодируется определенным геном, приводит к весьма существенным выводам. Известно, что в состав белков входит 20 различных аминокислот, в то время как в ДНК содержатся нуклеотиды только четырех видов. Следовательно, соответствие между нуклеотидными и аминокислотными последовательностями не может быть построено по принципу «один к одному». Таким образом, необходимо предположить существование такого кода, в котором каждой данной аминокислоте соответствовала бы комбинация из нескольких нуклеотидов.

Концепция генетического кода очень важна, и из нее, в частности, вытекает представление о существовании системы передачи информации. Наследственная информация о структуре клеточных белков закодирована в нуклеотидной последовательности клеточной ДНК с помощью четырехбуквенного алфавита (этот термин является вполне адекватным, поскольку алфавит – это и есть набор символов, используемых для передачи информации). В аминокислотных последовательностях белков эта информация «переписана» с помощью 20-буквенного алфавита. Генетический код, по словам Крика, устанавливает связь «между двумя великими полимерными языками – языком нуклеиновых кислот и языком белков».

Концепция наследования информации лежит в основе того представления, которое Крик назвал *центральной догмой* молекулярной биологии и которое, по сути дела, задает иерархическую структуру информационного потока в биологических системах (рис. 11.1). Выделяют три типа процессов переноса информации: 1) общий перенос (тот, который происходит в любых клетках); 2) специализированный перенос (происхо-

Рис. 11.1. Направления переноса генетической информации между биологическими макромолекулами – центральная догма молекулярной биологии. («Запрещенные» переносы на диаграмме не отмечены.)



дит в клетках только при некоторых особых обстоятельствах) и 3) запрещенный перенос (процессы, которые никогда не были зарегистрированы или даже предсказаны).

Общий перенос информации

Синтез ДНК

Три вида информационных переносов общего типа, протекающие в любых клетках, проиллюстрированы на рис. 11.1. Первый из них – это перенос информации от ДНК к ДНК, который имеет место в ходе полуконсервативной репликации ДНК и обеспечивается принципом комплементарности оснований в обеих цепях двойной спирали ДНК, как это описано в гл. 4. Процесс переноса генетической информации от родительских к дочерним молекулам с точным образованием комплементарных пар оснований контролируется весьма сложной ферментативной системой. Рассмотрение деталей этого процесса мы отложим до гл. 13.

Синтез РНК

Другая разновидность переносов общего типа – это перенос генетической информации от ДНК к РНК. Этот процесс также обеспечивается образованием комплементарных пар оснований, идентичных тем, которые имеются в двойной спирали ДНК, за исключением того, что дезоксирибоаденозину в цепи ДНК в комплементарной цепи РНК соответствует остаток рибουридина. Перенос информации от двухцепочечной молекулы ДНК к одноцепочечной РНК называется *транскрипцией* и осуществляется с помощью ферментов, называемых РНК-транскриптазами или РНК-полимеразами. (РНК-полимераза – это общепринятое название для ферментов данного типа.)

Молекулы РНК «считываются» с определенных участков хромосомной ДНК, называемых *транскрипционными единицами*. В качестве субстратов при биосинтезе РНК используются рибонуклеозидтрифосфаты. Синтез РНК-транскрипта протекает в направлении от 5'- к 3'-концу (рис. 11.2). При этом на 5'-конце растущей цепи РНК находится 5'-трифосфат, а 3'-гидроксильная группа на другом конце цепи служит центром образования следующей фосфодиэфирной связи при участии фермента РНК-полимеразы. В зоне синтеза РНК происходит «расплетание» примерно двух витков (16–18 пар оснований) спирали ДНК, и таким образом экспонируется участок цепи ДНК-матрицы, «считы-

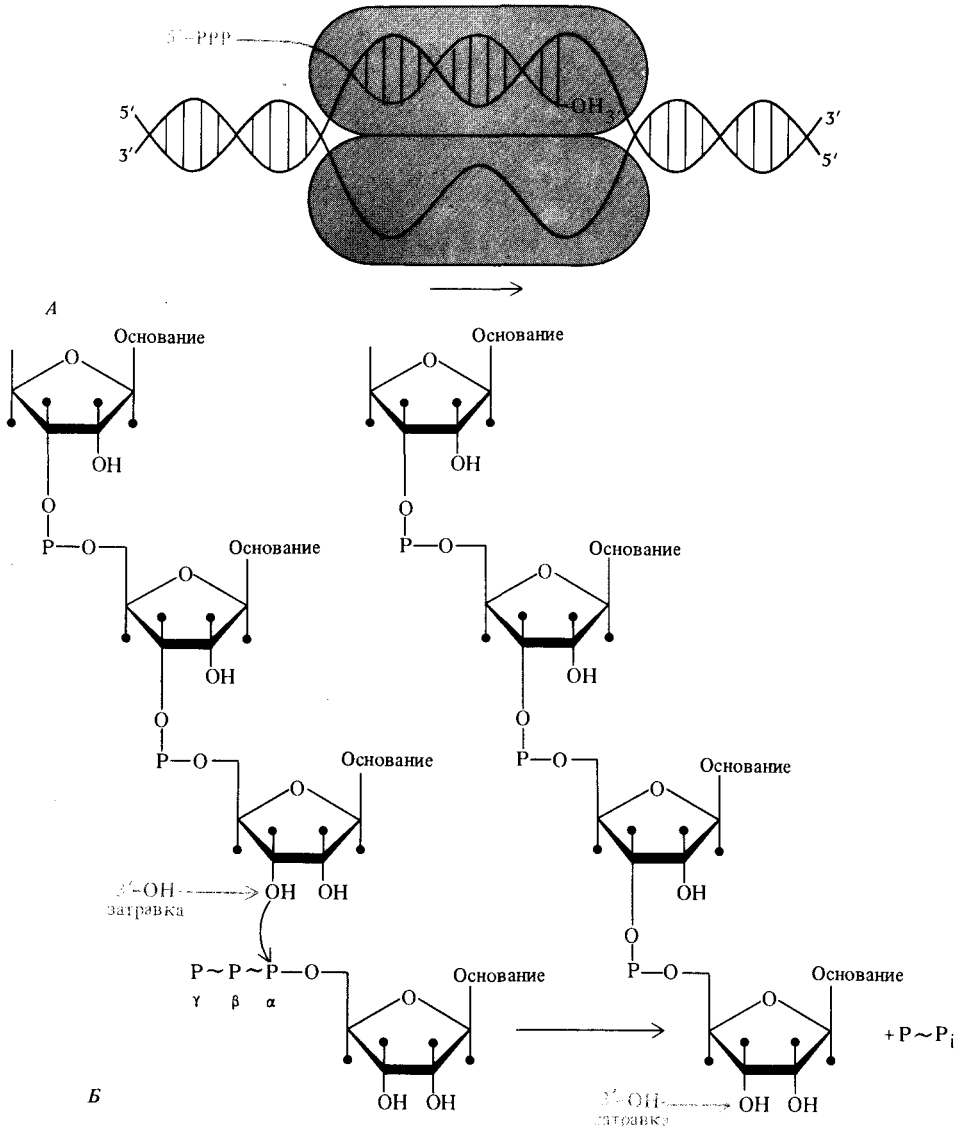


Рис. 11.2. А. Схематическое изображение процесса транскрипции РНК (цветная линия) по ДНК-матрице. Для транскрипции необходимо локальное расхождение цепей двойной спирали ДНК для экспонирования цепи, выступающей в роли матрицы. Для инициации синтеза РНК не требуется наличия 3'-ОН-заправки; на 5'-конце растущей цепи РНК остается трифосфатная группировка. Б. Синтез РНК происходит за счет взаимодействия 3'-гидроксильной группы растущей цепи и α-

фосфатного остатка соответствующего рибонуклеозидтрифосфата с образованием фосфодиэфирной связи. 3'-ОН-группа включившегося таким образом нуклеозида участвует в образовании фосфодиэфирной связи со следующим рибонуклеозидтрифосфатом и т.д. Волнистыми линиями помечены макроэргические связи (расщепление которых связано с выделением большого количества энергии).

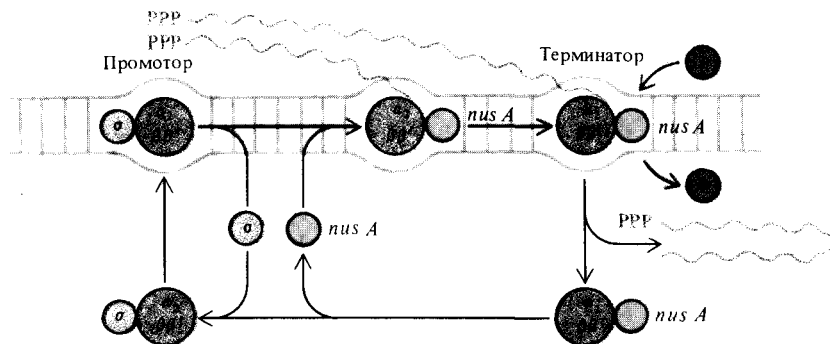


Рис. 11.3. Общая схема процесса транскрипции в клетках *E. coli*. Показан кор-фермент ($\alpha_2\beta\beta'$) РНК-полимеразы, отмечено участие вспомогательных белков, направляющих действие фермента на инициаторном и терминаторном участках транскрипционной единицы.

васмый» в направлении $3' \rightarrow 5'$. В некоторых транскрипционных единицах ДНК-матрицей для синтеза РНК служит одна из двух цепей, а в других – комплементарная ей вторая цепь молекулы ДНК. Транскрипционные единицы в ДНК ограничиваются, с одной стороны, *промото-ром*, т. е. участком инициации транскрипции, а с другой стороны, участком остановки транскрипции – *терминатором*. Нуклеотидные последовательности на этих участках узнаются специальными белками, которые регулируют активность РНК-полимеразы.

Весьма подробно была изучена РНК-полимераза *E. coli*. Ее основу образует так называемый кор-фермент, состоящий из четырех полипептидных цепей – двух идентичных субъединиц (α) и двух различных субъединиц (β и β'). Кор-фермент катализирует рост цепи за счет присоединения рибонуклеозидтрифосфатов к $3'$ -концу синтезируемой молекулы РНК. Присоединение к кор-ферменту еще одной полипептидной цепи, называемой σ -субъединицей, приводит к образованию *холофермента* РНК-полимеразы. σ -Субъединица обеспечивает точное узнавание промоторного участка и выбор одной из комплементарных цепей ДНК в качестве матрицы на стадии инициации транскрипции (рис. 11.3). После того как синтез РНК уже начался, происходит диссоциация σ -субъединицы. Вместо нее с кор-ферментом соединяется другой белок – продукт гена *nus A*. Этот ферментативный комплекс продолжает транскрипцию вплоть до терминаторного участка, узнавание которого и обеспечивается белком *nus A*. Подробности молекулярного механизма терминации транскрипции окончательно неизвестны, однако есть основания полагать, что для высвобождения новосинтезированной цепи РНК из комплекса с РНК-полимеразой и ДНК кроме *nus A* необходим по крайней мере еще один белок, называемый ρ -фактором.

РНК-полимераза *E. coli* обеспечивает транскрипцию участков ДНК, несущих информацию о последовательностях молекул РНК всех трех классов: рибосомной РНК (рРНК), транспортной РНК (тРНК) и информационной (или матричной) РНК (мРНК). В эукариотических клетках, напротив, имеются три различные РНК-полимеразы, каждая из которых специфически узнает промоторы, контролируемые транскрип-

цию трех различных классов молекул РНК. Эукариотическая РНК-полимераза I локализуется в ядрышке и отвечает за синтез основных рибосомных РНК. РНК-полимераза III осуществляет транскрипцию транспортных РНК и еще одного компонента рибосом – 5SРНК. Транскрипция всех остальных РНК, включая молекулы мРНК, несущие информацию о структуре белков, осуществляется РНК-полимеразой II. Ферменты II и III типа локализуются в нуклеоплазме.

Процессы образования мРНК у прокариотических и эукариотических клеток характеризуются некоторыми довольно существенными различиями, которые еще будут подробно обсуждаться в этой главе. Пока только отметим, что в эукариотических клетках вскоре после инициации транскрипции происходит модификация 5'-трифосфата в образующейся цепи за счет присоединения так называемого кэпа – метилированного остатка гуанозина. Кроме того, у большинства транскриптов происходит также модификация 3'-концов (важнейшим исключением из этого правила являются мРНК гистонных белков), – по окончании транскрипции к ним присоединяется цепочка из остатков аденина, образующая характерный poly A-«хвост».

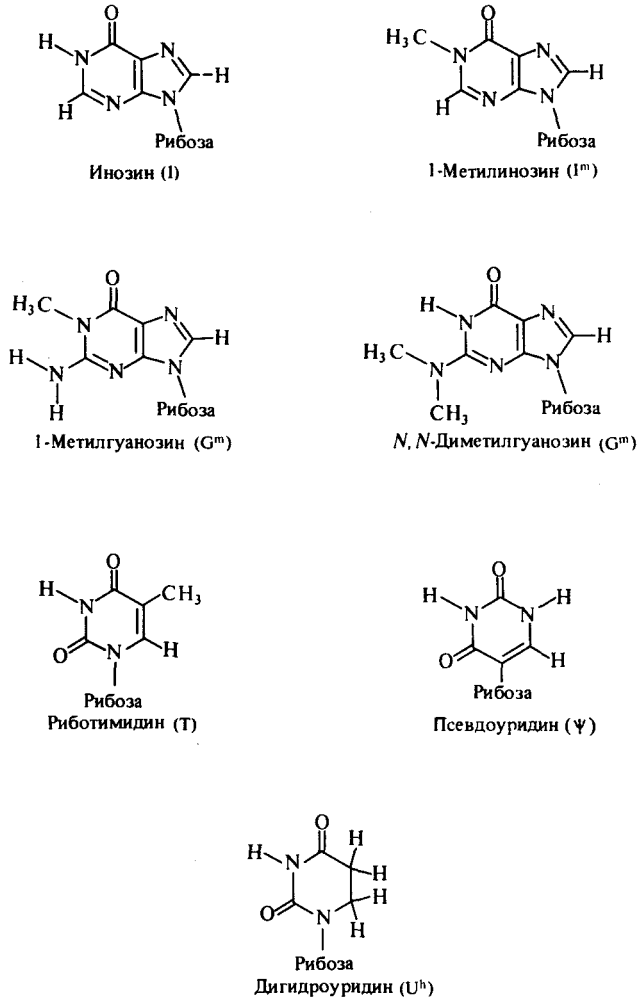
Во всех организмах при транскрипции ДНК образуются молекулы РНК трех вышеназванных классов. Все они участвуют в третьей разновидности общих процессов передачи информации – от РНК к белку.

Синтез белка

Перенос информации от нуклеотидной последовательности мРНК к определенной аминокислотной последовательности соответствующего белка представляет собой сложный процесс, называемый *трансляцией* (от *translation* – перевод), поскольку он сопровождается «переводом» информации, записанной с помощью четырехбуквенного алфавита на язык с двадцатибуквенным алфавитом. Точность такого перевода обеспечивает правильную расстановку аминокислот в образующейся полипептидной цепи. В процессе трансляции наряду с мРНК участвуют и молекулы РНК двух других видов – тРНК и рРНК. Информация об аминокислотной последовательности каждого белка кодируется в виде последовательности кодонов в соответствующих мРНК. Каждый кодон состоит из трех нуклеотидов, которые считываются без перекрывания (более подробно это будет обсуждаться в гл. 12).

Транспортная РНК. Кодоны и соответствующие аминокислоты не вступают в непосредственное взаимодействие друг с другом. Связь между ними осуществляется при участии молекул транспортных РНК. Для каждой из 20 аминокислот существует не менее одного вида специализированной тРНК, которую в соответствии со специфичностью обозначают как тРНК^{Phe}, тРНК^{Ser} и т.п. (условные обозначения всех аминокислот приведены на рис. 10.13). Различные транспортные РНК отличаются друг от друга как по нуклеотидной последовательности, так и по содержанию некоторых необычных (минорных) нуклеотидов (рис. 11.4). Эти минорные нуклеотиды обнаруживаются только в тРНК и возникают в результате посттранскрипционной ферментативной модификации обычных оснований. Молекулы всех прокариотических и эукариотических тРНК содержат около 80 нуклеотидов и характеризуются

Рис. 11.4. Структура некоторых редких (минорных) оснований в составе молекул тРНК, возникающих в результате посттранскрипционной модификации, направляемой специализированными ферментами. Эти необычные основания придают молекулам тРНК некоторые из присущих им функций узнавания.



ся очень сходной вторичной (и пространственной) структурой, которую можно схематически представить в виде конфигурации «клеверного листа», показанной на рис. 11.5. Соответствующая типичная пространственная структура одной из тРНК отражена в виде молекулярной модели на рис. 11.6.

Молекулы тРНК всех видов обладают двумя важнейшими структурными свойствами: 1) на 3'-конце тРНК находится последовательность $-pCpCpA_{он}$, которая служит специфическим сайтом ковалентного присоединения соответствующей аминокислоты, и 2) во внутренней области молекулы имеется петля, содержащая антикодон-тройку нуклеотидов, комплементарных соответствующему кодону.

Функциональное значение молекулы тРНК заключается в обеспечении специфического узнавания данного кодона соответствующей аминокислотой. тРНК выступает в роли своего рода опознавательного устройства, контролирующего точность процесса трансляции. Это опознавательное устройство срабатывает на двух важнейших этапах, ко-

Рис. 11.5. Типичная вторичная структура типа клеверного листа, характерная для молекул тРНК. Дигидроуридиновая (U^h) петля содержит несколько остатков дигидроурацила. Показан способ присоединения аминокислоты (структурная формула аминокислоты выделена цветом).

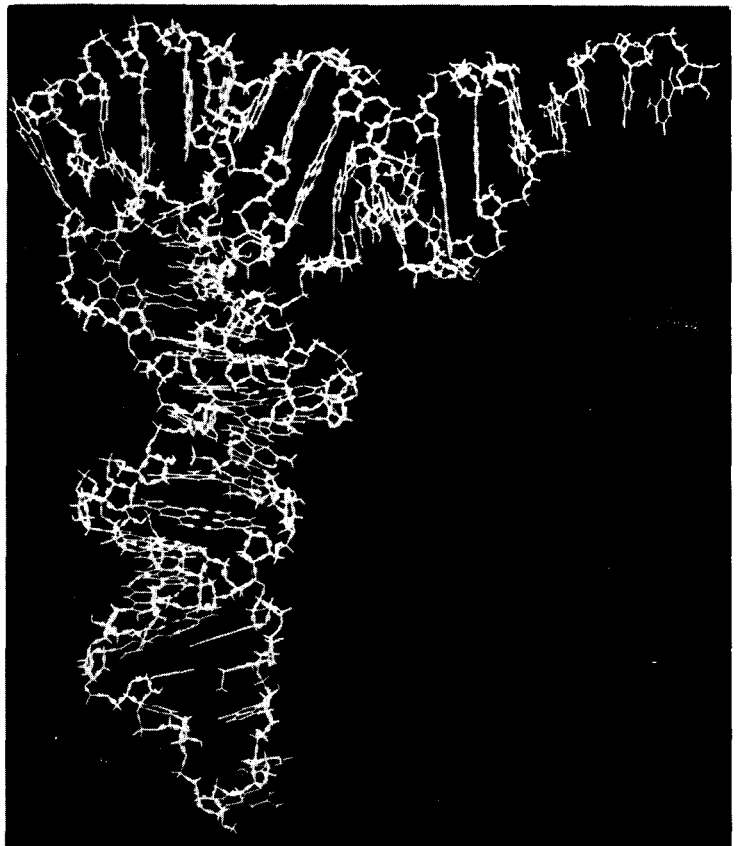
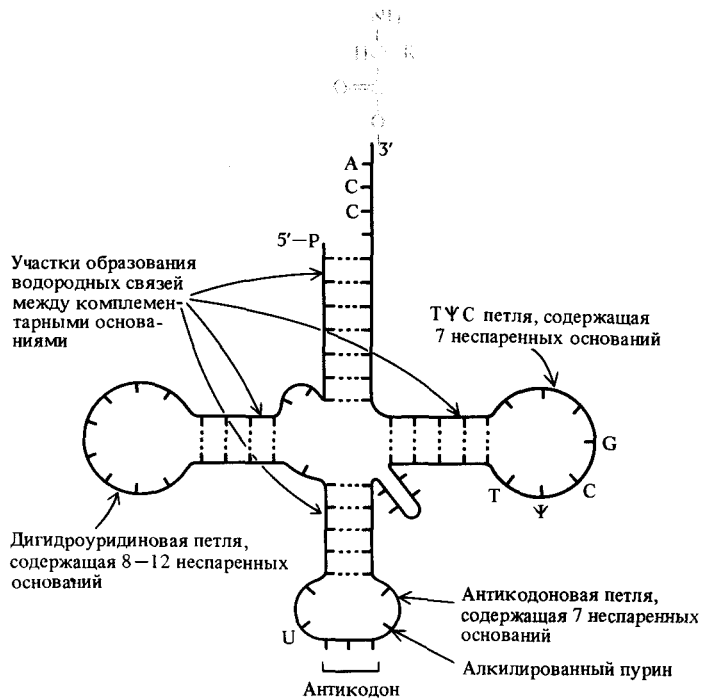


Рис. 11.6. Молекулярная модель дрожжевой $tRNA^{Phe}$, построенная на основании данных по дифракции рентгеновских лучей при прохождении через кристалл, образованный молекулами этой тРНК. На рисунке 3'-ССА-конец находится справа вверху, а антикодоновая петля – внизу. (По Kim S.H. et al. 1974. Science, 185, 435 Copyright 1974 by the American Association for Advancement of Science.)

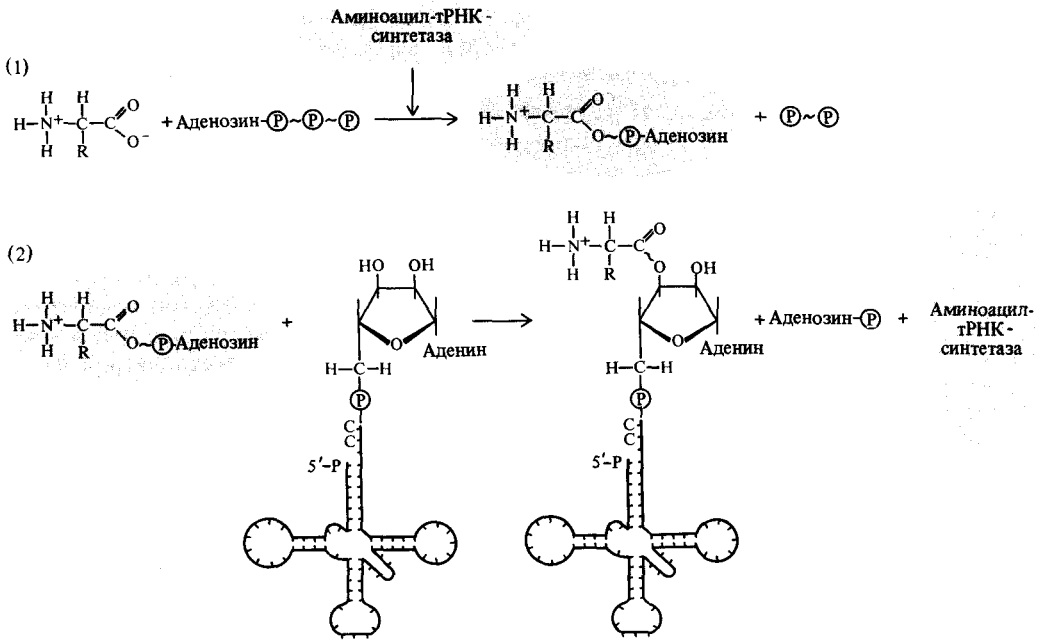
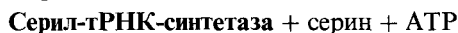


Рис. 11.7. Активация аминокислоты осуществляется аминоацил-тРНК-синтетазой (окрашенный овал) в два этапа. Образование богатой энергией аминокацильной связи (волнистая линия) обеспечивается за счет гидролиза АТР.

которые подробно обсуждаются в следующем разделе. Оба этапа необходимы для точной трансляции мРНК с образованием белкового продукта, аминокислотная последовательность которого в точности отражает нуклеотидную последовательность соответствующего участка ДНК.

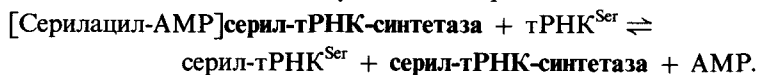
Аминоацил-тРНК. Ковалентное связывание аминокислоты с молекулой соответствующей тРНК происходит при участии специфического фермента — *аминоацил-тРНК синтетаза*. Существует 20 видов ферментов этого типа — по одному для каждой из 20 аминокислот. Это сложным образом организованные ферменты, каждый из которых способен специфически узнавать вполне определенную аминокислоту и соответствующую тРНК и катализировать процесс ковалентного связывания α-карбоксильной группы аминокислоты с 3'-ОН-группой остатка аденозина на —СрСр_{А_{он}}-конце тРНК. Этот процесс, который мы проиллюстрируем на примере одной из аминокислот — серина, протекает в две стадии.

Первая стадия — это активация аминокислоты (рис. 11.7):



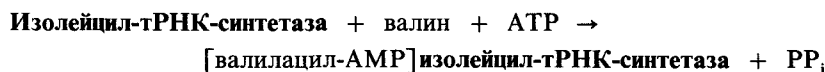
(напомним, что символом PP_i обозначают молекулу пиррофосфата). На этом этапе образуется серилацил-АМР — промежуточное соединение, содержащее энергетически богатую ковалентную связь и существующее в виде молекулярного комплекса с ферментом.

На втором этапе (см. рис. 11.7) происходит перенос активированной аминокислоты на 3'-ОН-конец соответствующей тРНК. При этом высокая энергия связи серилацил-АМР переходит к возникающей связи серил-тРНК^{Ser} и далее используется для образования пептидной связи.

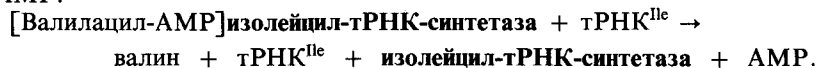


Аминоацил-тРНК-синтетазы играют ключевую роль в обеспечении тех процессов, благодаря которым генетическая информация, столь аккуратно передающаяся в неизменном виде от поколения к поколению, столь же точно выражается и на этапе трансляции. Очевидно, что точность процесса трансляции должна зависеть от того, с какой точностью каждая аминоацил-тРНК синтетаза сможет из всего набора аминокислот выбирать одну определенную аминокислоту и присоединять ее к соответствующей тРНК. Важное значение для обеспечения точности трансляции имеют дополнительные ферментативные функции, присущие аминоацил-тРНК-синтетазам. Одну из этих функций, которую можно назвать контролирующей (*verification function*), мы проиллюстрируем на следующем примере. Представим себе, что изолейцил-тРНК-синтетаза случайно узнает «чужую» тРНК и за счет этого вместо изолейцил-тРНК^{Ile} образуется, например, изолейцил-тРНК^{Phe}. Такая ошибка могла бы привести к ошибочному включению в синтезируемую белковую цепь остатка фенилаланина вместо изолейцина. Однако оказывается, что фенилаланил-тРНК-синтетаза может «опознать» неправильный ассоциат между «своей» тРНК и «чужой» аминокислотой и гидролизовать его до свободных изолейцина и тРНК^{Phe}.

Другая корректирующая функция (*proofreading function*) отличается от рассмотренной выше, и ее можно проиллюстрировать следующим примером. Допустим, что на стадии активации аминокислоты изолейцил-тРНК-синтетаза ошибочно принимает валин за изолейцин:

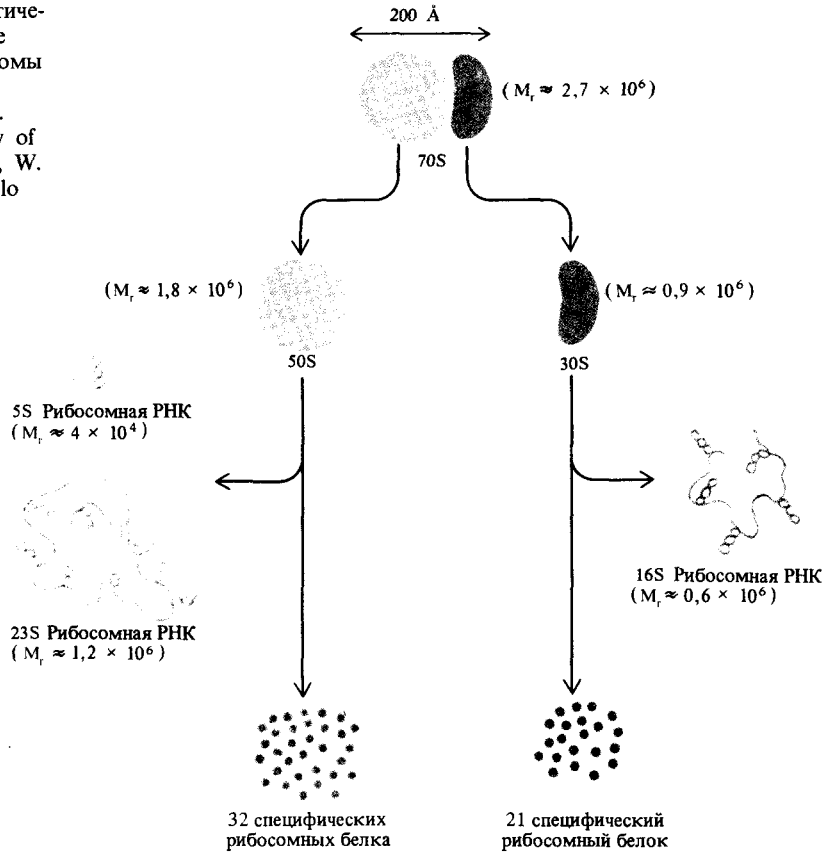


Тогда на следующем этапе при взаимодействии возникшего «неправильного» комплекса с тРНК^{Ile} (см. рис. 11.7) вместо образования валил-тРНК^{Ile} индуцируется гидролиз валилацил-АМР до валина и АМР:



Таким образом, аминоацил-тРНК-синтетазы действительно играют важнейшую роль в процессе трансляции генетической информации, связывая определенные аминокислоты с соответствующими антикодонами. Кроме того, благодаря дополнительным контролирующим и корректирующим функциям эти ферменты обеспечивают высокую точность трансляции, всякий раз подвергая соответствие между антикодоном и аминокислотой по крайней мере еще одной дополнительной проверке. Так, если в приведенном выше примере частота «ошибочной» активации аминокислоты при действии изолейцил-тРНК-синтетазы составляет 1 валин на 100 молекул изолейцина, а наблюдаемая ошибка коррекции не выше 1 на 180, то общая ошибка трансляции не будет превышать $1/100 \cdot 1/180 = 1/18000$.

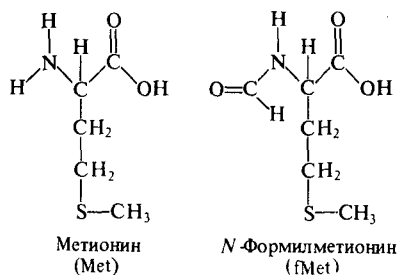
Рис. 11.8. Схематическое изображение структуры рибосомы *E. coli*. (По Watson J. D. 1976. *Molecular Biology of the Gene*, 3rd ed., W. A. Benjamin, Menlo Park, Calif.)



Образование пептидной связи. Следующий этап биосинтеза белка после образования аминоксил-тРНК заключается в их «расстановке по порядку» и замыкании пептидных связей между соответствующими аминокислотами. Процесс расстановки осуществляется с помощью рибосом в соответствии с последовательностью кодонов в мРНК. Рибосомы представляют собой крупные нуклеопротеидные структуры, в которых три основные цепи рРНК находятся в комплексе с набором специфических рибосомных белков (рис. 11.8). Рибосомы состоят из двух субъединиц. У бактерий это так называемые 30S- и 50S-субъединицы (S – константа Сведберга, используемая в качестве единицы размера, который оценивают по скорости седиментации частиц в растворе при центрифугировании). Рибосомные субъединицы эукариот обычно несколько крупнее (40S и 60S). Целые рибосомы, образующиеся при взаимодействии большой и малой субъединиц, характеризуются значениями констант седиментации 70S (бактерии) и 80S (эукариоты).

Хлоропласты и митохондрии эукариотических клеток располагают своими собственными рибосомами, которые по размеру ближе к прокариотическим, чем к цитоплазматическим рибосомам эукариот. Большая часть ДНК, обнаруживаемой в хлоропластах и митохондриях, содержит информацию о структуре компонентов их собственной системы биосинтеза белка.

Рис. 11.9. Структура метионина и N-формилметионина.



Синтез всех полипептидных цепей протекает в направлении от N-конца к С-концу и всегда начинается с метионина. У некоторых полипептидов иницирующий N-концевой остаток метионина отщепляется еще до завершения синтеза всей цепи. Инициация синтеза полипептидной цепи всегда происходит при участии тРНК^{Met} особого типа, обозначаемой тРНК₁^{Met}. В бактериях NH₂-группа иницирующего метионина блокируется формильной группой (рис. 11.9) с образованием N-формилметионил-тРНК₁^{Met}. Сразу же после начала синтеза цепи происходит отщепление формильной группы. В то же время у эукариот иницирующий остаток метионина в метионил-тРНК₁^{Met} не формилирован. Как в прокариотах, так и в эукариотах остатки метионина, находящиеся внутри полипептидной цепи, переносятся тРНК^{Met} второго типа. Инициация синтеза полипептидной цепи начинается с присоединения малой рибосомной субъединицы к соответствующему центру связывания на мРНК, включающему инициаторный метиониновый кодон AUG. Вслед за этим происходит связывание N-формилметионил-тРНК₁^{Met} за счет взаимодействия между ее антикодоном и кодоном AUG (рис. 11.10). В этом процессе участвуют три белковых фактора инициации: IF1, IF2, IF3. Фактор IF3 сначала связывается с малой рибосомной субъединицей, что предотвращает ее взаимодействие с большой субъединицей и открывает возможность связывания с мРНК. В инициаторном комплексе фактор IF2 содержит в качестве кофактора связанный GTP. Последующее взаимодействие комплекса с большой рибосомной субъединицей сопровождается вытеснением факторов инициации и расщеплением GTP → GDP + P_i. В большой субъединице находятся два участка связывания тРНК – участок связывания пептидил-тРНК (или Р-участок) и участок связывания аминоацил-тРНК (А-участок). Иницирующая N-формилметионил-тРНК₁^{Met} прикрепляется к Р-участку. Из всех имеющихся в клетке тРНК только тРНК₁^{Met} может участвовать в образовании инициаторного комплекса. Следующий кодон, стоящий в последовательности мРНК сразу после иницирующего AUG-кодона, попадает в А-участок, где может происходить его взаимодействие с аминоацил-тРНК, несущей подходящий антикодон.

Следующая стадия синтеза полипептида представляет собой многократное повторение цикла присоединения очередной аминокислоты к растущей полипептидной цепи. Это так называемая стадия элонгации, для осуществления которой в случае прокариот необходимо участие двух белковых факторов – EF-Tu и EF-G. Аналогичные факторы элонгации эукариотических клеток называются EF-1 и EF-2. Фактор элонгации EF-Tu в комплексе с кофактором GTP связывается с любой аминоацил-

тРНК, за исключением N-формилметионил-тРНК₁^{Met}. EF-Tu является одним из основных белковых компонентов прокариотических клеток (в *E. coli* его содержание составляет до 6% от суммарного клеточного белка). Вероятно, аминоацил-тРНК постоянно находятся в комплексе с EF-Tu и в свободном виде практически не существуют. Комплекс аминоацил-тРНК:EF-Tu:GTP связывается с А-участком рибосомы, при этом в зависимости от находящегося в А-участке кодона будет связываться именно та аминоацил-тРНК, антикодон которой окажется комплементарным кодону, то есть сможет образовать с ним эффективную систему водородных связей. Затем происходит высвобождение из комплекса фактора EF-Tu, сопровождающееся гидролизом $GTP \rightarrow GDP + P_i$.

После того как подходящая аминоацил-тРНК связалась с А-участком, происходит образование пептидной связи при участии *пептидилтрансферазы* – фермента, входящего в состав большой рибосомной субъединицы. Остаток формилметионина переносится с тРНК₁^{Met} на NH₂-группу следующего аминокислотного остатка, находящегося в виде аминоацил-тРНК в А-участке. При этом образуется пептидил-тРНК (рис. 11.11). Энергия, необходимая для этого процесса, по-видимому,

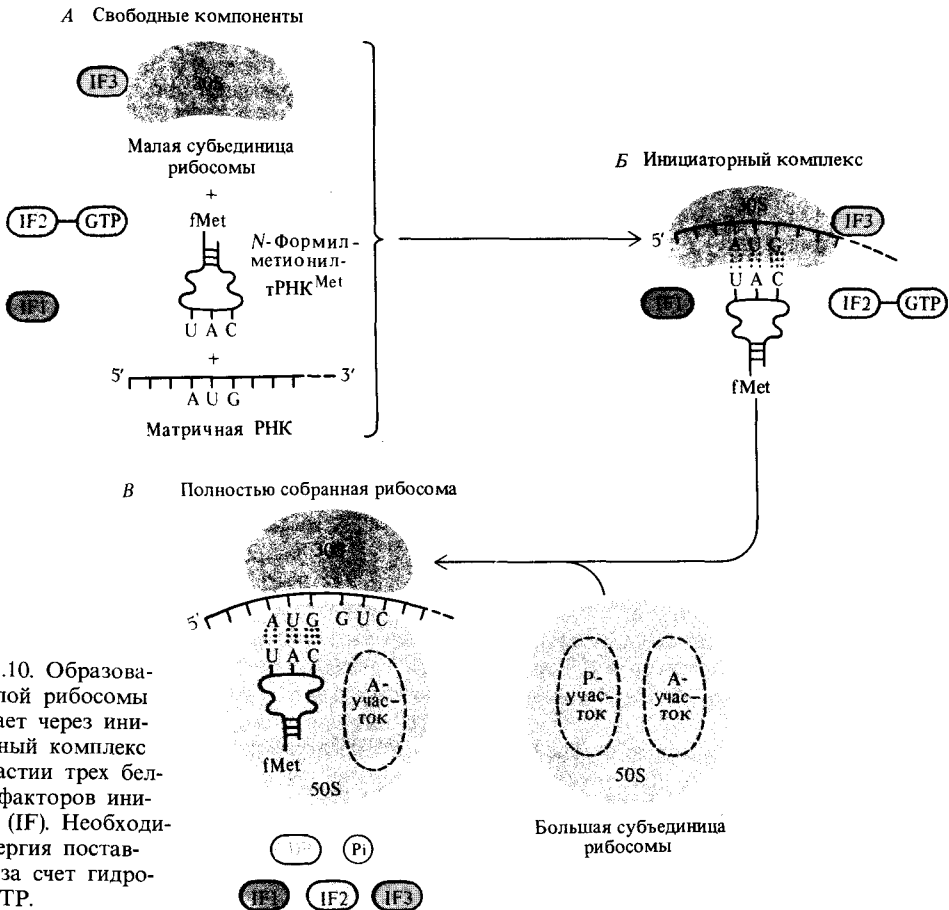


Рис. 11.10. Образование целой рибосомы протекает через инициаторный комплекс при участии трех белковых факторов инициации (IF). Необходимая энергия поставляется за счет гидролиза GTP.

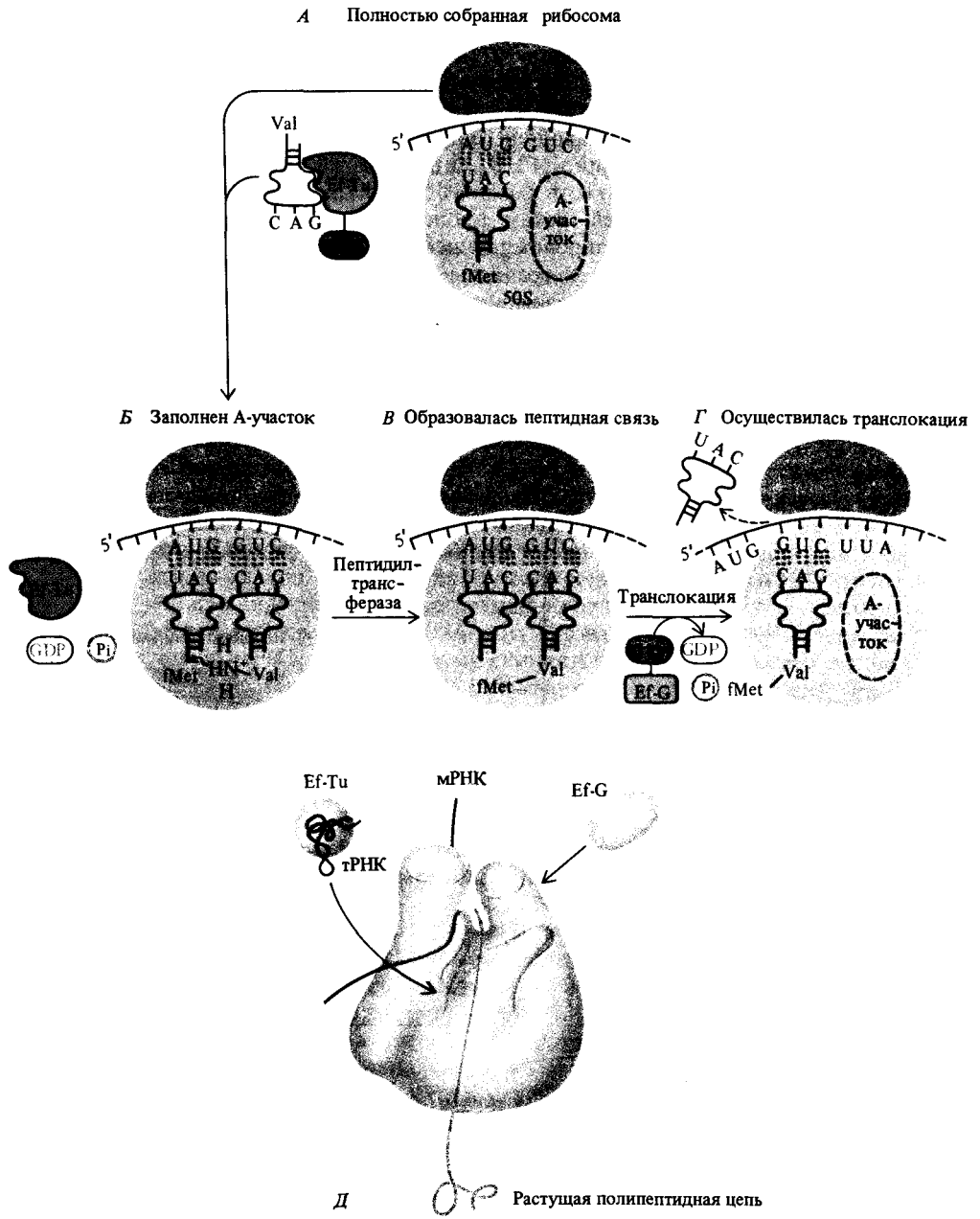


Рис. 11.11. А–Г. Циклический процесс образования пептидной связи. Д. Изображение рибосомы, связанной с мРНК, выполненное на основе данных электронной микроскопии высокого разрешения. Обратите внимание,

что растущая полипептидная цепь выходит через отверстие в большой субъединице рибосомы. (По Bernabeu C., Lake J. A. 1982. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 79, 3111.)

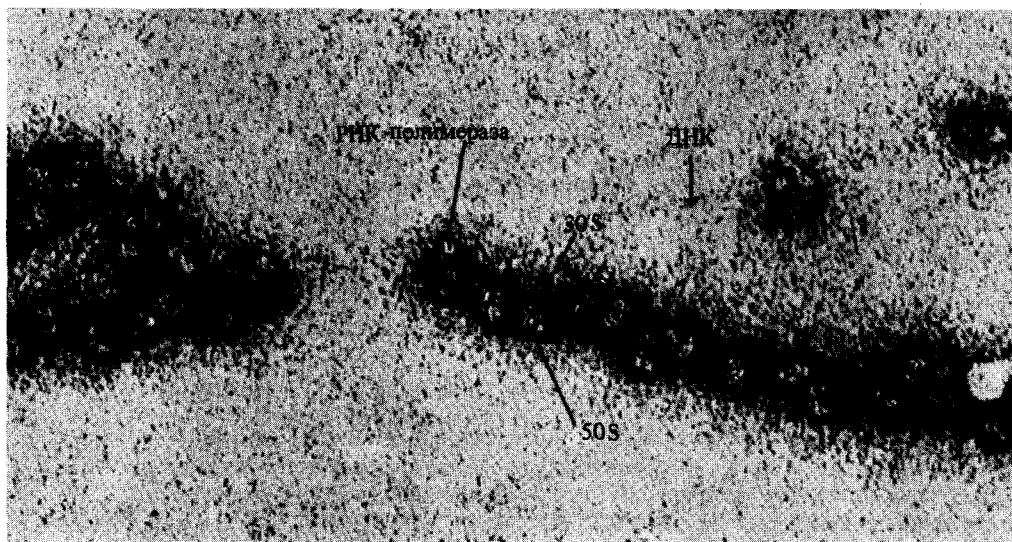


Рис. 11.12. Несколько 70S-рибосом *E. coli*, продвигающихся вдоль образующейся цепи мРНК (то есть в процессе синтеза самой мРНК) формируют так называемую полисо-

му. (Courtesy of Prof. Barbara Hamkalo, University of California, Irvine, and Prof. Oscar L. Miller, Jr., University of Virginia)

возникает за счет гидролиза связи N-формилметионина с тРНК_i^{Met}. В следующем этапе – транслокации – принимает участие фактор EF-G в комплексе с GTP, при этом происходит расщепление $GTP \rightarrow GDP + P_i$. Рибосома продвигается вдоль мРНК на расстояние, соответствующее одному кодону, таким образом, что пептидил-тРНК переходит в Р-участок, освобождая А-участок. После этого А-участок занимает следующая аминоацил-тРНК, несущая антикодон, соответствующий кодону мРНК, который на данном этапе находится рядом с этим участком. Транслокация сопровождается диссоциацией деацилированной тРНК_i^{Met} от рибосомы. Многократное повторение рассмотренного элементарного цикла, включающего пептидилтрансферазную реакцию и последующее передвижение рибосомы вдоль мРНК на один кодон, приводит к постепенному росту полипептидной цепи, аминокислотная последовательность которой обусловлена последовательностью кодонов в мРНК.

По мере того как одна рибосома продвигается вдоль мРНК, иницирующий участок цепи высвобождается, на нем происходит сборка следующего активного рибосомного комплекса и на той же матрице снова начинается синтез полипептида. При взаимодействии нескольких активных рибосом с единичной молекулой мРНК образуется *полирибосома* или *полисома* (рис. 11.12).

Полипептидный синтез по данной матрице продолжается до тех пор, пока в А-участке не окажется терминаторный кодон мРНК. Обычно терминация трансляции может задаваться тремя различными кодонами – UAA, UAG и UGA. Последовательность оснований в этих кодонах узнается специализированными белковыми факторами терминации. У *E. coli* имеются два таких белка – RF1 и RF2; первый узнает кодоны

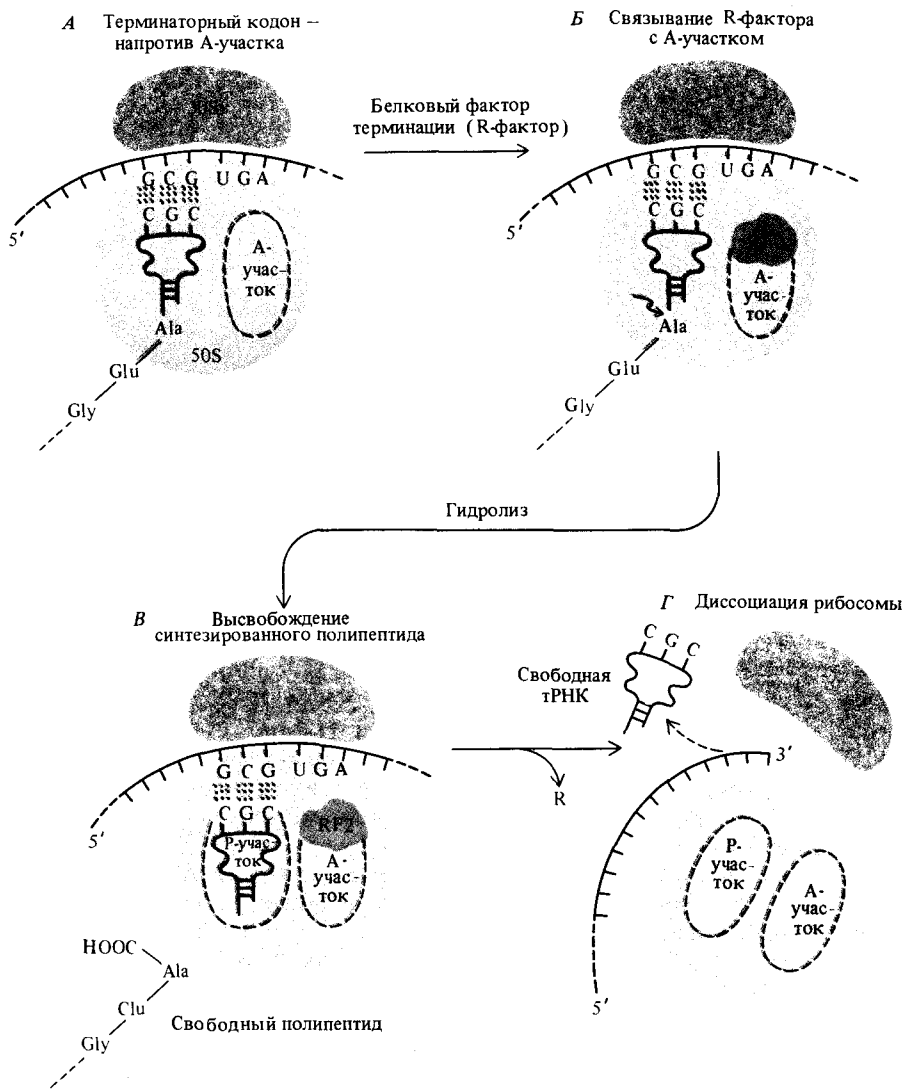


Рис. 11.13. Терминация синтеза полипептида происходит тогда, когда терминаторный кодон (в данном случае UGA) попадает в А-участок рибосомы и узнается белковым фактором терминации RF2.

UAA и UAG, а второй — кодоны UAA и UGA. У эукариот все три кодона узнает, по-видимому, один и тот же белок. Когда в А-участке оказывается терминаторный кодон, туда же подходит и терминирующий белок, который вынуждает пептидилтрансферазу сделать «холостой» шаг, в результате законченная полипептидная цепь высвобождается и отделяется от рибосомы (рис. 11.13). Рибосомные субъединицы в свою очередь диссоциируют, отделяются от мРНК и могут принять участие в синтезе следующей полипептидной цепи.

Точность полипептидного синтеза зависит от точности образования системы водородных связей между кодонами и антикодонами. До за-

мыкания очередной пептидной связи рибосомы подвергают по крайней мере однократной проверке правильность образования пары кодон – антикодон с тем, чтобы удостовериться, что произошло связывание правильной аминоксил-тРНК. Прямым свидетельством в пользу активной роли рибосом в контроле правильности кодон-антикодонного взаимодействия является существование мутаций, изменяющих рибосомные белки и таким образом влияющих на точность трансляции.

Специализированный перенос информации

Репликация РНК

Известны три вида процессов, в рамках которых осуществляется специализированный перенос информации (см. рис. 11.1). Один из них, перенос информации от РНК к РНК, удается зафиксировать только в клетках, зараженных вирусами, генетический материал которых представляет собой РНК. Это, например, вирус табачной мозаики (ВТМ) и многие другие вирусы растений, РНК-содержащие бактериофаги и некоторые вирусы животных, такие, как полиовирусы. Эти вирусные геномы РНК, одноцепочечные или двухцепочечные, обязательно несут гены, кодирующие специфические РНК-репликазы, т.е. ферменты, которые по РНК-матрице могут синтезировать комплементарные молекулы РНК. Эти молекулы в свою очередь могут служить матрицами для аналогичного синтеза копий родительских цепей РНК. Перенос генетической информации от РНК к РНК также основан на принципе комплементарности оснований в родительской и дочерней цепях РНК.

Обратная транскрипция

Другой вид специализированного переноса информации – от РНК к ДНК – имеет место (насколько известно) только в клетках животных, инфицированных вирусами определенного типа. До недавнего времени был известен только один тип вирусов, обладающих способностью к синтезу ДНК по РНК. Это особый тип РНК-содержащих вирусов, называемых ретровирусами. Сейчас стало известно, что еще один тип вирусов – ДНК-содержащий вирус гепатита В в своем развитии также использует перенос информации от РНК к ДНК.

Ретровирусы содержат молекулы одноцепочечной РНК, при этом каждая вирусная частица имеет две копии РНК-генома, т.е. вирусы этого типа являются единственной известной разновидностью диплоидных вирусов. Впервые они были обнаружены по способности вызывать образование опухолей у животных. Первый вирус этого типа был описан в 1911 г. Пейтоном Раусом, обнаружившим инфекционную саркому у кур. Вызывающий это заболевание вирус, названный вирусом саркомы Рауса (ВСР), послужил моделью для изучения не только опухолевых РНК-вирусов, но и других ретровирусов, не приводящих к возникновению опухолей. ВСР может инфицировать культивируемые *in vitro* куриные эмбриональные клетки и превращать их в клетки с измененными свойствами, характерными для опухолевых клеток. Изме-

ненные свойства этих клеток наследуются, т.е. передаются последующим поколениям вместе со способностью продуцировать инфекционные вирусные частицы. Эти свойства проявляются благодаря наличию в ДНК опухолевых клеток ДНК-копии (провируса) ретровирусного генома. Провирус реплицируется вместе с хозяйской ДНК и передается по наследству дочерним клеткам. Сейчас известно, что образование ДНК-провируса – это характерная особенность репликации любых ретровирусов, присущая не только опухолеродным вирусам. В действительности способность переносить рак для ретровирусов является свойством «благоприобретенным». Такого рода опухолевые РНК-вирусы несут естественным путем возникшие химерные геномы, в которых некий клеточный ген (онкоген) за счет рекомбинации встроился в провирусный геном и, будучи вырванным из своего естественного окружения, вышел из-под контроля регуляторных механизмов. В норме эти механизмы позволяют онкогену вызывать неограниченный рост клеток.

Ретровирусы кодируют и содержат в инфекционных частицах фермент, называемый *обратной транскриптазой*, который может использо-

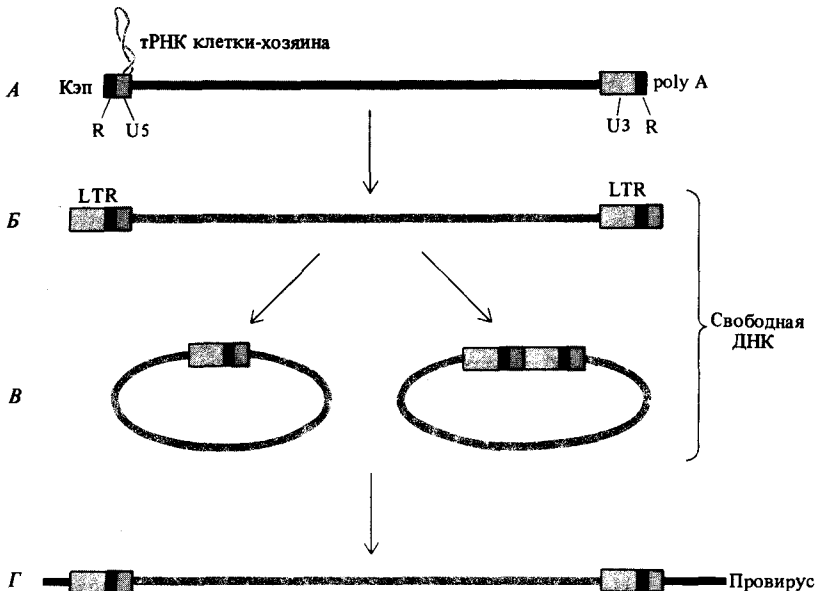


Рис. 11.14. Обратная транскрипция и интеграция ДНК-копии ретровирусного генома в хромосому. А. Структура ретровирусного одноцепочечного РНК-генома. Как и в случае клеточных мРНК, на 5'-конце вирусной РНК находится «кэп», 3'-конец полиаденилирован. Повторы нуклеотидной последовательности, расположенные на концах генома, отмечены символом R. Две уникальные нуклеотидные последовательности, расположенные у 5'- и 3'-конца РНК (U5 и U3 соответственно), при образовании двухцепочечной ДНК-копии, которое направляется обратной транскриптазой, объединяются

и формируют длинные концевые повторы (LTR). Хозяйская молекула тРНК, связанная водородными связями с граничной областью участка U5 РНК-генома, выступает в роли затравки для действия обратной транскриптазы. Б. Двухцепочечная молекула ДНК, образуемая при действии обратной транскриптазы. В. Возможные промежуточные структуры, образование которых постулируется для интерпретации процесса интеграции ретровирусной ДНК в хозяйскую хромосому. Г. Интегрированный провирус.

вать одноцепочечную вирусную РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной ДНК-цепи. Эта цепь в свою очередь служит матрицей для направляемого также обратной транскриптазой синтеза еще одной комплементарной ДНК-цепи и образования двухспиральной молекулы ДНК, содержащей ту же генетическую информацию, что и вирусная РНК. Возникшая таким образом двухцепочечная ДНК может встроиться в хромосомную ДНК хозяйской клетки с образованием провируса. Механизм такой интеграции, по-видимому, аналогичен механизму интеграции бактериофага λ в бактериальную хромосому (рис. 11.14).

Будучи встроенным в хромосому, провирус передается дочерним клеткам, поскольку реплицируется вместе с хозяйской ДНК, и за счет этого дочерние клетки также трансформируются в раковые. Пролиферация раковых клеток приводит к возникновению опухоли. Транскрипция провирусной ДНК выражается в образовании как мРНК, трансляция которых обеспечивает наработку вирус-специфических белков, включая и обратную транскриптазу, так и геномных РНК-цепей, которые одеваются в оболочку и формируют новые инфекционные вирусные частицы. Последние выходят из клетки, при этом трансформированная клетка не погибает.

Ретровирусы оказались очень полезным инструментом современных генно-инженерных исследований. Они служат источником для получения практически чистой обратной транскриптазы – фермента, играющего важнейшую роль в многочисленных работах, основанных на клонировании эукариотических генов (см. гл. 9). Так, очищенную индивидуальную мРНК, кодирующую интересующий нас белок, как правило, выделить гораздо легче, чем фрагмент ДНК генома, кодирующий тот же белок. Затем с помощью обратной транскриптазы можно получить ДНК-копию этой мРНК и встроить ее в подходящую плазмиду для клонирования и наработки значительных количеств нужной ДНК. В дальнейшем мы еще вернемся к обсуждению этих методических подходов.

Трансляция ДНК

Третий вид специализированного переноса информации от ДНК непосредственно к белку наблюдался только в лаборатории *in vitro*. Некоторые антибиотики, такие, как стрептомицин и неомицин, взаимодействующие с рибосомами, могут так изменять их свойства, что вместо мРНК рибосомы в качестве матрицы для трансляции начинают использовать одноцепочечную ДНК. Таким образом последовательность оснований в одноцепочечной ДНК непосредственно переводится в аминокислотную последовательность синтезируемого полипептида. Перенос этого типа вряд ли имеет место в природе.

Запрещенные (неизвестные) варианты переноса информации

Под переносом генетической информации от белка к ДНК или РНК следовало бы подразумевать процесс перевода аминокислотной последовательности в определенную нуклеотидную последовательность ДНК

или РНК. Для осуществления этого процесса потребовался бы переход от 20-буквенного алфавита к 4-буквенному, который, если бы и был возможен, то только с использованием не менее сложного трансляционного аппарата, чем тот, что переводит информацию, закодированную в мРНК, в структуру соответствующих белков. Мы не располагаем никакими экспериментальными данными, которые позволили бы предположить существование такого аппарата. Соответственно процессы переноса информации от белка к ДНК или РНК никогда не наблюдались и, по-видимому, в действительности не происходят.

Третий запрещенный вид переноса информации от белка к белку (от аминокислотной последовательности к аминокислотной последовательности) также никогда не был зарегистрирован. Нет никаких оснований полагать, что белки в принципе способны к репликации. Способность к самовоспроизведению, очевидно, присуща исключительно нуклеиновым кислотам.

Коллинеарность генов и полипептидов (прокариоты)

Представление о коллинеарности генов и полипептидов логически вытекает из основной гипотезы, согласно которой наследственная информация кодируется линейной последовательностью оснований в ДНК и выражается в виде линейных последовательностей аминокислот в полипептидах. Соотношение коллинеарности представляется естественным отражением того, что и ДНК, и белки являются линейными полимерами. Однако лишь прямое подтверждение того, что гены и полипептиды действительно коллинеарны, полученное в 1964 г., явилось окончательным разрешением более чем десятилетней дискуссии, основанной на более или менее правдоподобных гипотезах.

Триптофансинтаза *E. coli* состоит из двух полипептидных цепей А и В, кодируемых генами *trp A*⁺ и *trp B*⁺. Многочисленные мутации, лишаящие активности триптофансинтазу, были картированы в гене *trp A*. Используя методы, описанные в главе 8, эти мутации можно расположить по порядку на линейной генетической карте. Удалось определить аминокислотную последовательность А-цепи нормальной триптофансинтазы (рис. 11.15) и нескольких неактивных вариантов фермента, продуцируемых набором штаммов, содержащих мутантные гены *trp A*. Оказалось, что каждая из этих мутаций обуславливает замену одной или нескольких аминокислот в А-цепи дикого типа. Относительное расположение всех этих аминокислотных замен и соответствующих мутаций, локализованных на генетической карте, показано на рис. 11.16. В этом случае налицо полное соответствие между генетической картой мутаций и расположением измененных аминокислот в молекуле белка. Например, мутация *trp A3*, обуславливающая замену Glu → Val в положении 49 от N-конца полипептида, картируется левее мутантного локуса *trp A446*, изменяющего аминокислоту в положении 175 (Tyr → Cys). Мутация же *trp A446* в свою очередь картируется левее мутации *trp A58*, изменяющей аминокислоту в положении 234 (Gly → Asp), и так далее.

Заметим, что в положении 234 возможны две аминокислотные замены: мутация *trp A58* обуславливает замещение Gly → Asp, а

1 10 20
 Met-Gln-Arg-Tyr-Glu-Ser-Leu-Phe-Ala-Gln-Leu-Lys-Glu-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Phe-Val-

21 30 40
 Pro-Phe-Val-Thr-Leu-Gly-Asp-Pro-Gly-Ile-Glu-Gln-Ser-Leu-Lys-Ile-Ile-Asp-Thr-Leu-

41 50 60
 Ile-Glu-Ala-Gly-Ala-Asp-Ala-Leu-Glu-Leu-Gly-Ile-Pro-Phe-Ser-Asp-Pro-Leu-Ala-Asp-

61 70 80
 Gly-Pro-Thr-Ile-Gln-Asn-Ala-Thr-Leu-Arg-Ala-Phe-Ala-Ala-Gly-Val-Thr-Pro-Ala-Gln-

81 90 100
 Cys-Phe-Glu-Met-Leu-Ala-Leu-Ile-Arg-Gln-Lys-His-Pro-Thr-Ile-Pro-Ile-Gly-Leu-Leu-

101 110 120
 Met-Tyr-Ala-Asn-Leu-Val-Phe-Asn-Lys-Gly-Ile-Asp-Glu-Phe-Tyr-Ala-Gln-Cys-Glu-Lys-

121 130 140
 Val-Gly-Val-Asp-Ser-Val-Leu-Val-Ala-Asp-Val-Pro-Val-Gln-Glu-Ser-Ala-Pro-Phe-Arg-

141 150 160
 Gln-Ala-Ala-Leu-Arg-His-Asn-Val-Ala-Pro-Ile-Phe-Ile-Cys-Pro-Pro-Asn-Ala-Asp-Asp-

161 170 180
 Asp-Leu-Leu-Arg-Gln-Ile-Ala-Ser-Tyr-Gly-Arg-Gly-Tyr-Thr-Tyr-Leu-Leu-Ser-Arg-Ala-

181 190 200
 Gly-Val-Thr-Gly-Ala-Glu-Asn-Arg-Ala-Ala-Leu-Pro-Leu-Asn-His-Leu-Val-Ala-Lys-Leu-

201 210 220
 Lys-Glu-Tyr-Asn-Ala-Ala-Pro-Pro-Leu-Gln-Gly-Phe-Gly-Ile-Ser-Ala-Pro-Asp-Gln-Val-

221 230 240
 Lys-Ala-Ala-Ile-Asp-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Ile-Ser-Gly-Ser-Ala-Ile-Val-Lys-Ile-

241 250 260
 Ile-Glu-Gln-His-Asn-Ile-Glu-Pro-Glu-Lys-Met-Leu-Ala-Ala-Leu-Lys-Val-Phe-Val-Gln-

261 268
 Pro-Met-Lys-Ala-Ala-Thr-Arg-Ser

Рис. 11.15. Аминокислотная последовательность А-цепи триптофансинтазы *E. coli*.

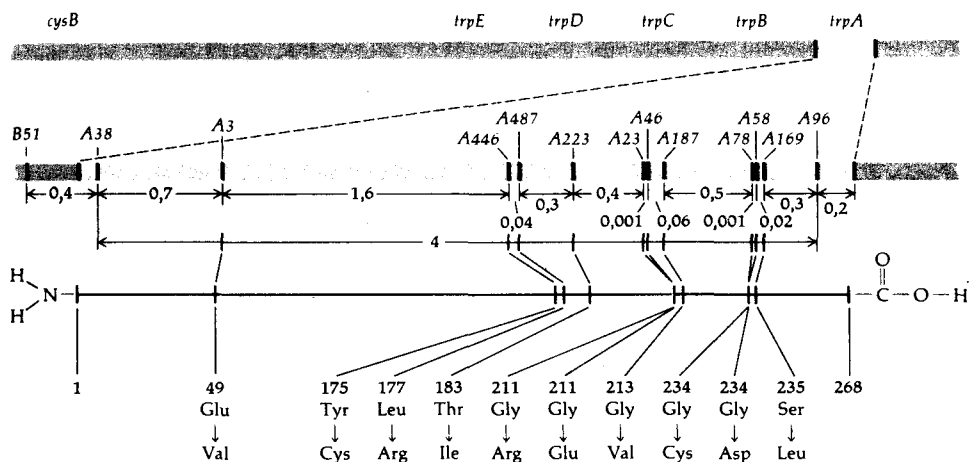


Рис. 11.16. Соответствие генетической карты гена *trpA* и расположения аминокислотных замен в α -цепи триптофансинтазы *E. coli*. (По Yanofsky C. 1967. Scientific American, May, p. 80.)

trp A78–Gly \rightarrow Cys. При рекомбинации этих мутаций активность белка восстанавливается, следовательно, они должны локализоваться в различных участках одного и того же кодона. С помощью таблицы генетического кода (табл. 12.1) можно убедиться в том, что эти мутации затрагивают соседние нуклеотиды в одном и том же кодоне. Это свидетельствует о том, что рекомбинация ДНК может происходить и между соседними нуклеотидными парами. Дополнительное подтверждение этому выводу дает и сопоставление двух мутаций, затрагивающих аминокислотный остаток 211: *trp* A23 (Gly \rightarrow Arg) и *trp* A46 (Gly \rightarrow Glu). Эти мутации также подвержены рекомбинации друг с другом, при этом восстанавливается исходная активность фермента дикого типа и, по всей видимости, исходная нуклеотидная последовательность.

Аналогичным образом коллинеарность генетической карты и соответствующего полипептида была продемонстрирована для гена белка головки фага T4 (обсуждается в гл. 12) и гена *lac Z*⁺, кодирующего β -галактозидазу *E. coli*. Убедиться в коллинеарности нуклеотидной и соответствующих аминокислотных последовательностей можно, сопоставив нуклеотидную последовательность ДНК фага фX174 (гл. 12) с белками фX174, для которых известна аминокислотная последовательность. Зная генетический код (см. табл. 12.1), можно прямо по нуклеотидной последовательности ДНК читать аминокислотные последовательности соответствующих белков.

На полученных с помощью электронного микроскопа фотографиях разрушенных клеток *E. coli* можно видеть, что транскрипция, осуществляемая РНК-полимеразой, непосредственно сопровождается трансляцией образующейся мРНК (рис. 11.12). Видно, как на синтезируемой цепи мРНК прямо по пятам за РНК-полимеразой, транскрибирующей ДНК, следуют рибосомы, осуществляющие синтез белка. РНК считывается в направлении 5'–3' (точка роста находится на 3'-ОН-конце цепи), поэтому инициация трансляции рибосомами может осуществляться на 5'-конце растущей цепи. Та рибосомная частица, которая первой начала

трансляцию матрицы, изображенной на рис. 11.12, должна находиться ближе всех к месту расположения РНК-полимеразы. Анализ микрофотографий дополнительно подтверждает сделанные на основании более строгих экспериментов выводы о коллинеарности последовательностей в генах и соответствующих полипептидах.

Коллинеарность генов и полипептидов (эукариоты)

Разработанные сравнительно недавно методы работы с рекомбинантными ДНК (обсуждаемые в гл. 9) позволили сравнить нуклеотидные последовательности индивидуальных мРНК, кодирующих некоторые известные эукариотические белки, с соответствующими фрагментами последовательностей в хромосомной ДНК. Благодаря использованию этих методов в 1977 г. было сделано сенсационное открытие. Оказалось, что внутри кодирующих областей некоторых эукариотических генов содержатся нетранслируемые фрагменты последовательности. Так, некодирующие внутренние нуклеотидные последовательности были обнаружены в структурных генах β -цепей кроличьих и мышинных гемоглобинов, легких цепей иммуноглобулинов и куриного овальбумина (основного компонента яичного белка). На сегодняшний день ясно, что наличие внутренних некодирующих последовательностей является типичным, хотя и не обязательным свойством эукариотических генов. На карте структурной организации гена овальбумина (рис. 11.17) показано, как семь протяженных внутренних некодирующих участков последовательности (*интронов*) разделяют смысловую последовательность, кодирующую зрелую мРНК, на восемь фрагментов (*экзонов*).

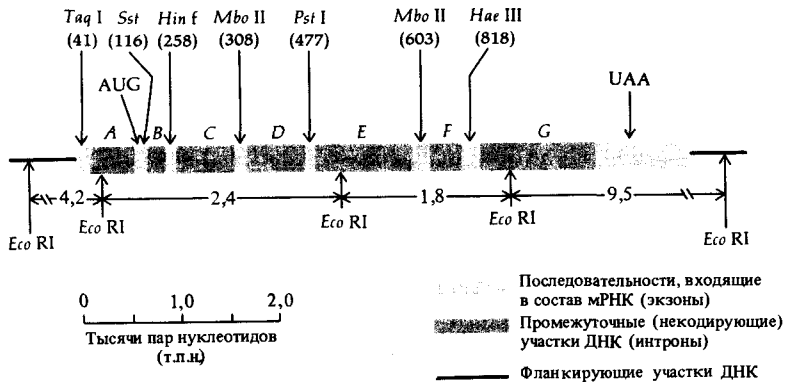


Рис. 11.17. Карта структурной организации гена куриного овальбумина с указанием участков, входящих в состав зрелой мРНК, и разделяющих их некодирующих участков последовательности ДНК. Каждый из пространственно разделенных коди-

рующих участков ДНК может быть идентифицирован по наличию сайта узнавания для одной из рестриктаз. Помечено положение инициаторного (AUG) и терминаторного (UAA) кодонов. (По *Dugaiczky A. et al*, 1978, *Nature* **274**, 328.)

ACAUACAGCUAGAAAGCUUGUUAUUGCCUUUAGCAGUC AAGCUCGAAAGACAACUCAGAGUUCACCAUUGGGCCUCCAUCCGGGUCAGCAAGCAUUGAAUUUUUUUGUUAUUAUUAAGGACCU
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

K V H H A N E N I F Y C P I A I M S A L A M V Y L G A K D S T R T Q I N K V V R
 CAAAUGCACCAUGCCAAUGAGAACAUUCUUCUGCCCAUUGGCCAUAGUCAGCUCUAGCCAUUGUAUCCUGGGUUGCAAAAGACAGCCACAGGACACAAUAAAUAAGGUUUGUCG
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

F D K L P G F G D S I E A Q C G T S V N V H S S L R D I L N Q I T K P N D V Y S
 CUUGUAUAAACUCCGAAUUCGGAGACAGUAUUGAAGCUCAGUGGCCAUUCUGUAUAGCCUUCACUUAAGAGACUCCUCAACCAAAUACCAACAAACAAUUGUUAUUC
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

P S L A S R L Y A E E R Y P I L P E Y L Q C V K E L Y R G G L E P I N F O T A A
 GUUCAGCCUUGCCAGUAGACUUUAUCUGAAGAGAGAUACCCAAUCCUGCCAGAAUACUUCGACAGUGUGUAGGAAACUGUAUAGAGGAGGCCUUGGAAACCUUAUACUACUUCUAAACAGCUGC
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480

D Q A R E L I N S W V E S Q T N G I I R N V L Q P S S V D S Q T A M V L V N A I
 AGAUCAAAGCAGAGAGCUACAUAUCCUGGGUAGAAAGCAGACAAUUGGAAUUAUCAGAAAUGCCUUCAGCCAGUUCGUGGAUUCUCAAACUGCAAAUGGUUUGUUAUUGCCUA
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

V F K G L W E K A F K D E D T Q A M P P R V T E Q E S K P V Q M H Y Q I G L F R
 UGUCUCAAAGCAGUGGGAGAAAGCAUUUAAGGAUGAAGACACACAAGCAUUGCCUUUCAGAGUGACUGAGCAAGAAACCAACCUUGUUGCAGUAGUAGUACCCAGAUUGGUUUUAUUUUG
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

V A S M A S E K M K I L E L P F A S G T M S M L V L L P D E V S G L E Q L E S I
 AGUGGCAUCAUUGCCUUCUGAGAAAUGAAGAUCUGGAGCCUUCUUAUUGCCAGUGGGCAUUGAGCAUUGUUGGUCUUGUUGCCUGAUGAGUAGUACUACGCCUUAGGACCGUUGAGAGUUA
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840

I N F E K L T E W T S S N V M E E R K I K V Y L P R M K M E E K Y N L T S V L M
 AAUCAAUUGUAAAAACUGAGUAAUGGACAGUUCUUAUGUUAUGGAGAGAGGAAACAUAAGUUAUUCUACUCCUGCCAGUAGAGUAGGAGGAAAUAACAUCACAUUCUGUUAUUA
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960

A M G I T D V F S S S A N L S G I S S A E S L K I S Q A V H A A H A E I N E A G
 GGUUAUGGCAUUAUCUGACUGUUAUUGUUCUUCAGCAAUUCUGUCUGGCAUUCUCCUACAGCAGAGAGCCUGAAGAUAUUCUAAAGCUGUCCUAGCAGCAGAAUUAUGAAGCAGG
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

R E V V G S A E A G V D A A S V S E E F R A D H P F L F C I K H I A T N A V L F
 CAGAGGGUUGUAGGGUACAGAGAGGUGGAGUGGUCUGCAAGCGUCUCUGAAGAAUUUAGGGCUGAACCAUUCUUCUUGUUAUCAAAGCAGACUCCGCAACCAACCGUUGUUCUUA
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

F G R C V S P *
 CUUUGGCAGUUGUUAUCCUUAAAAAGAAAGCUGAAAAACUUCUGUCCUUCCAACAAGACCAGAGCAGUUAUUAUUCAGGGGUA AAAUGAAAAGUAUGUUAUCUGUCCUACCA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320

GACUUAUAAAAAGCUGGAGCUUUAUUCUAGAAAAAAUUCAGAAAAGAAUUAACACUGUGAGAACAGGUGCAAUUCACUUUUUCUUUAACAGAGUAAUUCUGGUAACUCAUGGAUUGAAGGC
 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

UUAAGGGAAUGAAAUGGACUCACAGUAUCAGUACUACACUGAAAAUGCAACCUAGUACUACAGCAGAGAGUUUAUGGGGAAAAUUGCAGCCUUCCAAUUAAGCCAGUAUUCUGUA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560

UGACCAAGCUGCUCAGAAUUAUGACUACUAAAAUUCUCAGAUUAUUAUUAUCAACUGUCACCAACCAUUCUUAUGCUGAACAGCAAUUGCUGUUCUUGUGUUCUGUAUACUAAAGG
 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

CUCUUCUACUUCUUAAGAUGCAUUAUAAAAUUCUUAUAUUAUCAUUCUCCUUAACUUUUGACUCAAUCUUGGUAUGUUGGCAAAUUAUGGUAUUAUUAUUCUAAAUGUUAUCU
 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

UGUACCCAUAUGUAAUGGGUCUUGUGAAUGGUCUUCUUUUGUCCUUUAUCAUUAUAAAAACAUGUUAAGC
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870

Рис. 11.18. Последовательность куриной овальбуминовой мРНК. Остатки 13–1872 присутствовали в ДНК плазмиды рOV 230; остатки 1–12 и 1731–1872 были определены непосредственно по последовательности мРНК. Звездочкой помечен овальбуминовый терминаторный кодон. Зрелый овальбумин [в структуре которого отсутствует N-концевой (инициаторный) метионин] имеет сле-

дующий аминокислотный состав: Ala (A) 35, Arg (R) 15, Asn (N) 17, Asp (D) 14, Cys (C) 6, Gln (Q) 15, Glu (E) 33, Gly (G) 19, His (H) 7, Ile (I) 25, Leu (L) 32, Lys (K) 20, Met (M) 16, Phe (F) 20, Pro (P) 14, Ser (S) 38, Thr (T) 15, Trp (W) 3, Tyr (Y) 10, Val (V) 31. Всего 385 остатков. (Modified courtesy of J. F. Catterall and B. W. O'Malley, from L. Mc. Reynolds et al., Nature 273, 723, 1978.)

Вкратце рассмотрим те методы, которые позволяют получить изображенную на рис. 11.17 картину структурной организации гена. Сначала из полисом клеток куриного яйцевода, в котором овальбумин является основным синтезируемым белком, выделяют овальбуминовую мРНК, которая содержится там в значительном количестве копий. Эта

Таблица 11.1. Известные сайты узнавания для рестриктаз в последовательности плазмиды рOV230, несущей встроенную овальбуминовую кДНК (остатки 13–1872 на рис. 11.18)

Фермент ¹⁾	Номера остатков ²⁾	Узнаваемые последовательности
<i>Pst</i> I	477	CTGCA/G
<i>Hae</i> III	818	GG/CC
<i>Hin</i> II	258, 566, 1458, 1732	G/ANTC
<i>Hga</i> I	1125	GCGTC
<i>Hph</i> I	60, 336, 1605	TCACC
<i>Alu</i> I	15, 38, 117, 175, 277, 475, 495, 557, 759, 828, 986, 1042, 1235, 1332, 1338, 1554	AG/CT
<i>Mbo</i> II	147, 308, 389, 603, 638, 748, 887, 895, 922, 989, 1030, 1133, 1161, 1197, 1229, 1669	GAAGA или TCTTC
<i>Eco</i> RII	193, 213, 254, 507, 754	/CC(A) (T)GG
<i>Mbo</i> I	482, 751, 898	/GATC
<i>Tag</i> I	41	T/CGA
<i>Xba</i> I	1345	T/CTAGA
<i>Sst</i> I	116, 494	GAGCT/C
<i>Pvu</i> II	474	CAG/CTG
<i>Asu</i> I	867	G/GACC
<i>Mn</i> II	325, 444, 447, 892, 914, 929, 943, 1014, 1085, 1103, 1159	CCTG или GAGG

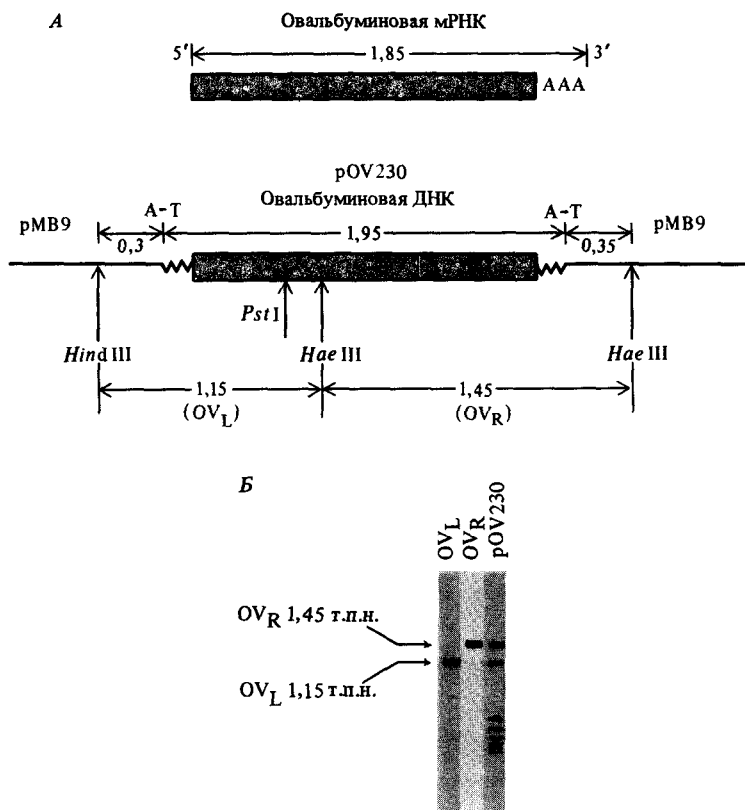
¹⁾ Отсутствуют сайты узнавания для рестриктаз *Hae*II, *Hind*II, *Hind*III, *Hha*I, *Hpa*II, *Eco*RI, *Ava*I, *Bam*I, *Bal*I, *Bgl*II, *Sma*I, *Xho*I и *Sal*I.

²⁾ Приведены номера, соответствующие положению первого (5'-) нуклеотида в узнаваемой последовательности, а не точке расщепления. Для случаев, когда расщепление происходит внутри узнаваемой последовательности, положение соответствующей точки помечено косой чертой. (По *Mc Reynolds L. et. al.* 1978. *Nature*, 273, 723.)

мРНК состоит из 1872 нуклеотидов, что значительно больше, чем необходимо для кодирования аминокислотной последовательности овальбумина. Овальбуминовая мРНК содержит транскрируемый участок из 1158 нуклеотидов, заключенный между нетранскрируемыми фланкирующими 5'- и 3'-участками, а также некодирующий «хвост» poly A на 3'-конце. Двухспиральная ДНК-копия (кДНК) молекулы мРНК синтезируется *in vitro* с помощью обратной транскриптазы и после встраивания в подходящий плазмидный вектор клонируется в *E. coli*. Полученная таким образом рекомбинантная плаزمида рOV230 содержала в качестве вставки кДНК, соответствующую остаткам 13–1872 исходной мРНК. Была определена нуклеотидная последовательность кДНК-фрагмента гибридной плазмиды и составлена карта расположения на ней сайтов узнавания ферментами рестрикции. Соответствующая последовательность мРНК, выведенная из последовательности кДНК, показана на рис. 11.18, а список сайтов расщепления кДНК рестриктазами приведен в таблице 11.1. Здесь существенно отметить, что в овальбуминовой кДНК отсутствуют сайты узнавания для рестриктаз *Eco*RI и *Hind*III и имеется один сайт расщепления *Hae*III по остатку 818.

После расщепления очищенной плазмиды рOV230 рестриктазами *Hind*III и *Hae*III кДНК можно отделить от плазмидной ДНК в виде

Рис. 11.19. А. Рестрикционная карта участка плазмиды pOV 230, содержащего овалбуминовую кДНК, и сопоставление с овалбуминовой мРНК. Б. Полученные при расщеплении рестриктазами *Hind* III и *Hae* III фрагменты OV_L и OV_R могут быть очищены с помощью электрофореза в агарозном геле. Векторная часть плазмидной ДНК (pMB9) при этом расщепляется на много мелких фрагментов, мигрирующих гораздо быстрее, чем OV_L и OV_R . После извлечения из агарозного геля фрагменты OV_L и OV_R могут быть получены в чистом виде. (По Lai E. et al. 1978. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 2205.)



двух фрагментов, содержащих 1150 и 1450 нуклеотидов (рис. 11.19). Меньший фрагмент содержит кДНК, соответствующую 5'-концевому участку, а больший фрагмент — 3'-концевому участку мРНК. С помощью ник-трансляции, используя ДНК-полимеразу I *E. coli* (см. гл. 13) и α - 32 P-дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, в каждый из этих фрагментов можно ввести радиоактивную метку *in vitro*. Помеченные таким образом до очень высокой удельной активности фрагменты кДНК можно нагреванием перевести в одноцепочечную форму и использовать в качестве зондов для идентификации комплементарных фрагментов, содержащихся в денатурированной суммарной ДНК куриного генома.

Поскольку кДНК, полученная по овалбуминовой мРНК, не содержит *Eco* RI-сайтов, то можно было бы ожидать, что при расщеплении тотальной куриной ДНК рестриктазой *Eco* RI образуется только один фрагмент ДНК, содержащий последовательность, комплементарную кДНК (в куриной ДНК имеется множество сайтов для *Eco* RI, так что какие-то два из них наверняка окажутся по каждую сторону овалбуминового гена). Такой фрагмент может быть идентифицирован с помощью гель-электрофоретического разделения по размеру фрагментов куриной геномной ДНК, расщепленной *Eco* RI, денатурации фрагментов и последующей гибридизации с денатурированным меченым кДНК-зондом (рис. 11.20). Осуществление такого эксперимента дало весьма неожиданные результаты. Оказалось, что не один, а четыре фрагмента различной длины содержат последовательности, комплементарные тому

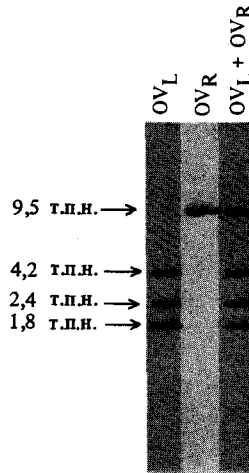


Рис. 11.20. Изображение радиоавтограммы, полученной после расщепления суммарной куриной ДНК рестриктазой *EcoRI*, электрофоретического разделения в агарозном геле, переноса по Саузерну и гибридиза-

ции с радиоактивными зондами, полученными на основе фрагментов OV_L и OV_R по отдельности и в смеси. (По *Lai E. et al.* 1978. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 2205.)

или иному из двух кДНК-зондов (рис. 11.20). Это может означать только то, что в истинный овальбуминовый ген входят участки последовательности, содержащие сайты узнавания для *EcoRI*, которые не включаются в последовательность мРНК. Эти четыре *EcoRI*-фрагмента отмечены на карте (рис. 11.17), построенной на основе серии аналогичных экспериментов с использованием набора различных рестриктаз для расщепления и сопоставления куриной геномной ДНК и овальбуминовой кДНК.

До того как было открыто существование интронов, процесс образования цитоплазматических мРНК представлялся достаточно неясным. Биохимические исследования ядерной РНК показали, что в ее состав входят молекулы значительно большего размера, чем молекулы цитоплазматических мРНК. РНК этого типа называется *гетерогенной ядерной РНК* (гяРНК). Было обнаружено, что большая часть гяРНК не попадает в цитоплазму, а подвергается деградации до нуклеотидов непосредственно в ядре. С помощью биохимических методов не удалось установить, синтезируются ли в ядре молекулы мРНК в том виде, в котором они обнаруживаются в цитоплазме. Можно было предположить, что в ядре их не удастся обнаружить просто из-за большого избытка гяРНК. В то же время представлялось весьма вероятным, что мРНК синтезируется в виде предшественников, входящих в состав гяРНК, а образование зрелых мРНК является результатом нуклеазного процессинга при выходе в цитоплазму. Решение проблемы было найдено благодаря тому, что были обнаружены внутренние некодирующие последовательности, входящие в состав некоторых структурных генов.

Размер транскриптов гена овальбумина, которые содержатся в ядрах клеток яйцевода, удалось определить с использованием высокорadioактивных кДНК-зондов, полученных по овальбуминовой мРНК так, как

это было описано выше. С помощью радиоактивных зондов, комплементарных последовательностям интронов, было установлено, что эти участки последовательности транскрибируются и входят в состав высокомолекулярных ядерных РНК. Следовательно, образованию зрелой цитоплазматической мРНК должно предшествовать удаление интронов из последовательности гяРНК-транскрипта (этот процесс называется *сплайсингом* от англ. *to splice* – сплетать, сращивать). Как уже упоминалось, кодирующие участки структурных генов (и соответствующих гяРНК) принято называть *экзонами* (экспрессирующиеся участки гена), а встроенные внутрь кодирующей последовательности некодирующие участки структурных генов (и соответствующих гяРНК) – *интронами* (от англ. *intervening* – промежуточный). Эксперимент, подтверждающий присутствие интронов в гяРНК-транскриптах и их отсутствие в соответствующих мРНК на примере мышинного β -глобинового гена, проиллюстрирован на рис. 11.21.

Различия в структурной организации прокариотических и эукариотических генов и их первичных транскриптов отражают принципиальные различия в организации этих двух типов клеточных структур. Наличие ядерной мембраны, как отличительная особенность эукариотических клеток, предоставляет возможность пространственно разделить процессы транскрипции ДНК в ядре и трансляции мРНК в цитоплазме, что в свою очередь позволяет перед трансляцией осуществлять процессинг первичных транскриптов. В то же время у прокариот трансляция и транскрипция, как правило, тесно связаны (см. рис. 11.12).

Как можно представить себе эволюционное происхождение этих фундаментальных различий? Не исключено, что генетическая структура современных эукариот отражает наиболее древнюю структурную организацию, которая послужила также эволюционным предком и сегодняшних прокариотических организмов, например таких, как *E. coli*. Эволюция бактерий могла быть ответом на возникшие селективные условия, благоприятствовавшие быстрому росту и клеточному делению. Эволюционные преимущества в таких условиях могли оказаться достигнутыми благодаря слиянию ядра с цитоплазмой и сопряжению процессов транскрипции и трансляции. Это могло в конце концов привести и к выщеплению интронов, присутствие которых препятствовало бы правильной трансляции первичных транскриптов.

Характер организации генома митохондрий как у простейших эукариот, например грибов, так и у высших животных, включая человека, можно рассматривать как подтверждающий сформулированную выше гипотезу. Считается, что эволюционным предком митохондрий послужили бактерии – предшественники современных прокариот, – вступившие в симбиоз с эволюционным предшественником эукариотических клеток. В самом деле, для митохондриального генома грибов характерно наличие интронов, удаление которых происходит при сплайсинге первичных транскриптов непосредственно в митохондриях. Таким образом, структура митохондриального генома грибов в эволюционном отношении не столь далека от генетической организации, постулируемой для древнейших прокариот. С другой стороны, для митохондрий человека характерна очень компактная организация генома, в нем полностью отсутствуют интроны и удалены любые другие «несущественные» последовательности. Создается впечатление, что геном митохондрий эукариотических клеток, находящихся на высшей ступени эволюционного развития,

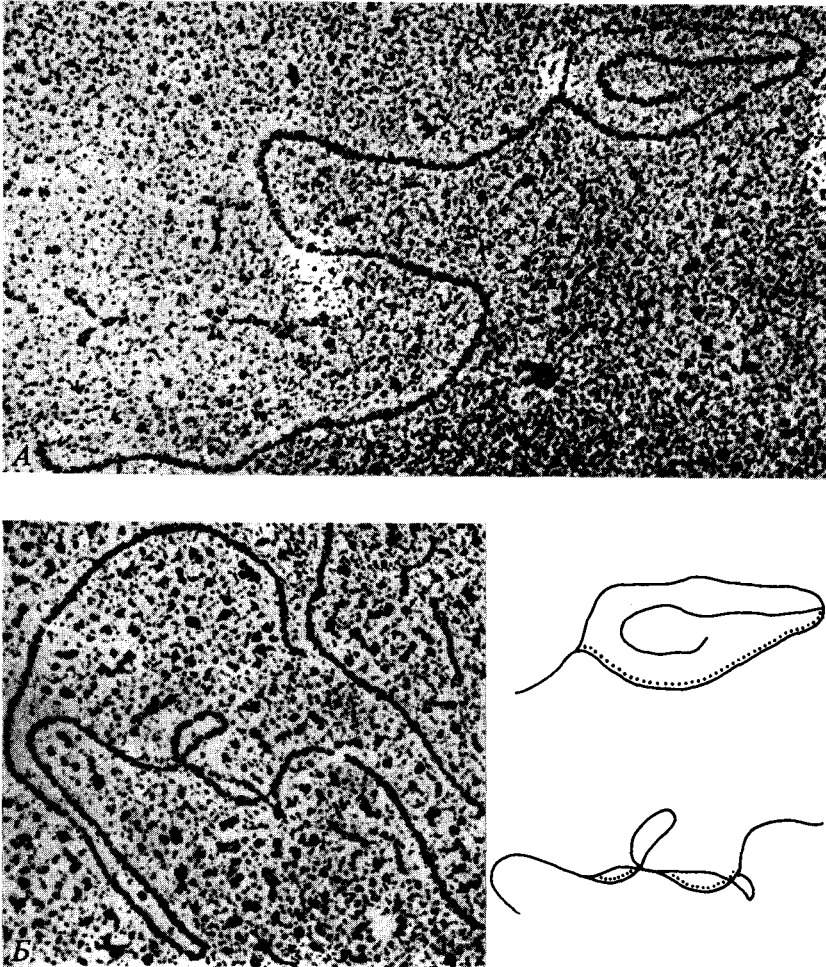


Рис. 11.21. Полученные с помощью электронного микроскопа фотографии структур типа R-петли, образующиеся при взаимодействии клонированного мышинного β -глобинового гена с 15S-глобиновой гяРНК (А) и 10S-глобиновой мРНК (Б). Видно, что β -глобиновый ген содержит промежуточный фрагмент последовательности ДНК длиной около 550 пар оснований, отсутствующий в комплементарной последовательности мРНК. Отсутствие соответствующей петли

на изображении А свидетельствует о том, что этот фрагмент входит в состав гяРНК-предшественника. Формирование R-петель происходит при инкубации двухцепочечной ДНК с комплементарной РНК в условиях, способствующих частичной денатурации ДНК. В этих условиях гетеродуплекс РНК—ДНК оказывается более прочным, чем двойная спираль ДНК. (По Tilghman S. M. et al. 1978. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1309.)

мог также подвергнуться значительно более существенным эволюционным модификациям. Если принять гипотезу происхождения митохондрий от древнейших прокариот, то следует признать, что организация генома, которая была присуща этим прокариотам, в определенном смысле ближе к организации генома современных эукариот, нежели современных прокариот.

Центральная догма

Подводя итоги, отметим, что центральная догма молекулярной биологии, сформулированная Криком, позволяет четко определить структуру взаимоотношений между информационными макромолекулами в биологических системах. Наследственная информация, закодированная в ДНК, передается молекулам РНК и затем через стадию трансляции выражается в структуре белковых молекул. В определенных условиях, например при инфекции некоторыми вирусами, этот общий для всех клеток путь переноса информации может несколько видоизмениться. Так, при вирусной инфекции информация может передаваться от молекул родительской РНК к дочерним молекулам РНК или от молекул РНК к ДНК. Наследственная информация, закодированная в нуклеотидной последовательности, переводится в аминокислотные последовательности белков. По всей вероятности, этот этап переноса информации, включающий стадию трансляции, не является обратимым. Белковые молекулы представляют своего рода «ловушку» в потоке генетической информации. Эволюционное развитие этой системы должно было завершиться на заре истории возникновения жизни на Земле. Вопрос о том, как конкретно могла протекать эта эволюция, дает прекрасную почву для различного рода теорий и гипотез. К сожалению, проверка какой-либо из таких гипотез сопряжена с необычайными трудностями.

Литература

- Dudaiczak A et al. (1978). The natural ovalbumin gene contains seven intervening sequences, *Nature*, **274**, 328–333.
- Gamper H. B., Hearst J. E. (1982). A topological model for transcription based on unwinding angle analysis of *E. coli* RNA polymerase binary, initiation and ternary complexes, *Cell*, **29**, 81–90.
- Greenblatt J., Li J. (1981). Interaction of the sigma factor and the *nusA* gene protein of *E. coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription, *Cell*, **24**, 421–428.
- Lai E. et al. (1978). The ovalbumin gene: structural sequences in native chicken DNA are not contiguous, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2205–2209.
- Losick R., Chamberlin M., eds., 1976. RNA polymerase, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Losick R., Pero J. (1981). Cascades of sigma factors, *Cell*, **25**, 582–584.
- McReynolds L. et al. (1978). Sequence of chicken ovalbumin mRNA, *Nature*, **273**, 723–728.
- Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., eds., 1974. Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- O'Farrell P. Z. et al. (1978). Structure and processing of yeast precursor tRNAs containing intervening sequences, *Nature*, **274**, 438–445.
- Platt T. (1981). Termination of transcription and its regulation in the, tryptophan operon of *E. coli*, *Cell*, **24**, 10–23.
- Summers J., Mason W. S. (1982). Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate, *Cell*, **29**, 403–415.
- Temin H. M. (1976). The DNA provirus hypothesis, *Science*, **192**, 1075–1080.
- Tilghman S. M. et al. (1978). The intervening sequence of a mouse beta-globin gene is transcribed within the 15S beta-globin mRNA precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1309–1313.
- Varmus H. E. (1982). Form and function of retroviral proviruses, *Science*, **216**, 812–820.
- Yanofsky C., Drapeau G. R., Guest J. R., Carlton B. C. (1964). On the colinearity of gene structure and protein structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 266–272.

Ключевые слова и понятия

Активация аминокислоты
 Аминоацил-тРНК
 Аминоацил-тРНК-синтетаза
 Антикодон
 Гетерогенная ядерная РНК (гяРНК)
 Интрон
 кДНК
 Кодон
 Колинеарность
 Матричная РНК (мРНК)
 Обратная транскриптаза
 Пептидилтрансфераза

Полисома
 Промотор
 Рибосома
 РНК-полимераза
 σ -Субъединица
 Терминатор
 Транскрипция
 Транскрипционная единица
 Трансляция
 Транспортная РНК (тРНК)
 Центральная догма
 Экзон

Задачи

11.1. При инкубации в соответствующих условиях чистой двухцепочечной ДНК с нуклеозидтрифосфатами в присутствии РНК-полимеразы *E. coli* происходит синтез РНК. Количество образовавшейся РНК измеряется по включению [^3H]-меченых нуклеозидтрифосфатов (третиевая метка вводится в азотистые

основания). Для определения количества трития, включившегося в РНК, ее осаждают кислотой, что позволяет отделить образовавшуюся РНК от избытка меченых нуклеозидтрифосфатов. Данные, приведенные в табл. 11.2, отражают относительные количества γ - ^{32}P -нуклеозидтрифосфатов, включившихся в РНК

Таблица 11.2. Включение γ - ^{32}P -нуклеозидтрифосфатов в РНК при транскрипции *in vitro* различных препаратов ДНК

ДНК	Синтез РНК (пикомоли) ¹⁾	Включение γ - ^{32}P -нуклеотидов (пикомоли)			
		АТФ	GTP	UTP	CTP
T2	4800	2,4	1,2	0,12	0,10
T5	4000	1,80	1,4	0,41	0,23
SP3	5480	1,25	1,0	0,39	0,12
<i>Clostridium perfringens</i>	2800	1,60	2,1	0,28	0,25
<i>Escherichia coli</i>	2660	0,43	1,4	0,13	0,10
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	2560	0,36	2,5	0,10	0,12
Тимус телянка	3560	0,77	1,3	0,33	0,18
Сополимер dAT	rAU = 7200	4,40	—	0,20	—
Гомополимер dG dC	rG = 1350 rC = 120	—	4,8	—	0,30

¹⁾ 1 пикомень = 10^{-12} моль. (По Maitra U., Hurwitz J. 1965. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 815.)

Таблица 11.3. Гибридизация [^3H]-РНК с РФ ДНК и одноцепочечной ДНК фага ϕ X174

РНК/ДНК	Время введения пульсовой метки (мин)	Образование РНК—ДНК-гибрида (имп/мин, распад [^3H])	
		РФ ДНК	Одноцепочечная ДНК из фаговых частиц ¹
	5–6,5	253	60
	35–36,5	3261	160
	50–51,5	3473	160

¹ Приведены предельные значения. (По Hayashi M. et al. 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50, 664.)

в идентичных условиях. Реакцию осуществляли каждый раз таким образом, что только один из четырех нуклеотидов содержал ^{32}P -метку в γ -положении трифосфатного остатка. Определить количество ^{32}P и ^3H , включившихся в РНК, в каждой реакции можно, измерив радиоактивность осадка с помощью сцинтилляционного счетчика, позволяющего независимо регистрировать излучение от ^{32}P и ^3H благодаря достаточно большим различиям в энергиях частиц, испускаемых этими изотопами. Какие выводы можно сделать из этих данных?

11.2. Напомним, что ДНК, выделенная из фага ϕ X174, является одноцепочечной. При инфекции чувствительных клеток ДНК этого фага переходит в двухцепочечную репликативную форму (РФ). Молекулы РНК, синтезируемые в клетках, инфицированных ϕ X174, поместили *in vivo* с использованием [^3H]-уридина. Выделенную меченую [^3H]-РНК инкубировали с одноцепочечной фаговой ДНК или с выделенной из клеток денатурированной РФ ДНК ϕ X174, что приводило к образованию РНК—ДНК-гибридов между комплементарными последовательностями РНК и ДНК. Данные о количестве [^3H]-РНК, обнаруженном в гибридных молекулах, приведены в таблице 11.3. Какие выводы можно сделать на основании этих данных?

11.3. Какое количество богатых энергией фосфодиэфирных связей, входящих в состав АТР и ГТР, должно быть подвергнуто гидролизу для образования

одной пептидной связи в ходе белкового синтеза? Сколько связей должно быть гидролизовано в процессе полного синтеза белка, содержащего 50 аминокислотных остатков?

11.4. С культивируемыми клеточными линиями млекопитающих можно проводить генетические эксперименты, используя подходы, аналогичные тем, которые применяются при генетическом исследовании микроорганизмов. Например, можно отобрать температурочувствительные мутанты, растущие при 34°C , но не при 40°C . При обработке мутагенами культуры клеток яичника китайского хомячка удалось получить целый ряд мутантных линий с фенотипом чувствительности к температуре. Клетки некоторых из этих линий не растут при 40°C из-за нарушения способности к синтезу белков. Этот же дефект проявляется и в опытах *in vitro* при 40°C . Однако мутантные клетки приобретают способность к росту при 40°C на среде с 10–100-кратным превышением концентрации одной из 20 содержащихся в обычной среде аминокислот. Для каждого типа мутантов «спасительным» оказывается избыток только одной определенной аминокислоты. На основании ваших знаний о механизме биосинтеза и об особенностях функционирования белков ответьте на вопрос:

а) какова возможная функция генов, мутации в которых вызывают описанный фенотип?

б) сформулируйте предложения по проверке вашей гипотезы.

Таблица 11.4. Сборка РНК-полимеразы из субъединиц *in vitro*

Дикий тип	Субъединицы			Включение [³ H] УТР в РНК при рестриктивной температуре (наномоли) ¹⁾
	XH56	R120	A2R7	
$\alpha_2\beta\beta'\sigma$	—	—	—	3,5
σ	$\alpha_2\beta\beta'$	—	—	0,2
$\beta'\sigma$	$\alpha_2\beta$	—	—	4,3
$\beta\sigma$	$\alpha_2\beta'$	—	—	0,17
σ	—	$\alpha_2\beta\beta'$	—	0,09
$\beta'\sigma$	—	$\alpha_2\beta$	—	2,5
$\beta\sigma$	—	$\alpha_2\beta'$	—	0,06
σ	—	—	$\alpha_2\beta\beta'$	0,47
$\beta'\sigma$	—	—	$\alpha_2\beta$	0,52
$\beta\sigma$	—	—	$\alpha_2\beta'$	1,40

¹⁾ 1 наномоль = 10^{-9} моль. Таблица составлена по данным Miller J. et al. 1976. In: RNA Polymerase, eds. R. Losick, M. Chamberlin, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., p. 519

11.5. Гены, кодирующие β - и β' -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*, картируются очень близко друг от друга и транскрибируются в составе общей полицистронной мРНК. Ряд температурочувствительных штаммов, мутантных по области $\beta\beta'$, содержат РНК-полимеразу, которая после выделения и очистки проявляет при рестриктивной температуре аномальные свойства. Субъединицы очищенной РНК-полимеразы можно разделить, а после этого снова осуществить сборку фермента с восстановлением исходной активности. Эксперименты по сборке РНК-полимеразы из субъединиц проводили для того, чтобы установить, какие из субъединиц дефектны в ферментах, образуемых тремя мутантными штаммами (XH56, R120 и A2R7). Из данных, приведенных в таблице 11.4, определите дефектную субъединицу в каждом из штаммов.

11.6. Антибиотики рифампицин и стрептолидинг убивают чувствительные клетки за счет ингибирования синтеза РНК. Изучение очищенной РНК-

полимеразы *in vitro* позволило установить, что рифампицин блокирует процесс инициации синтеза РНК, а стрептолидинг препятствует транслокации РНК-полимеразы по цепи ДНК и тем самым обрывает начавшийся синтез цепей РНК. Мутантные штаммы *E. coli*, устойчивые к одному из этих антибиотиков, образуют РНК-полимеразу, которая после очистки проявляет устойчивость к тому же антибиотику *in vitro*. При проведении экспериментов по сборке фермента из субъединиц подобно тому, как это описано в задаче 11.5, были получены данные, приведенные в таблицах 11.5 и 11.6. Определите, на какие субъединицы действуют вышеназванные антибиотики.

11.7. Некоторые эукариотические цитоплазматические мРНК не содержат полиаденилатного «хвоста». Это наиболее характерно для гистоновых РНК. Учитывая специфическую роль гистонов в цикле клеточного развития, предложите гипотезу относительно функциональной роли polyA-хвоста в структуре мРНК.

Таблица 11.5. Сборка РНК-полимеразы из разделенных субъединиц рифампицинчувствительных и рифампицинустойчивых ферментов

Исходные ферменты и субъединицы, использованные при сборке ¹⁾	Относительная полимеразная активность		Остаточная активность (%)
	(-) Рифампицин (+) Рифампицин (100 мкг/мл)		
Исходный чувствительный фермент	242	1,5	0,6
Исходный устойчивый фермент	124	120	97
$\alpha + \beta + \beta' + \sigma$	52	1,4	2,0
$\alpha_p + \beta_p + \beta'_p + \sigma$	27	25,6	95
$\alpha_p + \beta + \beta' + \sigma$	40	0,6	1,5
$\alpha + \beta_p + \beta' + \sigma$	88	69	78
$\alpha + \beta + \beta'_p + \sigma$	17,5	1,4	8,0

¹⁾ Индексом «р» (от рифампицин) помечены субъединицы устойчивого штамма. (По Heil A., Zillig W. 1970. FEBS Lett., 11, 165.)

Таблица 11.6. Сборка РНК-полимеразы из разделенных субъединиц стрептолидигинчувствительных и стрептолидигинустойчивых ферментов

Субъединицы, использованные при сборке ¹⁾	Относительная полимеразная активность		Остаточная активность %
	(-) Стрептолидигин (+) Стрептолидигин (1 мМ)		
$\alpha + \beta + \beta' + \sigma$	84	1,5	2,1
$\alpha_c + \beta_c + \beta'_c + \sigma$	123	35,2	29,0
$\alpha_c + \beta + \beta' + \sigma$	36	1,1	3,0
$\alpha + \beta_c + \beta' + \sigma$	86	26	30,2
$\alpha + \beta + \beta'_c + \sigma$	113	4,2	3,6
$\alpha + \beta_c + \beta'_c + \sigma$	132	38	29,0
$\alpha_c + \beta + \beta'_c + \sigma$	75	1,2	1,6
$\alpha_c + \beta_c + \beta' + \sigma$	31	11,5	36,6

¹⁾ Индексом «с» (от стрептолидигин) помечены субъединицы устойчивого штамма. (По Heil A., Zillig W. 1970. FEBS Lett., 11, 165.)

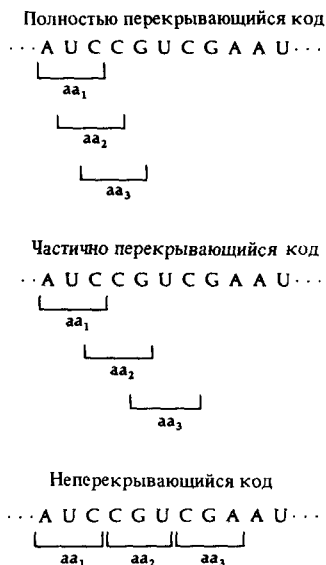
Генетический код

Понятие «генетический код» часто упоминалось в гл. 11, поскольку оно лежит в основе представления о механизме биосинтеза белка. Современные знания о генетическом коде накапливались параллельно с детальным изучением молекулярных основ процессов транскрипции и мутагенеза. Эти вопросы, к решению каждого из которых исследователи подходили независимым путем, в действительности тесно связаны между собой. Мы уже отмечали, что основными знаками генетического кода служат нуклеотидные триплеты, считываемые последовательно без перекрывания от 5'- к 3'-концу цепи мРНК. Трансляция начинается со специализированного инициаторного кодона AUG, который определяет рамку считывания последующих кодонов, и продолжается до тех пор, пока не встретится терминаторный кодон. Этот процесс сопровождается сборкой полипептида с фиксированной аминокислотной последовательностью. Синтез полипептида ведется в направлении от N-конца к C-концу.

Пожалуй, самой впечатляющей особенностью генетического кода является его универсальность. Так, все кодоны, входящие в состав мРНК, кодирующей аминокислотную последовательность куриного овальбумина, имеют абсолютно такой же смысл, что и в мРНК, кодирующих аминокислотные последовательности белков *E. coli*, фага фХ174, табака или человека. И в то же время, как мы еще увидим в этой главе, нельзя сказать, что генетический код абсолютно не подвержен эволюции.

Сразу после того, как модель строения ДНК Уотсона – Крика, включая ее представление о том, что последовательность нуклеотидных пар в ДНК кодирует последовательности аминокислот в белках, была при-

Рис. 12.1. Иллюстрация трех теоретически возможных способов считывания нуклеотидного триплетного кода с включением трех соседних аминокислотных остатков (aa) в последовательность полипептида.



знана, многие исследователи сосредоточили свое внимание на установлении истинной природы генетического кода. Было ясно, что, поскольку в состав белков входит 20 различных аминокислот, каждый кодон должен состоять не менее чем из трех нуклеотидов. Нуклеотидные дуплеты могли бы образовать не более 16 (4^2) различных кодонов, в то время как на основе триплетов можно составить до 64 (4^3) различных кодонов.

Можно представить себе несколько способов построения триплетного кода. Код мог бы быть *перекрывающимся* (рис. 12.1), однако функциональная особенность перекрывающегося кода заключается в том, что точечная мутация, приводящая к замене одной пары оснований, вызвала бы изменение двух или трех соседних аминокислот в последовательности мутантного белка. В то же время определение аминокислотной последовательности ряда мутантных белков показало, что замена одного нуклеотида соответствует замене только одной аминокислоты. Гипотеза перекрывающегося кода должна также накладывать ограничения на то, какие аминокислоты в белке могут оказаться соседними. Анализ же реальных белковых последовательностей показывает, что таких ограничений нет и рядом могут находиться две произвольные аминокислоты. Эти наблюдения заставляют отказаться от представления о перекрывающемся коде и тем самым свидетельствуют о том, что генетический код в действительности является *неперекрывающимся*.

Можно было бы предложить два варианта неперекрывающегося триплетного кода. Поскольку из 64 возможных кодонов только 20 необходимы для кодирования 20 аминокислот, то остальные 44 могли бы быть ничего не значащими (нонсенс-) кодонами. Такой код, в котором каждой аминокислоте соответствовал бы только один кодон, можно было бы назвать *невыврожденным*. В другом варианте большая часть или все 64 кодона могли бы кодировать какую-либо аминокислоту. Такой код, в котором одной аминокислоте соответствуют один или несколько кодонов, называют *вырожденным*. (Термин «вырожденный» для

Таблица 12.1. Генетический код¹⁾

		Второе положение						
		U	C	A	G			
Первое положение	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U		
		UUC } Phe		UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
		UUA } Leu		UCA } Ser	UAA Ochre	UGA Opal	A	
		UUG } Leu		UCG } Ser	UAG Amber	UGG Trp	G	
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U		
		CUC } Leu		CCC } Pro		CAC } His	CGC } Arg	C
		CUA } Leu		CCA } Pro		CAA } Gln	CGA } Arg	A
		CUG } Leu		CCG } Pro		CAG } Gln	CGG } Arg	G
	A	AAU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U		
		AUC } Ile		AAC } Asn		AGC } Ser	C	
		AUA } Ile		ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
		AUG Met		ACG } Thr		AAG } Lys	AGG } Arg	G
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U		
		GUC } Val		GCC } Ala		GAC } Asp	GGC } Gly	C
		GUA } Val		GCA } Ala		GAA } Glu	GGA } Gly	A
		GUG } Val		GCG } Ala			GAG } Glu	GGG } Gly

Третье положение

¹⁾ Нуклеотиды первого положения в кодоне (5'-конец) приведены в левой колонке. Сокращенные обозначения аминокислот см. на рис. 10.13.

данного контекста был позаимствован из квантовой механики «новообращенными» физиками, которые посвятили себя зарождавшейся науке – молекулярной биологии.) Уяснение истинной природы генетического кода и последовавшее за этим экспериментальное определение смысла каждого кодона можно отнести к самым выдающимся достижениям современной науки. Полного успеха в решении этих вопросов удалось добиться всего за несколько лет благодаря осуществлению серии изящных генетических и биохимических экспериментов, которые будут рассмотрены в этой главе. Расшифровка генетического кода (табл. 12.1), полностью завершённая к 1966 г., подтвердила гипотезу неперекрывающихся кодонов и явилась дополнительным обоснованием центральной догмы молекулярной биологии, о которой уже шла речь в гл. 11.

Генетическое изучение кода

Основная часть генетических экспериментов, выявивших природу генетического кода, была осуществлена Фрэнсисом Криком, Сиднеем Бреннером и их коллегами с использованием *rII*-мутантов фага T4. Полученные ими результаты были впервые представлены на Биохимическом конгрессе в 1961 г. Они изучали *rII*-мутации, полученные с помощью профлавина. Интерес к профлавин-индуцируемым мутациям был обусловлен тем, что эти мутации, как считалось, возникают в результате изменений в нуклеотидной последовательности ДНК, не связанных с замещением отдельных нуклеотидов. Основанием для такого представления послужили особые свойства профлавин-индуцированных мутаций, которые заметно отличают их от мутаций, полученных при действии мутагенов другого типа. Мутагены—аналоги нуклеиновых оснований—2-аминопурин и 5-бромурацил вызывают мутации при включении в состав ДНК вместо нормальных нуклеотидов. Считалось (и как оказалось в дальнейшем вполне справедливо), что мутации, вызываемые этими мутагенами, представляют собой результат замещения отдельных оснований. Подтверждением этому служил тот факт, что те же самые вещества способны индуцировать и реверсию полученных с их помощью мутаций к исходному дикому типу (см. гл. 20). В то же время для профлавин-индуцированных мутаций реверсии к дикому типу под действием мутагенов, аналогов оснований, практически не наблюдается (табл. 12.2). Мутации этого типа ревертируют или спонтанно, или с более высокой частотой при действии профлавина. То, что профлавин-индуцированные мутации вообще способны к реверсии, свидетельствует о том, что они являются результатом точечной мутации, а не более или менее протяженной делеции (различия между этими видами мутаций уже обсуждались в гл. 6). Крик и Бреннер предположили (и, как оказалось, также совершенно справедливо—см. гл. 20), что профлавин вызывает включение (*инсерцию*) или удаление (*делецию*) одной нуклеотидной пары из последовательности ДНК. Последующие эксперименты подтвердили эту гипотезу и позволили сделать очень важные выводы о природе генетического кода.

Мы проследим за историей изучения одной из индуцированных профлавином *rII*-мутаций, полученной в группе Крика и Бреннера и обо-

Таблица 12.2. Индукция реверсий у группы *rII*-мутантов фага T4, способных ревертироваться спонтанно

Мутаген, использованный для индукции <i>rII</i> -мутаций	Число испытанных <i>rII</i> -мутантов	Доля <i>rII</i> -мутантов, ревертировавших в присутствии 2-аминопурина и 5-бромурацила, %
2-Аминопурин	98	98
5-Бромурацил	64	95
Гидроксиламин	36	94
Азотная кислота	47	87
Этилтансульфонат	47	70
Профлавин	55	2
Спонтанные мутации	110	14

По Freese E. 1961. 5-й Международный биохимический конгресс, Москва.

значенной *FC0*. Эта мутация картируется в *B*-цистроне недалеко от границы с *A*-цистроном (рис. 6.4). При росте *FC0*-мутанта на перmissive хозяине *E. coli* В с относительно низкой частотой наблюдается возникновение спонтанных ревертантов, которые можно обнаружить по способности к бляшкообразованию на рестриктивном хозяине *E. coli* К (λ) (*rII FC0* \rightarrow *rII*^{«+»}). Однако, как оказалось, большая часть этих «ревертантов» не являются истинными. Так, при совместной инфекции перmissive клеток псевдоревертантным и диким фагом (скрещивание 1, см. ниже) частота возникновения *rII*-мутантных фагов в потомстве значительно превышает частоту спонтанных мутаций к *rII*-фенотипу:

Скрещивание 1
Родители: *rII*^{«+»} \times *rII*⁺
Потомство: *rII*⁺, *rII* ^{α} и *rII* ^{β}

Изучение дочерних *rII*-мутантных фагов, возникающих при скрещивании 1, показало, что они расщепляются на два класса, обозначенные здесь индексами α и β . Скрещивание 2 (см. ниже) показало, что мутанты класса α — это исходные *FC0*-мутанты, поскольку при рекомбинации между α и *FC0* в потомстве не обнаруживаются фаги с диким фенотипом. При скрещивании 3, напротив, происходит образование рекомбинантов дикого типа, то есть *rII* ^{β} представляет собой новый класс мутаций, которые мы будем называть *FC1*.

Скрещивание 2: *rII* ^{α} \times *rIIFC0*
Результат: отсутствие *rII*⁺-рекомбинантов
Скрещивание 3: *rII* ^{β} \times *rIIFC0*
Результат: образование *rII*⁺-рекомбинантов

На основании этих опытов можно заключить, что псевдоревертанты *rII*^{«+»} являются не истинными ревертантами, а двойными мутантами типа *FC0 FC1*, имеющими дикий фенотип, т.е. способными формировать негативные колонии на *E. coli* К (λ). Мутация *FC1* картируется в *B*-цистроне очень близко к *FC0*. Эти две мутации являются внутригенными и взаимно-супрессорными.

Аналогичным образом исследовали поведение новых *rII*-мутаций *FC1*. При росте *FC1* на перmissive хозяине также происходит спонтанное образование псевдоревертантов, которые, как показали аналогичные опыты по скрещиванию, оказались двойными *rII*-мутантами. Таким образом, псевдоревертанты *FC1* содержат двойную мутацию *FC1 FC2*, причем возникшая новая *FC2*-мутация и мутация *FC1* — взаимные супрессоры. Многократно повторив аналогичные серии опытов, Крик и Бреннер получили целый ряд *rII*-мутантов этого типа: *FC3*, *FC4*, *FC5* и т.д. Каждая из мутаций *FC*(*n*) сама по себе определяет обычный мутантный фенотип *rII*, и каждая мутация *FC*(*n*) способна к взаимной внутригенной супрессии с мутациями *FC*(*n* - 1) и *FC*(*n* + 1). При этом мутация *FC*(*n*) была выделена именно по способности обуславливать «реверсию» мутации *FC*(*n* - 1); сама же мутация *FC*(*n*) «ревертировалась» под действием обнаруженной на следующем этапе мутации *FC*(*n* + 1). Рекомбинация между различными мутантами в серии *FC* позволяет получить различные варианты двойных мутантов. Фенотипические свойства сконструированных двойных мутантов приведены в табл. 12.3. Заметьте, что комбинация двух мутаций, из которых одна четная, а другая нечетная, приводит к проявлению дикого фенотипа

Таблица 12.3. Фенотип двойных *rII*-мутантов фага Т4

Двойной мутант	Фенотип	Двойной мутант	Фенотип
<i>FC2 FC3</i>	+	<i>FC4 FC5</i>	+
<i>FC1 FC3</i>	<i>rII</i>	<i>FC3 FC5</i>	<i>rII</i>
<i>FC0 FC3</i>	+	<i>FC2 FC5</i>	+
<i>FC3 FC4</i>	+	<i>FC1 FC5</i>	<i>rII</i>
<i>FC2 FC4</i>	<i>rII</i>	<i>FC0 FC5</i>	+
<i>FC1 FC4</i>	+		
<i>FC0 FC4</i>	<i>rII</i>		

(взаимная супрессия), в то время как пара четных или пара нечетных мутаций дает мутантный фенотип (отсутствие супрессии).

Последнее наблюдение о том, что как четные, так и нечетные мутации не супрессируют друг друга (например, в паре *FC1 FC3*), но каждая из них супрессирует мутацию другого типа (например, в паре *FC2 FC3*), очень важно с точки зрения понимания природы возникновения фенотипа, проявляемого тройными мутантами. Комбинация трех четных или трех нечетных мутаций приводит к проявлению дикого фенотипа, например в комбинации *FC0 FC2 FC4* или *FC1 FC3 FC5*. То есть три мутации, каждая из которых в паре с любой из двух других мутаций не приводит к взаимной супрессии, присутствуя одновременно в виде тройной комбинации, проявляют способность к внутригенной супрессии. Напротив, комбинации из одной четной и двух нечетных или одной нечетной и двух четных мутаций приводит к проявлению мутантного фенотипа.

Для объяснения этих явлений были выдвинуты следующие предположения.

1. Исходная мутация *FC0* представляет собой делецию или вставку одной нуклеотидной пары. Внутригенная супрессия *FC0* достигается при включении одной дополнительной нуклеотидной пары (если *FC0* – делеция) или при делеции одной нуклеотидной пары (если *FC0* – вставка).
2. Считывание нуклеотидной последовательности при трансляции кода начинается в фиксированной точке гена и идет последовательно кодон за кодоном. Поэтому удаление или включение одной нуклеотидной пары автоматически приводит к сдвигу рамки считывания. При этом последующие нуклеотиды включаются в состав кодонов с изменением за счет сдвига смысловым значением. Это означает, что между кодонами, вероятно, нет «знаков препинания». Таким образом, профлави́н относится к числу мутагенов, вызывающих *сдвиг рамки*.
3. При синтезе полипептидов основания считываются тройками, т. е. кодонами имеют триплетную природу.
4. Все или большая часть из 64 возможных триплетов кодируют какую-нибудь аминокислоту, то есть код действительно является вырожденным (более одного триплета кодируют одну и ту же аминокислоту).

Когда была выполнена работа, ни о существовании мРНК, ни о ее роли в процессе биосинтеза белка еще ничего не было известно. Однако на следующем примере можно продемонстрировать, как с помощью сформулированных выше постулатов удастся интерпретировать свой-

ства, проявляемые мутантом *FC0* и его производными. Пусть участку *B*-дистрона, в котором картируются мутация *FC0* и супрессирующие ее мутации, соответствует следующий фрагмент некоторой гипотетической последовательности мРНК:

CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAU CAU
rII⁺

Левый триплет фиксирует рамку считывания таким образом, что данная последовательность кодирует пептид, состоящий из остатков гистидина His—His—His... Теперь допустим, что мутация *FC0* приводит к делеции А во втором кодоне:

CAU CUC AUC AUC AUC AUC AUC AUC AUC AU
rIIFC0

Тогда, начиная со второго триплета, будет считываться совершенно иная аминокислотная последовательность. Если образовавшиеся после сдвига рамки кодоны будут не *nonsense*-кодонами, то будет синтезироваться некий, скорее всего нефункциональный, полипептид, в данном случае—His—Leu—Pе—Pе... Вообще говоря, если бы код был невырожденным, то сдвиг рамки в большинстве случаев приводил бы к возникновению *nonsense*-кодонов. Далее предположим, что мутация *FC1* соответствует включению дополнительного нуклеотида U в четвертый кодон. Это приводит к восстановлению рамки считывания:

CAU CUC AUC AUU CAU CAU CAU CAU CAU CAU
rIIFC0FC1

Образующийся полипептид будет отличаться от полипептида дикого типа тремя соседними аминокислотами и иметь последовательность His—Leu—Pе—Pе—His... Если эти аминокислотные замены затронули относительно несущественный с точки зрения функции участок белка (что касается рассматриваемого участка *B*-дистрона, это действительно так), то образующийся полипептид может проявлять активность белка дикого типа. Рекомбинационное расщепление *FC1* и *FC0* позволяет получить матрицу *FC1*

CAU CAU CAU CAU UCA UCA UCA UCA UCA U
rIIFC1

кодирующую полипептид, большая часть структуры которого His—His—His—His—Ser—Ser... отличается от структуры белка дикого типа. Ясно, что при сочетании трех нуклеотидных делеций или трех вставок на достаточно близком расстоянии друг от друга рамка считывания остается неизменной практически для всей матрицы. Например, делеция второго, третьего и четвертого А приводит к следующей структуре мРНК:

CAU CUC UCU CAU CAU CAU CAU CAU ... ,

которая будет кодировать функциональный полипептид His—Leu—Ser—His—His...

Важнейшие выводы относительно природы генетического кода, сделанные на основании описанных экспериментов, позволили построить изящную, внутренне непротиворечивую модель. Сформулированные постулаты соответствовали полученным генетическим данным, однако ка-

залось, что их независимое экспериментальное подтверждение — дело далекого будущего. Ко всеобщему удивлению, потребовалось всего лишь пять лет для того, чтобы получить биохимические доказательства всех четырех постулатов и полностью расшифровать генетический код.

Генетическое подтверждение существования терминаторных кодонов

Изучение *rII*-мутаций предоставило также генетические свидетельства в пользу существования кодонов, терминирующих синтез полипептидной цепи. Комплементационный анализ показал, что цистроны *A* и *B* кодируют две различные генетические функции. Это значит, что на границе между этими цистронами должны находиться определенные генетические «знаки препинания». Делеция такого пограничного участка приводит к слиянию неделетированных участков *A* и *B* в один общий цистрон. Так, делеция 1589 (рис. 12.2) приводит к возникновению *rIIA*-мутанта, сохраняющего, несмотря на частичную делецию в *B*-цистроне, его функциональность, т.е. способность кодировать активный *B*-белок. Участок *B*-цистрона, исчезающий при делеции 1589, содержит ту самую область, в которой картируются мутации *FC0* и ее производные. Это подтверждает сделанный в предыдущем разделе вывод о том, что данный участок *B*-белка не существует для проявления нормальной активности. Введение мутации со сдвигом рамки в неактивный *A*-участок слитых цистронов, образовавшихся в результате делеции 1589, нарушает и функциональную активность *B*-участка. Следовательно, слитая мРНК имеет направление трансляции *A* → *B*; считывание этой мРНК приводит к образованию одного слитого полипептида.

Аналоги нуклеиновых оснований, вызывающие мутации, отличные от сдвига рамки, также могут индуцировать такие мутации в *A*-участке «слитого» цистрона, которые влекут за собой потерю *B*-функции. Некоторые из этих мутаций, которые сводятся к замещению единичных нуклеотидов, принадлежат к классу супрессируемых летальных *amber*-мутаций (см. гл. 7). Возможное объяснение природы влияния *amber*-мутации в *A*-участке на экспрессию *B*-белка могло заключаться в том, что благодаря этой мутации возникает терминаторный кодон, предотвращающий трансляцию *B*-участка слитой мРНК.

Прямое свидетельство в пользу того, что *amber*-мутации вызывают преждевременную терминацию трансляции, было получено при исследовании

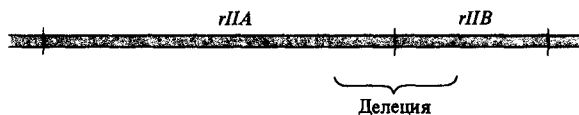


Рис. 12.2. Делеция пограничного участка, расположенного между цистронами *A* и *B* *rII*-мутанта, удаляет последовательность, необходимую для независимой экспрессии двух различных генетических элементов, и приводит к образованию слитого *A*-*B* цистрона. Отмечен размер участка, элиминируемого при делеции 1589.

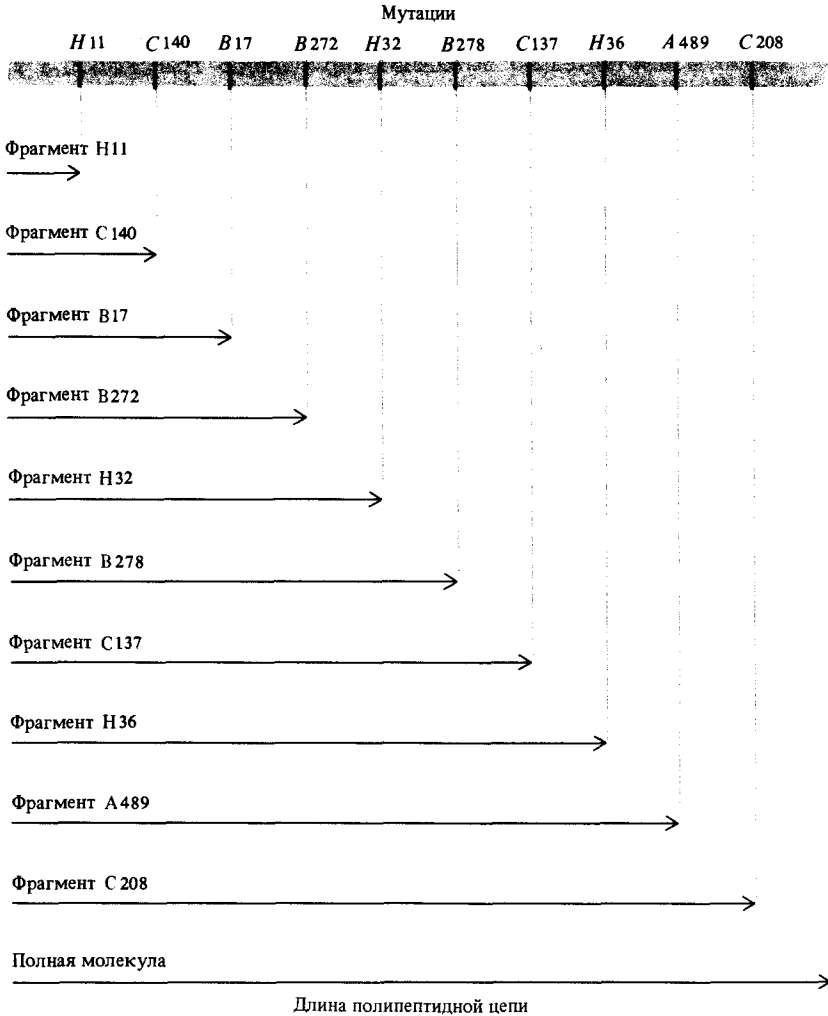


Рис. 12.3. Расположение на генетической карте десяти *amber*-мутаций белка головки фага T4. Внизу показана длина полипептидов, синтезируемых при abortивной инфекции каждым из соответствующих мутантов в клетках рестриктивного хозяина. Длина полипептидов непосредственно коррелирует с положением

соответствующих мутаций на карте гена. Это подтверждает гипотезу, согласно которой *amber*-мутации обуславливают преждевременную терминацию белкового синтеза по мутантной мРНК-матрице. (По Sarabchai A. S., Stretton A. O. W., Brenner S., Bolle A. 1964. Nature **201**, 13.)

довании биосинтеза белка головки фага T4. Десять *amber*-мутаций, картированных в различных участках гена, кодирующего белок фаговой головки, изучали, проводя инфекцию рестриктивного хозяина и оценивая для каждого мутанта величину транслируемого участка соответствующей мРНК. Оказалось, что длина фрагмента белка фаговой головки, синтезируемого при abortивной инфекции, точно коррелирует с поло-

жением каждой из этих мутаций на карте соответствующего гена (рис. 12.3). Эти результаты свидетельствуют о том, что *amber*-мутации действительно вызывают терминацию трансляции, а кроме того, они еще раз наглядно продемонстрировали правильность представления о коллинеарности генов и полипептидов.

Расшифровка кода с помощью биохимических методов

Первым существенным вкладом биохимии в решение проблемы генетического кода явилась разработка системы бесклеточного синтеза белка *in vitro* на базе белок-синтезирующего аппарата *E. coli*. Синтез белка в этой системе, происходящий только в присутствии мРНК, регистрировался и оценивался по включению радиоактивных аминокислот в состав пептидов. Обычно в каждом данном эксперименте используют только одну радиоактивную аминокислоту, а остальные 19 – нерадиоактивные. Таким образом, удается оценить возможность утилизации в системе одной определенной аминокислоты.

В экспериментах с бесклеточной системой Маршалл Ниренберг и Генрих Маттэи, исследовавшие активность различных препаратов РНК в роли матриц для белкового синтеза, в качестве контроля использовали синтетическую полиуридилловую кислоту (poly U), рассчитывая, что она не будет проявлять существенной матричной активности. К своему большому удивлению, они обнаружили, что poly U достаточно эффективно направляет синтез полифенилаланина. Более того, полифенилаланин оказался единственным полипептидом, синтезируемым в присутствии poly U. Из этих наблюдений непосредственно вытекало, что триплет UUU служит кодоном для фенилаланина. Вскоре аналогичным образом было установлено, что poly C направляет синтез пролина, а poly A – синтез полилизина, то есть CCC является пролиновым кодоном, а AAA кодирует лизин. К счастью, использованная в этих экспериментах бесклеточная система содержала повышенную концентрацию ионов магния, при которой (как выяснилось в дальнейшем) инициация синтеза полипептидной цепи происходит и в отсутствие инициаторного кодона AUG (см. гл. 11). Только поэтому вышеупомянутые синтетические матрицы и удавалось использовать в качестве субстратов для аномальной инициации трансляции. Так, отчасти благодаря счастливой случайности, были сделаны первые шаги на пути к полной расшифровке генетического кода.

Далее последовала серия экспериментов по изучению кодирующих свойств в бесклеточной системе статистических РНК-сополимеров. Такие сополимеры можно синтезировать *in vitro* с помощью фермента полинуклеотид-фосфорилазы, используя в качестве субстратов 5'-рибонуклеозиддифосфаты. Для работы этого фермента не требуется ни заправки, ни матрицы, – полимеризация идет случайно за счет присоединения нуклеотидов к 3'-концу растущей цепи в соответствии с относительным содержанием различных 5'-рибонуклеозиддифосфатов в реакционной смеси. Так, если в реакционной смеси содержится ADP и CDP в соотношении 5:1, то образующийся сополимер также будет состоять из А и С в соотношении 5:1. Распределение оснований каждого типа

Таблица 12.4. Частоты встречаемости различных кодонов в случайном сополимере состава А : С = 5 : 1

Состав кодона	Расчитанная частота	Нормализованная относительная частота
3А	$\left(\frac{5}{6}\right)^3 = \frac{125}{216}$	100
2А1С	$\left(\frac{5}{6}\right)^2 \left(\frac{1}{6}\right) \times 3 = \frac{75}{216}$	60
1А2С	$\left(\frac{5}{6}\right) \left(\frac{1}{6}\right)^2 \times 3 = \frac{15}{216}$	12
3С	$\left(\frac{1}{6}\right)^3 = \frac{1}{216}$	0,8

в цепи будет случайным, т.е. отвечающим только его относительному содержанию в смеси. Частота возникновения кодонов различного состава в случайном сополимере с соотношением А : С = 5 : 1 может быть рассчитана (табл. 12.4). Расчет показывает, что на каждые 100 кодонов ААА в сополимере должны присутствовать 60 кодонов типа 2А1С (ААС, АСА и САА) и так далее. Ввиду полярности РНК-молекул (5'-3') кодоны ААС и САА неидентичны. По установившейся традиции, при записи последовательности 5'-конец помещается слева, 3'-конец – справа, поэтому приведенные выше последовательности кодонов следует понимать как сокращенные варианты записи последовательностей типа 5'-рА рАрС_{он}-3' и т.п.

Относительные величины, отражающие включение отдельных аминокислот в состав полипептидов, синтезируемых в присутствии (А : С = 5 : 1)-сополимера, приведены в табл. 12.5, А. Наблюдается включение шести различных аминокислот. Наиболее часто включающуюся в полипептиды аминокислоту – лизин, как мы знаем, кодирует триплет ААА, а наименее часто встречающуюся – пролин – триплет ССС. Основываясь на расчетных данных таблицы 12.4, можно установить соответствие между определенными аминокислотами и триплетами определенного состава. Результаты аналогичного эксперимента, основанного на использовании сополимера, содержащего А и С в соотношении 1 : 5, показаны в табл. 12.5, Б. Подобные эксперименты позволяют установить состав кодонов, соответствующих данной аминокислоте, однако не дают никакой информации о последовательности оснований в этих кодонах.

Одним из подходов к установлению последовательности в кодонах является использование синтетических мРНК с известной последовательностью. Например, панкреатическая рибонуклеаза (эндонуклеаза, специфичная к пиримидиновым нуклеотидам) может расщеплять сополимер с составом А : С = 25 : 1 только по 3'-концу остатка С с образованием молекул мРНК, имеющих общую структуру, близкую к А₂₅С. Такая матрица направляет синтез олиголизина, содержащего на С-конце остаток аспарагина. Это свидетельствует о том, что кодон ААС соответствует аспарагину, а также доказывает, что трансляция матрицы протекает в направлении 5' → 3', поскольку при считывании в противоположном направлении происходил бы синтез олиголизина с N-концевым глутамином (САА).

Таблица 12.5. Соотнесение кодонов определенного состава и соответствующих им аминокислот на основе сопоставления относительных величин, отражающих включение аминокислот в состав полипептидов, синтезируемых по случайному АС-сополимеру в качестве матрицы

Аминокислота	Относительное включение аминокислоты	Оптимизированное соотнесение триплетов (расчитанные частоты встречаемости)				Сумма частот встречаемости триплетов для каждой аминокислоты
		3A (100)	2A1C 60	1A2C 12	3C 0,8	
А А : С = 5 : 1						
Аспарагин	24,2		20			20
Глутамин	23,7		20			20
Гистидин	6,5			4,0		4,0
Лизин	100	100				100
Пролин	7,2			4,0	0,8	4,8
Треонин	26,5		20	4,0		24,0
		(0,8	12	60	100)	
Б А : С = 1 : 5						
Аспарагин	5,3		3,3			3,3
Глутамин	5,2		3,3			3,3
Гистидин	23,4			16,7		16,7
Лизин	1,0	0,7				0,7
Пролин	100			16,7	83,3	100
Треонин	20,8		3,3	16,7		20

По *Speyer J. F. et al.* (1963). Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., **28**, 559.

Более систематическое определение структуры кодонов предпринял химик-органик Хар Гобинд Корана. Он разработал методы химического синтеза матриц с известной последовательностью и осуществил синтез всех 64 триплетов, которые могут входить в состав мРНК. После того как такие молекулы были синтезированы, появилась возможность окончательно определить значение всех «слов» генетического кода. Достижение этой цели удалось ускорить благодаря тому, что в присутствии некоторых тринуклеотидов происходит, как было обнаружено, специфическое связывание определенных аминоксил-тРНК с рибосомами. Взаимодействие между синтетическим кодоном и соответствующим антикодоном, входящим в состав аминоксил-тРНК, осуществляется при участии рибосом и имитирует этап антикодон-кодонового узнавания, который действительно реализуется в ходе трансляции (см. гл. 11). Этот метод позволяет большинству кодонов, хотя и не всем, сопоставить определенную аминокислоту, как показано в табл. 12.6.

В результате использования описанных выше методов удалось полностью расшифровать генетический код (см. табл. 12.1); показано, что 61 из 64 возможных триплетов кодируют какую-либо аминокислоту. Правильность соотнесения кодонов и аминокислот была подтверждена при анализе аминокислотных замен в мутантных белках оболочки ВТМ и гемоглобинов человека, основанном на представлении о том, что каждая точечная мутация связана с изменением одного нуклеотида в триплете. Пример такого сравнительного анализа для мутантных человеческих β -глобиновых цепей приведен на рис. 12.4.

Один из важнейших выводов, который может быть сделан на основе

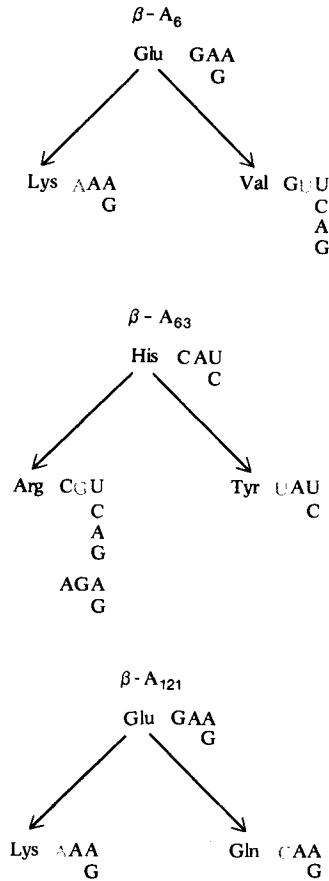
Таблица 12.6. Специфичность связывания аминоксил-тРНК рибосомами *E. coli* в присутствии различных тринуклеотидов¹⁾

Кодон	Связывание аминоксил-тРНК с рибосомами (пикомоли)			
	(-) Кодон	(+) Кодон	(-) Кодон	(+) Кодон
	[¹⁴ C] Аргинил-тРНК I (39,4 пикомоль)		[³ H] Аргинил-тРНК II (19,3 пикомоль)	
CGU	0,19	0,54	0,16	2,61
CGC	0,19	0,29	0,16	1,29
CGA	0,19	0,21	0,16	2,21
CGG	0,19	1,24	0,16	0,14
AGA	0,19	0,22	0,16	0,14
AGG	0,19	0,19	0,16	0,30
	[¹⁴ C] Глицил-тРНК I (32,1 пикомоль)		[¹⁴ C] Глицил-тРНК II (47,1 пикомоль)	
GGU	0,83	1,11	1,18	4,16
GGC	0,83	1,39	1,18	4,94
GGA	0,83	4,38	1,18	1,49
GGG	0,83	4,46	1,18	2,79
	[¹⁴ C] Изолейцин-тРНК II (7,0 пикомоль)		[³ H] Изолейцин-тРНК I (5,3 пикомоль)	
AUU	0,18	0,96	0,05	0,32
AUC	0,18	1,20	0,05	0,43
AUA	0,18	0,16	0,05	0,05
	[¹⁴ C] Фенилаланил-тРНК I (13,4 пикомоль)		[¹⁴ C] Фенилаланил-тРНК II (11,9 пикомоль)	
UUU	0,26	0,50	0,33	0,75
UUC	0,26	0,58	0,33	0,92
	[¹⁴ C] Пролил-тРНК I (3,2 пикомоль)		[¹⁴ C] Пролил-тРНК II (5,4 пикомоль)	
CCU	0,39	0,48	0,07	0,09
CCC	0,39	0,42	0,07	0,09
CCA	0,39	0,71	0,07	0,15
CCG	0,39	0,81	0,07	0,30

¹⁾ Цифры, соответствующие положительному ответу, выделены жирным шрифтом. Сравните наблюдаемую специфичность связывания с таблицей генетического кода (табл. 12.1). Аминоксил-тРНК I и II представляют собой химически отличные молекулярные формы (изоакцепторные тРНК). (По Söll D., Cherayil J., Bock R. 1967. J. Mol. Biol., 29, 97.)

полученных результатов, заключается в том, что генетический код практически полностью вырожден. Только две аминокислоты – метионин и триптофан – представлены единичными кодонами. Метиониновый кодон AUG служит также сигналом для инициации синтеза полипептид-

Рис. 12.4. Аминокислотные замены, обнаруженные в шести различных мутантных β -цепях человеческого гемоглобина А, затрагивающие аминокислотные остатки в положениях 6, 63 и 121. Показаны все кодоны, которые могли бы отвечать нормальным и мутантным аминокислотам. Заметьте, что в каждом случае замену аминокислоты можно объяснить заменой единичного нуклеотида (выделен цветом) в соответствующем кодоне.



ной цепи. Три некодирующих триплета – UAA, UAG, UGA, как будет ясно из дальнейшего, выполняют функции сигналов терминации трансляции.

Особенности построения генетического кода

Если внимательно рассмотреть таблицу генетического кода (табл. 12.1), то легко заметить некоторые особенности в построении кодонов, связанные, по всей видимости, с таким свойством кода, как вырожденность. Видно, что для большинства кодонов первые два нуклеотида с точки зрения смысловой нагрузки имеют как бы большее значение, чем нуклеотид в третьем положении. Можно отметить существование восьми групп или «семейств» кодонов, в которых третье положение может быть занято любым нуклеотидом. Так, серину соответствует шесть кодонов, из них четыре относятся к семейству UCN (N – любой из четырех нуклеотидов), валин кодируют кодоны GUN, а глицин – семейство GGN. Другим аминокислотам соответствуют кодоны, для которых вы-

Таблица 12.7. Правила неоднозначного соответствия при антикодон-кодоновом взаимодействии

Первое положение антикодона	Третье положение кодона
U	A
	G
C	G
A	U
G	U
	C
	U
I ¹⁾	C
	A

¹⁾ I – инозин, производное аденозина, образующееся при посттранскрипционном деминировании.

рожденность по третьему положению ограничивается пуринами (A или G) или пиримидинами (U или C). Например, лейцин кодируют триплеты UUG^A (а также семейство CUN), а тирозин – триплеты UAC^U.

Крик предложил ряд правил, описывающих особенности кодон-антикодовых взаимодействий, которые связаны с третьим положением в кодоне (табл. 12.7), и получивших название *правил неоднозначного соответствия* (*гипотеза качаний, wobble rules*). Согласно гипотезе Крика, различные виды молекул тРНК могут узнавать два или более двух различных кодонов в зависимости от того, какой нуклеотид находится в первом положении антикодона. Таким образом, для считывания генетического кода необходимо существование не менее 32 видов молекул тРНК. Данные, приведенные в табл. 12.6, показывают, что молекулы тРНК определенного вида могут узнавать более одного кодона. Более того, эти данные свидетельствуют о том, что в клетках присутствуют химически различные виды тРНК, специфичные к одной и той же аминокислоте (изоакцепторные тРНК), которые в ряде случаев узнают различные кодоны. Так, изоакцепторные аргининовые тРНК I и тРНК II проявляют различную кодоновую специфичность (табл. 12.6). Из этих данных следует, что для узнавания CGN-семейства аргининовых кодонов достаточно двух генетических видов тРНК^{Arg}. Согласно правилам неоднозначного соответствия, тРНК^{Arg} I должна нести антикодон CCG, узнающий кодон CGG (кодон-антикодоновое взаимодействие осуществляется при антипараллельной ориентации триплетов, и, поскольку нумерация в нуклеотидной цепи традиционно начинается с 5'-конца, третье положение кодона соответствует первому положению антикодона). Из тех же правил следует, что тРНК^{Arg} II должна обладать антикодоном ICG, который может узнавать кодоны CGC. Таким образом, не смотря на вырожденность кода, нет необходимости в использовании особого вида тРНК для каждого кодона. Определенная неоднозначность, допустимая при антикодон-кодоновом взаимодействии, позволяет клетке несколько сэкономить на числе видов тРНК, необходимых для узнавания вырожденных кодонов.

Терминаторные кодоны

Amber-мутации вызывают преждевременную терминацию белкового синтеза (рис. 12.3). Природа терминирующего сигнала, возникающего при *amber*-мутации, была установлена с помощью анализа аминокислотных последовательностей щелочной фосфатазы *E. coli* и белка головки фага Т4. Проводили мутагенез штамма *E. coli*, несущего *amber*-мутацию, инактивирующую щелочную фосфатазу, и отбирали ревертанты с полностью или частично восстановленной активностью фермента. Сравнивали аминокислотные последовательности ферментов, выделенных из штаммов с восстановленной активностью фосфатазы и из штамма дикого типа. Аминокислотные замены, наблюдаемые в одном из положений последовательности фермента, показаны на рис. 12.5. Исходная *amber*-мутация произошла в триптофановом кодоне. Оказалось, что ферменты, выделенные из ревертантных штаммов, в том же положении содержат как триптофан (истинные ревертанты), так и другие аминокислоты – лизин, глутамин, глутаминовую кислоту, серин, тирозин и лейцин (псевдоревертанты). Исходя из предположения о том, что мутация, вызывающая реверсию, в каждом случае сводится к замене одной нуклеотидной пары, и из сравнительного анализа структуры всевозможных кодонов, соответствующих вышеназванным аминокислотам, можно заключить, что существует только один триплет UAG, который может быть получен из всех кодонов с помощью замены одного нуклеотида (рис. 12.5). UAG является одним из трех кодонов, не соотносящихся с той или иной аминокислотой. Схемы взаимодействия кодонов, аналогичные той, которая приведена на рис. 12.5, были получены для пяти различных аминокислотных позиций в белке головки фага Т4. Таким образом, единственный терминаторный кодон, возникающий при *amber*-мутации, имеет структуру UAG.

Amber-мутации представляют собой класс условно-летальных мутаций, впервые обнаруженных и охарактеризованных на примере бактериофагов. Такие мутации оказываются летальными для фага лишь при

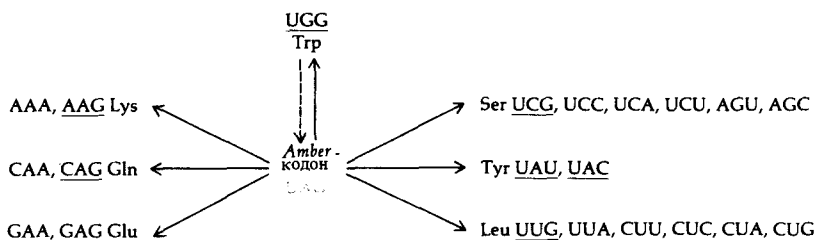


Рис. 12.5. Аминокислотные замены, обнаруженные в последовательности щелочной фосфатазы у ревертантов, полученных из штаммов *E. coli*, несущих *amber*-мутацию в гене этого фермента. Исходная *amber*-мутация произошла в кодоне, соответствующем остатку триптофана в ферменте дикого типа (пунктирная стрелка). Показаны все кодоны, которые мог-

ли бы соответствовать наблюдаемым аминокислотным заменам (сплошные стрелки). *Amber*-кодон UAG является единственным структурным вариантом, в рамках которого все наблюдаемые аминокислотные замены можно интерпретировать как обусловленные замещением единичного нуклеотида в кодоне. (По *Garen A.* 1968. *Science*, **160**, 149.)

инфицировании определенных клеток. Однако в некоторых штаммах, несущих супрессорный ген (Su^+), развитие подобных мутантных фагов происходит (гл. 7, табл. 7.1). Два других типа супрессируемых условно-летальных мутаций получили название «ochre» и «opal». Эксперименты, аналогичные тем, которые были проведены для установления природы *amber*-мутации, показали, что *ochre*-мутации приводят к возникновению терминаторного триплета UAA, а *opal*-мутации – к возникновению еще одного терминаторного сигнала UGA. Таким образом, благодаря этим исследованиям удалось окончательно установить смысловое значение всех 64 возможных кодонов: с помощью 61 триплета кодируются аминокислоты и еще 3 триплета выполняют роль терминаторных кодонов. Поскольку терминаторные кодоны, в том числе возникающие и при некоторых видах мутаций, например при *amber*-мутациях, сами по себе не кодируют какую-либо аминокислоту, их часто называют *nonsense*-кодонами (т.е. бессмысленными кодонами), а соответствующие мутации – *nonsense*-мутациями. Однако ввиду того, что эти кодоны на самом деле не бессмысленны, а имеют вполне определенное смысловое значение, мы до сих пор избегали употреблять эти достаточно распространенные словосочетания.

Организация нуклеотидной последовательности фага ϕ X74

После того как генетический код был полностью расшифрован, были разработаны методы определения нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК, которые позволили окончательно убедиться в правильности расшифровки и универсальности кода. Определение первичной структуры природных мРНК, например мРНК куриного овальбумина (рис. 11.18), показало, что аминокислотную последовательность белка можно прочесть непосредственно по соответствующей нуклеотидной последовательности с помощью таблицы генетического кода. При этом было установлено, что терминаторные кодоны, об определении структуры которых рассказывалось в предыдущем разделе, действительно выступают в роли сигналов терминации трансляции. Более того, удалось получить представление о некоторых достаточно неожиданных способах, с помощью которых может осуществляться зашифровка генетической информации, а также ее выражение в ходе транскрипции и трансляции.

Первые неожиданности такого рода были выявлены после определения нуклеотидной последовательности генома фага ϕ X174, генетическая структура которого была рассмотрена в гл. 7. Полная нуклеотидная последовательность одноцепочечной ДНК ϕ X174, а также соответствующие аминокислотные последовательности кодируемых белков приведены на рис. 12.6. Показаны также сайты узнавания для ряда рестриктаз, использованных при определении последовательности ДНК. В целом наблюдается хорошая корреляция между нуклеотидной последовательностью (рис. 12.6) и генетической картой (рис. 7.5) фага. Однако можно отметить и три случая отклонения от такой корреляции. Во-первых, имеет место расхождение между рекомбинационными частотами и физическими расстояниями, особенно в области гена *A*. Во-вторых,

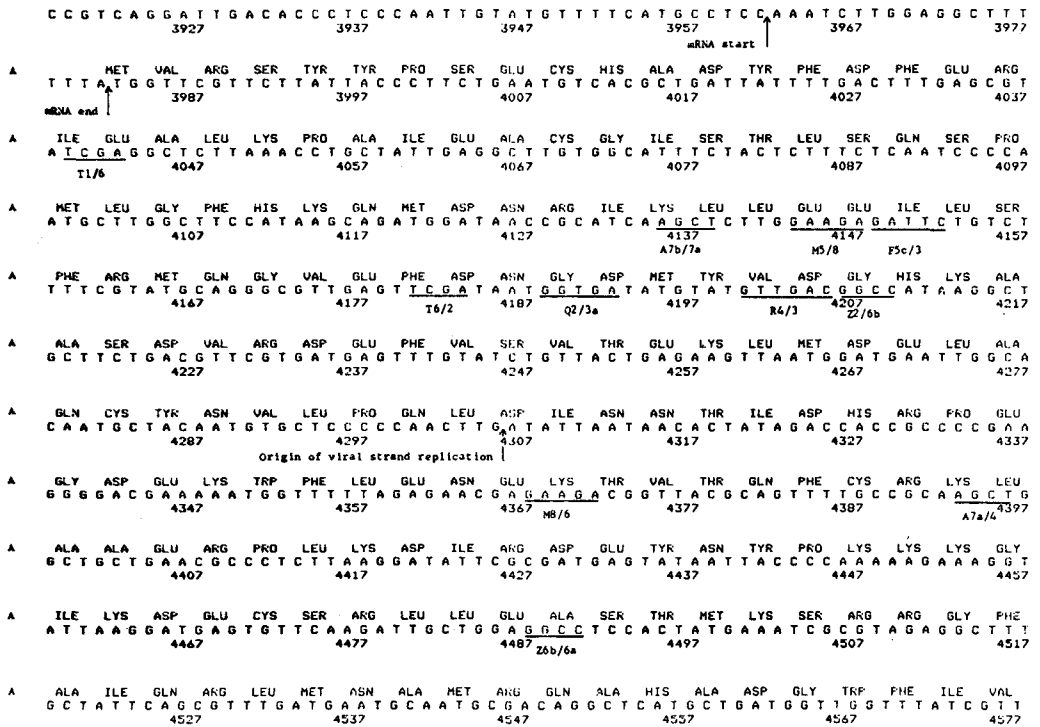


Рис. 12.6. Нуклеотидная последовательность ДНК генома фага ϕ X174 *cs70*. Над нуклеотидной последовательностью приведены аминокислотные последовательности кодируемых белков. Последовательность кольцевой фаговой ДНК начинается после терминаторного кодона Н-белка. Нумерация начинается от уникального сайта расщепления рестриктазой *Pst* I. Слева от последовательности поставлены буквы, отражающие название белка, кодируемого данным участком генома. Сайты узнавания для ряда рестриктаз помечены под соответствующими участками последовательности, при этом использованы следующие обозначения:

A *Alu* I H *Hha* I P *Pst* I R *Hind* II Y *Hap* II
 F *Hinf* I M *Mbo* II Q *Hph* I T *Taq* I Z *Hae* III

Точковая мутация *cs70* обуславливает чувствительность к пониженной температуре и, вероятно, изменяет структуру белка F. Нуклеотидная последовательность, соответствующая белку K, перекрывается с последовательностями белков A и C. Эта последовательность идентифицирована на основе гомологии с близкородственным фагом G4. К-белок был обнаружен в клетках, инфицированных фагом G4, однако при инфекции ϕ X174 присутствие аналогичного белка выявлено не было. Следует отметить, что фаг G4 направляет синтез набора белков, гомологичных всем белкам, которые обнаружены в клетках, инфицированных фагом ϕ X174. (По Sanger F. et al. 1978. J. Mol. Biol. 125, 225.)

```

A PHE ASP THR LEU THR LEU ALA ASP ASP ARG LEU GLU ALA PHE TYR ASP ASN PRO ASN ALA
  TTTGACACTCTCACGTTGGCTGACGACCAGATTAGAGGCGTTTATGATAATCCCAATGCT
    4587          4597          4607          4617          4627          4637
A LEU ARG ASP TYR PHE ARG ASP ILE GLY ARG MET VAL LEU ALA ALA GLU GLY ARG LYS ALA
  TTGCGTGACTATTTTCGTGATATGGTTCGTATGGTTCTTGCTGCCGAGGGTCGCAAGGCT
    4647          4657          4667          4677          4687          4697
A ASN ASP SER HIS ALA ASP CYS TYR GLN TYR PHE CYS VAL PRO GLU TYR GLY THR ALA ASN
  AATGATTCACACGCCBACTGCTATCAGTATTTTGTGTGCTGCTGABTATGGTACAGCTAAT
    P3/3a 4707          4717          4727          4737          4747          A4/11 4757
A GLY ARG LEU HIS PHE HIS ALA VAL HIS PHE MET ARG THR LEU PRO THR GLY SER VAL ASP
  GGGCGTCTTCATTTCCATGCGGTGCACCTTATGCGGACACTTCCTACAAGTAGCGTTCAC
    26a/9  M6/14767  4777          4787          4797          4807          R3/8 4817
A PRO ASN PHE GLY ARG ARG VAL ARG ASN ARG ARG GLN LEU ASN SER LEU GLN ASN THR TRP
  CCTAATTTGGTTCGTCCGGTACGCAATCGCCGCGCAGTTAAATAGCTTGC AAAAATACGTTGG
    4827          4837          4847          4857          A11/10 4867          4877          4887
A PRO TYR GLY TYR SER MET PRO ILE ALA VAL ARG TYR THR GLN ASP ALA PHE SER ARG SER
  CTTATGGTTACAGTATGCCCATCGCAGTTTCGTACACCGCAGGACGCTTTTTCACGTTCT
    4887          4897          4907          4917          4927          4937
A GLY TRP LEU TRP PRO VAL ASP ALA LYS GLY GLU PRO LEU LYS ALA THR SER TYR MET ALA
  GGTGGTTGTGGCGCTGTGTGCTAAAGBTGAGCCGCTTAAAGCTACCAAGTTATATGGCT
    4947          210/3 4957          4967          4977          A10/12b 4987          4997
A VAL GLY PHE TYR VAL ALA LYS TYR VAL ASN LYS LYS SER ASP MET ASP LEU ALA ALA LYS
  GTTGGTTTCTATGGGCTAAATACGTTTAAACAAAAGTCAGATATGGACCTTGCTGCTAAFA
    5007          5017          5027          5037          5047          5057
A GLY LEU GLY ALA LYS GLU TRP ASN ASN SER LEU LYS THR LYS LEU SER LEU LEU PRO LYS
  B GGTCTAGGAGCTAAAGAAATGGAACAACCTCACTAAAACCAAGCTGTGCTACTTCCCAAG
    5067          5077          5087          5097          A15b/17 5107          5117
A LYS LEU PHE ARG ILE ARG MET SER ARG ASN PHE GLY MET LYS MET LEU THR MET THR ASN
  B ALA VAL GLN ASN GLN ASN PRO GLN LEU ARG ASP GLU ASN ALA HIS ASN ASP LYS SER
  AAGCTGTTCAGAATCAGAAATGAGCCGCAACTTCGGGATGAAAATGCTCACAAATGACAAAT
    A17/12a 5127          P5a/6 5137          5147          5157          5167          5177
A LYS SER THR GLU CYS LEU ILE GLN LEU THR LYS LEU GLY TYR ASP ALA THR PRO PHE ASN
  B VAL HIS GLY VAL LEU ASN PRO THR TYR GLN ALA GLY LEU ARG ARG ASP ALA VAL GLN PRO
  CTGTCCACGGAGTGCTTAATCCAACCTTACCAAGCTGGGTTACGACGCGACGCCBTTCAAC
    5187          5197          5207          A12a/3 5217          5227          5237
A GLN ILE LEU LYS GLN ASN ALA LYS ARG GLU MET ARG LEU ARG LEU GLY LYS VAL THR VAL
  B ASP ILE GLU ALA GLU ARG LYS LYS ARG ASP GLU ILE GLU ALA GLY LYS SER TYR CYS SER
  CAGATATTTGAAGCAGAACGCAAAAAGAGAGATGAGATTGAGGCTGGGAAAAGTTACTGTA
    5247          5257          5267          5277          5287
A ALA ASP VAL LEU ALA ALA GLN PRO VAL THR THR ASN LEU LEU LYS PHE MET ARG ALA SER
  B ARG ARG PHE GLY GLY ALA THR CYS ASP ASP LYS SER ALA GLN ILE TYR ALA ARG PHE ASP
  GCCGACGTTTGGCGGCGCAACCTGTGACGACAAATCTGCTCAAAATTAATGCGCGCTTCG
    5307          H1/13 5317          5327          5337          5347          H15/8b 5357          T2/7 5367
A ILE LYS MET ILE GLY VAL SER ASN LEU GLN SER PHE ILE ALA SER MET THR GLN LYS LEU
  B LYS ASN ASP TRP ARG ILE GLN PRO ALA GLU PHE TYR ARG PHE HIS ASP ALA GLU VAL ASN
  ATAAAAATGATTTGGCGTATCCAACTTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAAGTTA
    5367          5377          P1/1 5387          5397          5407          5417          R5/7b 5427
A THR LEU SER ASP ILE SER ASP GLU SER LYS ASN TYR LEU ASP LYS ALA GLY ILE THR THR
  B THR PHE GLY TYR PHE *** MET SER ARG LYS ILE ILE ILE LYS GLN GLY LEU LEU
  ACACCTTTGCGATATTTCTGATGAGTTCGAAA AATTATCTTGATAAAGCAGGAATTACTACT
    41          51          P6/9 T7/8 61          71          81          91
A ALA CYS LEU ARG ILE LYS SER LYS TRP THR ALA GLY GLY LYS ***
  E LEU VAL TYR GLU LEU ASN ARG SER GLY LEU LEU ALA GLY ASN GLU LYS ILE ARG PRO ILE
  C BCTTSTTACGAATTAATTCAGAGTGGACTGCTGGCGGAAAATGAGAAAATTCGACCTAT
    101          111          T8/9 121          131          141          T9/10 151

```

Рис. 12.6 (продолжение).

I	LEU	ALA	GLN	LEU	GLU	LYS	LEU	LEU	LEU	CYS	ASP	LEU	SER	PRO	SER	THR	ASN	ASP	SER	VAL	
C	LEU	ARG	SER	SER	ARG	SER	SER	TYR	PHE	ALA	THR	PHE	ARG	HIS	GLN	LEU	THR	ILE	LEU	SEF	
	CCTTGC	CGC	AGCT	CGA	GAA	AGCT	CCTT	ACTT	TTC	CG	AC	CTTT	CG	CC	ATCA	CACT	AAC	GATT	CTGT		
	161	161	15/18	T10/4		171			181			191			201		F9/13	211			
	mbb/4					A18/6															
K	LYS	ASN	***																		
C	LYS	THR	ASP	ALA	LEU	ASP	GLU	GLU	LYS	TRP	LEU	ASN	MET	LEU	GLY	THR	PHE	VAL	LYS	AS	
	CAAAAA	ACT	GAC	GCG	GTT	GAT	GAG	GAG	AAG	TGG	CTT	AAT	ATG	CTT	GGC	AC	CGT	TTC	GTCA	AAG	
	221					231			241			251			261					271	
C	TRP	PHE	ARG	TYR	GLU	SER	HIS	PHE	VAL	HIS	GLY	ARG	ASP	SER	LEU	VAL	ASP	ILE	LEU	LY	
	ACTG	STTT	A	GAT	AT	G	A	B	T	C	A	T	T	T	G	T	C	A	T	T	T
	281					F13/17	291		301				311	F17/16a		321	R7b/6c		331		
D	GLU	ARG	GLY	LEU	LEU	SER	GLU	SER	ALA	VAL	GLN	PRO	LEU	ILE	GLY	LYS	LYS	SER	MET		
C	AAG	ABC	SGT	GG	ATT	ACT	AT	CT	G	A	G	T	C	G	A	T	G	C	T	T	T
	341					351	F16a/16b		361			371		381					391		
							mRNA start														
D	SER	GLN	VAL	THR	GLU	GLN	SER	VAL	ARG	PHE	GLN	THR	ALA	LEU	ALA	SER	ILE	LYS	LEU	ILE	
C	S	A	G	T	C	A	A	G	T	T	A	C	T	G	A	A	C	T	T	A	A
	F16b/1		401		411			421		431		23/7		441			A6/1	451			
D	GLN	ALA	SER	ALA	VAL	LEU	ASP	LEU	THR	GLU	ASP	ASP	PHE	ASP	PHE	LEU	THR	SER	ASN	LYS	
C	T	C	A	S	G	C	T	T	G	C	G	T	T	T	G	G	A	T	T	T	T
	461		471		481	H1/7		491	T4/3				501						511		
D	VAL	TRP	ILE	ALA	THR	ASP	ARG	SER	ARG	ALA	ARG	ARG	CYS	VAL	GLU	ALA	CYS	VAL	TYR	GLY	
C	A	G	T	T	G	S	A	T	T	S	C	T	A	C	T	G	T	T	G	A	G
	521				531			541				551			561					571	
D	THR	LEU	ASP	PHE	VAL	GLY	TYR	PRO	ARG	PHE	PRO	ALA	VAL	GLU	PHE	ILE	ALA	ALA	VAL		
C	T	A	C	G	C	T	G	A	C	T	T	G	T	G	G	A	T	A	C	C	C
	581				591			601				611			621				631		
D	ILE	ALA	TYR	TYR	VAL	HIS	PRO	VAL	ASN	ILE	GLN	THR	ALA	CYS	LEU	ILE	MET	GLU	GLY	ALA	
C	C	A	T	T	G	C	T	T	A	T	T	A	T	T	C	C	C	T	C	A	A
	641				651	R6c/7a		661		27/3	671		681						691	H4/13	
D	GLU	PHE	THR	GLU	ASN	ILE	ILE	ASN	GLY	VAL	GLU	ARG	PRO	VAL	LYS	ALA	ALA	GLU	LEU	PHE	
C	T	G	A	A	T	T	A	C	G	A	A	A	C	A	T	T	A	A	T	T	A
	701				711			721	T3/3		731	V1/3		741					751		
D	ALA	PHE	THR	LEU	ARG	VAL	ARG	ALA	GLY	ASN	THR	ASP	VAL	LEU	THR	ASP	ALA	GLU	GLU	ASN	
C	C	G	C	G	T	T	A	C	C	T	G	C	G	T	G	T	A	C	G	C	G
	761				771	H13/11		781				791			801		M7/3	811			
J	VAL	ARG	GLN	LYS	LEU	ARG	ALA	GLU	GLY	VAL	MET	***									
C	C	B	T	G	C	G	T	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	821				831			841				851			861					871	
J	GLY	ALA	ARG	PRO	GLY	ARG	PRO	GLN	PRO	LEU	ARG	GLY	THR	LYS	GLY	LYS	ARG	LYS	GLY	ALA	
C	G	C	G	C	T	G	C	C	T	G	G	T	C	G	C	A	A	G	C	G	T
	H11/14		881		891			901				911			921					H14/12	
J	ARG	LEU	TRP	TYR	VAL	GLY	GLY	GLN	ALA	PHE	***										
C	C	G	T	C	T	T	G	G	T	A	G	G	T	A	T	T	G	C	A	G	G
	941				951	R7a/6b		961			971			981	Z5/8				991	H1nor mRNA end	
F	G	G	A	T	A	A	T	T	A	T	G	T	C	T	A	A	T	T	C	A	A
	1001				1011			1021	H12/10			1031			1041					1051	
F	LEU	GLY	PHE	LEU	ALA	GLY	GLN	ILE	GLY	ARG	LEU	ILE	THR	ILE	SER	THR	THR	PRO	VAL	ILE	
C	C	T	T	G	C	T	T	G	C	T	T	G	C	T	T	A	T	T	A	C	C
	1061				1071			1081			1091			1101			1111	Y3/2	1111		
F	ALA	GLY	ASP	SER	PHE	GLU	MET	ASP	ALA	VAL	GLY	ALA	LEU	ARG	LEU	SER	PRO	LEU	ARG	ARG	
C	G	C	T	G	C	G	A	C	T	C	T	C	G	T	C	T	T	T	C	C	A
	1121				1131			1141		H10/7		1151			1161					1171	
	F1/14b				T3/1																

Рис. 12.6 (продолжение).

F	GLY	LEU	ALA	ILE	ASP	SER	THR	VAL	ASP	ILE	PHE	THR	PHE	TYR	VAL	PRO	HIS	ARG	HIS	VAL	
	<u>B G C C</u>	T T G C T A T T	<u>G A C T C</u>	T A C T G T A G A C A T T	T T T A C T T T T A T G T C C C T C A T C G T C A C G T T																
	28/4	1181	F146/2	1191	1201					1211					1221					1231	
F	TYR	GLY	GLU	GLN	TRP	ILE	LYS	PHE	MET	LYS	ASP	GLY	VAL	ASN	ALA	THR	PRO	LEU	PRO	THR	
	T A T <u>G G T G A</u> A C A G T T G G A T T A A G T T C A T G A A G G A T G G T G T T A A T G C C A C T C T C T C C C G A C T																				
	Q1/3c	1241				1251				1261				1271			1281			1291	
F	VAL	ASN	THR	THR	GLY	TYR	ILE	ASP	HIS	ALA	ALA	PHE	LEU	GLY	THR	ILE	ASN	PRO	ASP	THR	
	<u>G T T A A C A</u> C T A C T A C T G G T T A T A T T G A C C A T G C C G C T T T T C T T G G C A C G A T T A A C C C T G A T A C C																				
	R6b/1	1301				1311				1321				1331			1341			1351	
F	ASN	LYS	ILE	PRO	LYS	HIS	LEU	PHE	GLN	GLY	TYR	LEU	ASN	ILE	TYR	ASN	ASN	TYR	PHE	LYS	
	A A T A A A A T C C T A A G C A T T G T T T C A G G G T T A T T T B A A T A T C T A T A A C A A C T A T T T T A A A																				
		1361				1371				1381				1391			1401			1411	
F	ALA	PRO	TRP	MET	PRO	ASP	ARG	THR	GLU	ALA	ASN	PRO	ASN	GLU	LEU	ASN	GLN	ASP	ASP	ALA	
	<u>G C G C</u> C G T G G A T G C C T G A C C C T A C C G A G G C T A A C C C T A A T G A G C T T A A T C A G A G A T G A T G C T													1451	<u>A G C T</u>	T A A T C A G A G A T G A T G C T					
	H7/5	1421				1431				1441				1451	A1/12c	1461				1471	
F	ARG	TYR	GLY	PHE	ARG	CYS	CYS	HIS	LEU	LYS	ASN	ILE	TRP	THR	ALA	PRO	LEU	PRO	PRO	GLU	
	C G T T A T G G T T T C C G T T G C T G C C A T C T C A A A A A C A T T T G G A C T G C T C C G C T T C C T C C T G A G																				
		1481				1491				1501				1511			1521			1531	
F	THR	GLU	LEU	SER	ARG	GLN	MET	THR	THR	SER	THR	THR	SER	ILE	ASP	ILE	MET	GLY	LEU	GLN	
	A C T G <u>A G C T</u> T T C T C G C C A A A T G A C G A C T T C T A C C C A C A T C T A T T G A C A T T A T G G G T C T G C T A A																				
	A12c/13	1541				1551				1561				1571			1581			1591	
F	ALA	ALA	TYR	ALA	ASN	LEU	HIS	THR	ASP	GLN	GLU	ARG	ASP	TYR	PHE	MET	GLN	ARG	TYR	HIS	
	<u>G C T G</u> C T T A T G C T A A T T T G C A T A C T G A C C A G A A C G B T G A T T A C T T C A T B C A G C G T T A C C A Y																				
	A13/2	1601				1611				1621				1631			1641			1651	
F	ASP	VAL	ILE	SER	SER	PHE	GLY	GLY	LYS	THR	SER	TYR	ASP	ALA	ASP	ASN	ARG	PRO	LEU	LEU	
	G A T G T T A T T T <u>C I T</u> C A T T T G G A G G T A A A A C C T C T T A T G A C G C T G A C A A C C G T C C T T T A C T Y T																				
	1661	X3/4	1671			1681				1691				1701			1711			1721	
F	VAL	MET	ARG	SER	ASN	LEU	TRP	ALA	SER	GLY	TYR	ASP	VAL	ASP	GLY	THR	ASP	GLN	THR	SER	
	B T C A T <u>G C G C</u> T T C T A A T C T C T G G G C A T C T G G C C T A T G A T G T T G A T G B A A C T G A C C A A A C G T C G																				
	H5/9c	1721				1731				1741				1751			1761			1771	
F	LEU	GLY	GLN	PHE	SER	GLY	ARG	VAL	GLN	GLN	THR	TYR	LYS	HIS	SER	VAL	PRO	ARG	PHE	PHE	
	T T A <u>B G C C A</u> G T T T C T B G T C G T G T T C A A C A G A C C T A T A A A C A T T C T G T B C C G C G T T T C T Y T																				
	Z4/1	1781				1791				1801				1811			1821			1831	
F	VAL	PRO	GLU	HIS	GLY	THR	MET	PHE	THR	LEU	ALA	LEU	VAL	ARG	PHE	PRO	PRO	THR	ALA	THR	
	G T T C C T G A G C A T B S C A C T A T B T T A C T C T T <u>B C G C</u> T T T G T T T T C C G C C T A C T G C G A C T																				
		1841				1851				1861	H9a/8a			1871			1881			1891	
F	LYS	GLU	ILE	GLN	TYR	LEU	ASN	ALA	LYS	GLY	ALA	LEU	THR	TYR	THR	ASP	ILE	ALA	GLY	ASP	
	A A A B A G A T T C A B T A C C T T A A C G C T A A A G G T G C T T T G A C T A T A C C G A T A T G C T B G C G A C																				
	1901	F2/11	1911			1921				1931				1941			1951			1961	
F	PRO	VAL	LEU	TYR	GLY	ASN	LEU	PRO	PRO	ARG	GLU	ILE	SER	MET	LYS	ASP	VAL	PHE	ARG	SER	
	C C T G T T T T G T A T B G C A A C T T B C C G C C G C G T G A A A T T T C T A T G A A G G A T G T T T C C G T T C T																				
	1961		1971			1981				1991				2001			2011			2021	
F	GLY	ASP	SER	SER	LYS	LYS	PHE	LYS	ILE	ALA	GLU	GLY	GLN	TRP	TYR	ARG	TYR	ALA	PRO	SER	
	<u>B G T G A T T C</u> G T C T A A G A A B T T A A G A T T G C T G A G G G T C A G T G G T A T C G T A T <u>G C G C</u> C C T T C G																				
	Q3c/6	F11/7	2021			2031				2041				2051			2061		H8a/6	2071	
F	TYR	VAL	SER	PRO	ALA	TYR	HIS	LEU	LEU	GLU	GLY	PHE	PRO	PHE	ILE	GLN	GLU	PRO	PRO	SER	
	T A T G T T T C C T B C T T A T <u>C A C C</u> T T C T T G A A B G C T T C C C A T T C A T T C A G S A A C C G C C T T C T																				
	2081		2091			2101				2111				2121			2131			2141	
F	GLY	ASP	LEU	BLN	GLU	ARG	VAL	LEU	ILE	ARG	HIS	HIS	ASP	TYR	ASP	GLN	CYS	PHE	GLN	SER	
	<u>G G T B A</u> T T T B C A A G A A C G C G T A C T T A T T C G C C A C C A T G A T T A T G A C C A B T B T T T C C A B T C C																				
	Q7/3b	2141				2151				2161				2171			2181			2191	
F	VAL	GLN	LEU	LEU	BLN	TRP	ASN	SER	GLN	VAL	LYS	PHE	ASN	VAL	THR	VAL	TYR	ARG	ASN	LEU	
	G T T C A G T T B T T G C A B T B B A A T A S T C A G G T A A A T T T A A T B T B A C C G T T A T C B C A A T C T G																				
	2201		2211			2221				2231				2241			2251			2261	
F	PRO	THR	THR	ARG	ASP	SER	ILE	MET	THR	SER	***										
	C C G A C C A C T C G C <u>G A T T C</u> A A T C A T G A C T T C G T G A T A A A G A T T G A G T G T G A G G T T A T A A C G																				
	2261		F7/5b	2271		2281				2291				2301			2311			2321	
	C C G A A G C G G T A A A A T T T T A A T T T T G C C G C T G A G G G G <u>G T T G A C C A A G C G A A G C G C G G T A G</u>																				
	2321		2331			2341				2351	R1/9			2361			H6/3			2371	

Рис. 12.6 (продолжение).

G	G T T T T C T G C T T A G G A G T T T A A T C A T G T T T C A G A C T T T T A T T T C T C G C C A T A A T T C A A A C T	MET	PHE	GLN	THR	PHE	ILE	SER	ARG	HIS	ASN	SER	ASN	PHE																						
	2381	2391	2401	2411	2421								2431																							
G	T T T T T C T G A T A A G C T G B T T T C T A C T T C T G T T A C T C C A G C T T C T T C G B C A C C T G T T T T A C	PHE	SER	ASP	LYS	VAL	LEU	THR	SER	VAL	THR	PRO	ALA	SER	SER	ALA	PRO	VAL	LEU	GLN																
	2441	A2/16	2451	2461	2471	A16/15a	M6/10	2481					2491																							
G	A G A C A C C T A A G C T A C A T C C G T C A A C G G T T A T A T T T G A T A G T T T G A C G G T T A A T G C T G G T A	THR	PRO	LYS	ALA	THR	SER	SER	THR	LEU	TYR	PHE	ASP	SER	LEU	THR	VAL	ASN	ALA	GLY	ASN															
	2501	A15a/3	2511	R9/10	2521	2531	2541	2551					2561						2571	2581	2591	2601	2611													
G	A T G G T G G T T T C T T C A T T G C A T T C A G A T G G A T A C A T C T G T C A A C G C C C G C T A A T C A G G T T G	GLY	GLY	PHE	LEU	HIS	CYS	ILE	GLN	MET	ASP	THR	SER	VAL	ASN	ALA	ALA	ASN	GLN	VAL	VAL															
	2561	H10/9	2571		2581	2591	R10/2	2601					2611										2621	2631	2641	2651	2661	2671	2681	2691	2701	2711	2721	2731		
G	T T T C T G T T G T G T G C T G A T T T G C T T T T G A T G C C G A C C C T A A A T T T T T G C C T G T T T G T T C	SER	VAL	GLY	ALA	ASP	ILE	ALA	PHE	ASP	ALA	ASP	PRO	LYS	PHE	PHE	ALA	CYS	LEU	VAL	ARG															
	2621		2631		2641		2651		2661				2671																							
G	G C T T T G A G T C T T C T T C G G T T C C G A C T A C C C T C C G A C T G C C T A T G A T G T T A T C C T T T G A	PHE	GLU	SER	SER	SER	VAL	PRO	THR	THR	LEU	PRO	THR	ALA	TYR	ASP	VAL	TYR	PRO	LEU	ASN															
	2681	F5b/8	H9/2	2691	2701	2711	2721	2731																												
G	A T G G T C G C C A T G A T G G T G G T T A T A T A C C G T C A A G G A C T G T G T G A C T A T T G A C G T C C T T C	GLY	ARG	HIS	ASP	GLY	GLY	TYR	TYR	THR	VAL	LYS	ASP	CYS	VAL	THR	ILE	ASP	VAL	LEU	PRO															
	2741		2751		2761		2771		2781				2791																							
G	C C C G T A C G C C G G C A A T A A C G G T T T A T G T T G G T T T C A T G T T T G G T T G G T T C T A A C C T T A C C G C T A	ARG	THR	PRO	GLY	ASN	ASN	VAL	TYR	VAL	GLY	PHE	MET	VAL	TRP	SER	ASN	PHE	THR	ALA	THR															
	2801	Y2/5	2811	2821	2831	2841	2851																													
G	C T A A A T G C C G C G G A T T G T T C G C T G A A T C A G G T T A T T A A A G A G A T T A T T T G T C T C C A G C	LYS	CYS	ARG	GLY	LEU	VAL	SER	LEU	ASN	GLN	VAL	ILE	LYS	GLU	ILE	ILE	CYS	LEU	GLN	PRO															
	2861		2871		2881	F8/4	2891	2901	2911																											
E																																				
C	C A C T T A A G T G A B B T B A T T T A T G T T T G G T G C T A T T G C T G G C G G T A T T G C T T C T B C T C T T G C	LEU	LYS	***																																
	2921	Q3b/4	2931	2941	2951	2961	2971																													
E	T G G T G B C G C C A T B T C T A A A T T G T T T G G A G G C G G T C A A A A G C C G C C T C C B R T G G C A T T C A	GLY	GLY	ALA	MET	SER	LYS	LEU	PHE	GLY	GLY	GLY	GLN	LYS	ALA	ALA	SER	GLY	GLY	ILE	GLN															
	2981	R3/2	2991	3001	3011	3021	Y5/4	3031																												
E	A B G T G A T G T G C T T B C T A C C B A T A A C A A T A C T G T A G G C A T B G T G A T G C T G T A T T A A T C	GLY	ASP	VAL	LEU	ALA	THR	ASP	ASN	ASN	THR	VAL	GLY	MET	GLY	ASP	ALA	GLY	ILE	LYS	SER															
	3041	Q6/7	3051	3061	3071	Q7/2	3081	3091																												
E	T G C C A T T C A A B B C T C T A A T T T C C T A A C C C T G A T G A B G C C G C C C T A G T T T G T T C T G B	ALA	ILE	GLN	GLY	SER	ASN	VAL	PRO	ASN	PRO	ASP	GLU	ALA	ALA	PRO	SER	PHE	VAL	SER	GLY															
	3101	3111	3121	3131	Z1/2	3141	3151																													
E	T G C T A T G C T A A A G C T G G T A A A G G A C T C T T G A A G G T A C G T T G C A G B C T G G C A C T T C T G C	ALA	MET	ALA	LYS	ALA	GLY	LYS	GLY	LEU	LEU	GLU	GLY	THR	LEU	GLN	ALA	GLY	THR	SER	ALA															
	3161	A3/9	3171	3181	3191	3201	3211																													
E	C B T T T C T B A T A A B T T G C T T B A T T T G B T T G G A C T T B B T G G C A A G T C T G C C G C T B A T A A A G G	VAL	SER	ASP	LYS	LEU	LEU	ASP	LEU	VAL	GLY	LEU	GLY	GLY	LYS	SER	ALA	ALA	ASP	LYS	GLY															
	3221	3231	3241	3251	3261	3271																														
E	A A A B B A T A C T C B T B A T T A T C T T G C T G C A T T T C C T G A G C T A A T A T G C T T B G G A B C G T G C	LYS	ASP	THR	ARG	ASP	TYR	LEU	ALA	ALA	ALA	PHE	PRO	GLU	LEU	ASN	ALA	TRP	GLU	ARG	ALA															
	3281	3291	3301	3311	A9/12d	3321	3331																													
E	T G G T B C T B A T G C T T C C T C T G C T G B T A T G S T T G A C G C C R G A T T T G A B A A T T G A A A A A G A G C T	GLY	ALA	ASP	ALA	SER	SER	ALA	GLY	MET	VAL	ASP	ALA	GLY	PHE	GLU	ASN	GLN	LYS	GLU	LEU															
	3341	3351	3361	R2/6a	Y4/1	3371	3381	F4/14a	3391	A12d/7c																										
H	T A C T A A A A T G C A A C T B B A C A A T C A G A A A B A G A T T B C C G A G A T G C A A A T G A B A C T C A A A A	THR	LYS	MET	GLN	LEU	ASP	ASN	GLN	LYS	GLU	ILE	ALA	GLA	MET	GLN	ASN	GLU	THR	GLN	LYS															
	3401	3411	3421	3431	3441	3451																														
H	A G A G A T T G C T B B C A T T C A B T C B B C B A C T T C A C G C C A G A A T A C G A A A G A C C A B B T A T A T G C	GLU	ILE	ALA	GLY	ILE	GLN	SER	ALA	THR	SER	ARG	GLN	ASN	THR	LYS	ASP	GLN	VAL	TYR	ALA															
	3461	3471	3481	3491	3501	3511																														

Рис. 12.6 (продолжение).

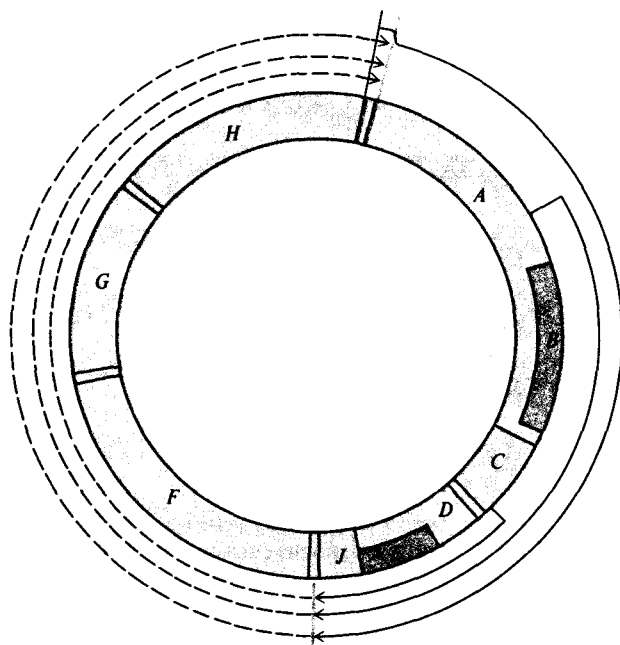
H	GLN	ASN	GLU	MET	LEU	ALA	TYR	GLN	GLN	LYS	GLU	SER	THR	ALA	ARG	VAL	ALA	SER	ILE	MET
	A C A A A A T G A G A T T G C T T G C T T A T C A A C A G A A G <u>G A G T C T</u> A C T G C T C G C G T T G C G T C T A T T A T																			
	3521		3531			3541				3541		F12/10	3551			3561			3571	
H	GLU	ASN	THR	ASN	LEU	SER	LYS	GLN	GLN	GLN	VAL	SER	GLU	ILE	MET	ARG	GLN	MET	LEU	THR
	G G A A A A C A C C A A T C T T T C C A A B C A A C A G C A G B B T T T C C G A G A T T A T <u>G C G C C A A</u> A T G C T T A C																			
	3581		3591			3601				3611			3621		H2/9b				3631	
H	GLN	ALA	GLN	THR	ALA	GLY	GLN	TYR	PHE	THR	ASN	ASP	GLN	ILE	LYS	GLU	MET	THR	ARG	LYS
	T C A <u>A G C T</u> C A A A C B G C T B B T C A B T A T T T T A C C A A T G A C C A A A T C A A A G A A A T <u>G A C T C G C A A</u>																			
	A7c/8	3641		3651		3661			3671				3681			3691		F10/15	3701	
H	VAL	SER	ALA	GLU	VAL	ASP	LEU	VAL	HIS	GLN	GLN	THR	GLN	ASN	GLN	ARG	TYR	GLY	SER	SER
	G G T T A G T G C T G A B B <u>T T B A C T</u> T T A B T T C A T C A B C A A A C G C G A A A T C A G C G G T A T G G C T C T T C																			
	3701			H6a/4	3711			3721				3731	F13/5c		3741				3751	
H	HIS	ILE	GLY	ALA	THR	ALA	LYS	ASP	ILE	SER	ASN	VAL	VAL	THR	ASP	ALA	ALA	SER	GLY	VAL
	T C A T A T T G <u>G C G C T</u> A C T A C T C A A A B B A T A T T T C T A A T G T C G T C A C T B A T G C T G C T T C T G G T G T																			
	3761			3771		3781			3791			3791			3801				3811	
			H9b/1																	
H	VAL	ASP	ILE	PHE	HIS	GLY	ILE	ASP	LYS	ALA	VAL	ALA	ASP	THR	TRP	ASN	ASN	PHE	TRP	LYS
	G G T T G A T A T T T T T C A T B B T A T T S A T A A A <u>G C T</u> G T T G C C G A T A C T T G G A A C A A A T T T C T G G A A																			
	3821		3831			3841		A9/14	3851			3861			3871				3881	
H	ASP	GLY	LYS	ALA	ASP	GLY	ILE	GLY	SER	ASN	LEU	SER	ARG	LYS	***					
	A G A C G G T A A A <u>G C T</u> B A T B G T A T T G C T C T A A T T T G T C T A G G A A A T A A																			
	3891		A14/7b	3901		3901		3911												

Рис. 12.6 (продолжение).

обнаружено, что между генами *D* и *F* находится неизвестный ранее ген *J*, кодирующий относительно небольшой белок (этот белок был также обнаружен в клетках, зараженных фагом). В-третьих, положение границ между генами в двух случаях оказалось отличным от того, которое было предсказано генетической картой. Мутации, на основании которых была построена генетическая карта, расположены таким образом, что только с их помощью было бы невозможно обнаружить, что ген *B* локализуется внутри последовательности гена *A*, а ген *E* аналогичным образом заключен внутри гена *D* (рис. 12.7). Таким образом, удалось объяснить казавшееся совершенно парадоксальным наблюдение о том, что общее число аминокислотных остатков в последовательностях всех белков, кодируемых фХ174, превышает теоретически достижимую кодирующую емкость последовательности, содержащей 5386 нуклеотидов. Перекрывание в одной цепи нуклеотидных последовательностей, кодирующих совершенно различные аминокислотные последовательности, обеспечивается трансляцией соответствующих мРНК в различных рамках считывания. Это достигается за счет наличия дополнительных сайтов связывания с рибосомами, необходимых для инициации синтеза новой полипептидной цепи, которые локализованы внутри транскрибуемых участков мРНК генов *A* и *D*.

Локализация транскрипционных единиц генома фХ174, помеченных на рис. 12.7, установлена на основании имеющихся данных о характерных последовательностях промоторных участков ДНК (см. гл. 15). Поскольку в последовательности перед геном *B* находятся два промоторных участка, то не исключено, что белки, продукты генов *A* и *B*, в действительности транскрибируются с различных мРНК-транскриптов. Однако в случае перекрывающихся генов *E* и *D* имеется только один доступный общий промотор, и, следовательно, для синтеза белка *D* используется та же молекула мРНК, что и для синтеза белка *E*. Расположение участков терминирования транскрипции, также отмеченных на рис. 12.7, свидетельствует о том, что в действительности все мРНК-транскрипты генома фХ174 являются *полицистронными*, т.е. кодируют

Рис. 12.7. Физическая карта генома фХ174. Показана локализация цистронов, кодирующих известные белки фХ174. Обратите внимание на перекрытие цистронов *A* и расположенного внутри него *B*, а также цистронов *D* и *E*. Черным отмечено расположение трех промоторов и размеры образующихся транскриптов. Между цистронами *H* и *A* находится очень эффективный терминатор. Между цистронами *J* и *F* располагается малоэффективный терминатор, допускающий с заметной частотой продолжение транскрипции за область локализации этого терминатора. Положение терминаторных участков показано цветными линиями.



более одного белка даже в тех случаях, когда нуклеотидные последовательности соответствующих структурных генов не перекрываются. В принципе, исходя из строения генома фХ174, можно допустить, что в нем закодирована структура еще одного белка — продукта гена *K*, включенного внутрь гена *A* и перекрывающего конец этого гена и начало гена *C*. Однако до сих пор этот белок не удалось обнаружить ни в инфицированных клетках, ни при изучении мутантных фагов. В то же время в клетках, инфицированных близкородственным фагом G4, помимо набора белков, гомологичных всем известным белкам фХ174, был идентифицирован и фаговый белок, гомологичный гипотетическому продукту гена *K*.

Другим довольно неожиданным фактом оказался наблюдаемый в клетках, зараженных фХ174, синтез дополнительного белка *A**. Функция этого белка неизвестна, однако известно, что его аминокислотная последовательность совпадает с С-концевой половиной последовательности белка, кодируемого геном *A*. Белок *A** считывается с мРНК-транскрипта гена *A*, который содержит дополнительный внутренний сайт связывания с рибосомой, расположенный (как показано на рис. 12.6) на подходящем расстоянии от триплета AUG, который таким образом может выступать в роли дополнительного инициаторного кодона. Синтез белка *A** происходит с использованием в качестве матрицы той же мРНК в той же рамке считывания, что и для белка *A*.

Определение нуклеотидной последовательности генома фХ174 позволило существенно расширить представления об используемых в при-

роде способах записи и реализации генетической информации. Дальнейшие исследования показали, что обнаруженные особенности организации генома фХ174 вовсе не уникальны. Так, в геноме фага λ были обнаружены перекрывающиеся гены, транслируемые как со сдвигом рамки, так и в той же рамке, аналогично генам A и A^* фХ174. Судя по всему, перекрывающиеся гены представляют собой хотя и необычный, но все же довольно распространенный элемент организации генома. Их происхождение может быть связано с процессом эволюции молекул ДНК, на котором в определенных ситуациях могли начать сказываться ограничения на физический размер генома.

Генетические факторы, влияющие на трансляцию кода

Процесс трансляции нуклеотидной последовательности ДНК в аминокислотные последовательности белков осуществляется с помощью сложнейшей биохимической машины. Структура основных составляющих этой машины также закодирована в ДНК в виде генов тРНК, рибосомных РНК, рибосомных белков и т.п. Эти гены так же, как и любые другие, подвержены мутациям, что дает генетикам возможность использовать такого рода мутации в качестве инструментов для непосредственного изучения механизма трансляции. Те мутации, которые вносят серьезные нарушения в процесс трансляции, без сомнения, должны быть летальными. Однако удается обнаружить и условно-летальные мутации, и такие мутации, которые лишь незначительно сказываются на общем ходе трансляции. Мутации этого типа довольно часто оказываются супрессирующими по отношению к каким-либо другим трансляционным мутациям.

Мы уже встречались с *внутригенными* супрессорами мутации сдвига рамки, которые сами по себе оказываются также мутациями сдвига рамки. Внутригенные супрессорные мутации другого типа наблюдаются при образовании псевдоревертантов, обсуждавшихся ранее (см. рис. 12.5). Эти мутации затрагивают тот же кодон, что и первичные мутации, и приводят к тому, что исходная аминокислота оказывается заменена на отличную от нее, но также подходящую (для функционирования данного полипептида) аминокислоту.

Мутации, влияющие непосредственно на работу трансляционного аппарата, как правило, затрагивают гены, отличные от тех генов, которые содержат исходные супрессирующие мутации. Супрессирующие мутации такого рода называют *внегенными* супрессорами. Для них, как правило, характерна аллельная специфичность. Мутации типа *amber*, *ochre* и *opal*, приводящие к возникновению терминаторных кодонов, относятся к классу условно-летальных. Их можно различить по избирательному восстановлению жизнеспособности соответствующих мутантов в системах, несущих специфические супрессорные гены (табл. 7.1). Первые успехи были достигнуты при изучении природы *amber*-супрессоров. Их можно получать из Su^- -штаммов, обрабатывая мутагенами, индуцирующими нуклеотидные замены. Действие *amber*-супрессоров сводится к предотвращению преждевременной терминации трансляции,

Таблица 12.8. Химические и генетические свойства пяти различных *amber*-супрессоров

<i>Amber</i> -супрессор	Включающаяся аминокислота	Синтез белка (в % по отношению к дикому типу)	<i>Ochre</i> -супрессор
<i>su1</i> ⁺	Ser	28	—
<i>su2</i> ⁺	Gln	14	—
<i>su3</i> ⁺	Тур	55	—
<i>su4</i> ⁺	Тур	16	+
<i>su5</i> ⁺	Lys	5	+

По *Garen A.* (1968). *Science*, **160**, 149.

которая происходит на возникших в результате *amber*-мутаций дополнительных терминаторных кодонах с помощью подстановки определенной аминокислоты. Известно несколько различных *amber*-супрессоров, в присутствии которых вместо терминации на *amber*-кодоне может происходить подстановка той или иной аминокислоты (табл. 12.8).

Мутации, супрессирующие *nonsense*-мутации, происходят в генах тРНК. Так, *amber*-супрессия *su3*⁺, выражающаяся в подстановке тирозина в положение, соответствующее кодону UAG, проявляется в штаммах, несущих мутацию в антикодонном участке гена тРНК^{Тур}. Обычный антикодон тРНК^{Тур} — это GUA, который, согласно правилам неоднозначного соответствия, узнает тирозиновые кодоны UAC^U. тРНК^{Тур} штамма *su3*⁺ несет антикодон CUA, который «узнает» *amber*-кодон UAG, и благодаря этому вместо терминации трансляции происходит включение в полипептидную цепь остатка тирозина (рис. 12.8). Однако не все *nonsense*-супрессоры возникают в результате мутаций в антикодонном участке генов тРНК. Так, *opal*-супрессия, при которой терминаторный кодон UGA узнается как дополнительный сигнал включения

Рис. 12.8. Структура тРНК^{Тур} *E. coli*. Показана последовательность антикодона CUA измененной тРНК^{Тур}, придающей клеткам способность к *amber*-супрессии. Нормальный тирозиновый антикодон имеет строение G*UA (знак * означает, что имеет место посттранскрипционная модификация соответствующего основания). (По *Goodman H. et al.* 1968, *Nature* **217**, 1019.)

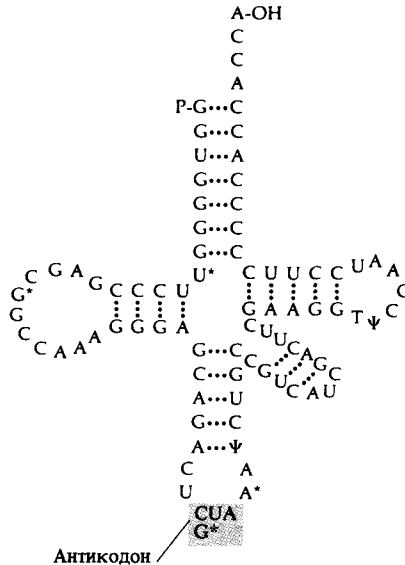
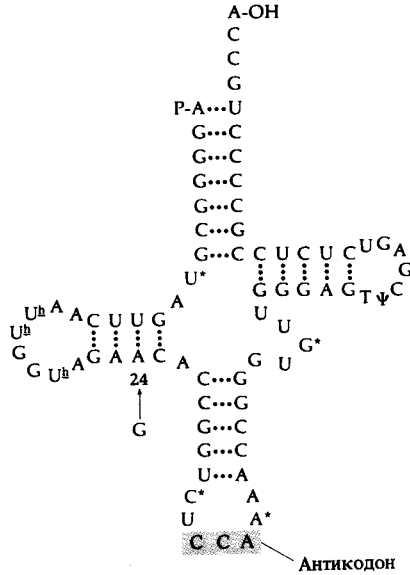


Рис. 12.9. Структура тРНК^{Трп} из *opal*-супрессорного штамма *E. coli*. Она отличается от структуры аналогичной тРНК из бессупрессорного штамма тем, что в положении 24 остаток G заменен на A. (Основания, помеченные звездочкой, подвергаются посттранскрипционной модификации.) (По *Hirsh D.* 1971. *J. Mol. Biol.*, 58, 439.)



триптофана, возникает в результате мутации в дигидроурациловой петле тРНК^{Трп}, которая по-прежнему сохраняет нормальный антикодон ССА, в норме узнающий триптофановый кодон UGG (рис. 12.9). Таким образом, правильное узнавание при трансляции кода зависит не только от комплементарности антикодонового участка, но и от структуры других участков молекулы тРНК.

Известны и внегенные супрессоры *missense*-мутаций, которые также возникают в результате мутаций, влияющих на способность молекул определенных тРНК узнавать соответствующие кодоны. Например, одна из мутаций (*trpA36*) в гене триптофансинтазы *E. coli* приводит к замене глицина в положении 211 на остаток аргинина (рис. 11.6). При этом глициновый кодон GGA превращается в аргининовый кодон AGA. Супрессорная мутация *suA36* затрагивает ген, кодирующий тРНК^{Gly}, которая в норме имеет антикодон UCC. Мутантная *suA36*-тРНК^{Gly} содержит антикодон UCU, в результате чего мутантный *trpA36*-кодон AGA может считываться уже не как аргининовый, а как глициновый.

Возникает вопрос: как же может выжить клетка, несущая ген супрессорной тРНК, если при этом так изменяются свойства необходимой для нормального функционирования исходной тРНК, что правильное узнавание некоторых кодонов или правильная терминация белкового синтеза оказываются невозможными? Ответ на этот вопрос, вероятно, должен иметь двойственную природу. Во-первых, в случае мутации типа *su3+* соответствующий штамм не лишается нормальной тРНК^{Тур}. Эта мутация происходит в клетках, содержащих дублированный ген тРНК^{Тур}, и, таким образом, образующийся супрессорный штамм содержит как нормальную, так и мутантную тРНК^{Тур}. Во-вторых, скорость роста у супрессорных, и в особенности *nonsense*-супрессорных, штаммов существенно меньше, чем у соответствующих бессупрессорных прототипов. По-видимому, самим фактом своего выживания эти штаммы обязаны тому, что мутантные тРНК в действительности являются не очень

эффективными супрессорами. Оценки эффективности супрессии *nonsense*-мутаций различными *amber*-супрессорами приведены в табл. 12.8. Эти супрессоры не слишком эффективно подавляют терминацию и все же позволяют клетке наработать достаточное количество активного белка (вероятно, всего лишь около 5% от нормы) для поддержания роста. Характерно, что и в отсутствие супрессии *nonsense*-мутации оказываются в той или иной степени подверженными «пробоям», т.е. преждевременная терминация происходит не со 100%-ной эффективностью. Известно, что различные *nonsense*-мутации характеризуются различиями в вероятности «пробоя», которая, по-видимому, определяется особенностями окружения в данной последовательности мРНК.

Процесс терминации на истинных терминаторных кодонах происходит также не со 100%-ной эффективностью. Некоторые мРНК в действительности содержат два tandemных терминаторных кодона (часто это кодоны различного типа) на конце кодирующей последовательности. Возникновение таких tandemных терминаторных сигналов в эволюционном отношении, вероятно, обусловлено необходимостью более надежно обеспечивать терминацию трансляции. В тех случаях, когда терминации трансляции на соответствующих кодонах не происходит, в результате «сквозной» трансляции кодонов, следующих за терминаторным сигналом, образуются белки с избыточной С-концевой последовательностью (*readthrough proteins*). Возможно, «сквозная» трансляция происходит при участии некоторой супрессорной активности, характерной для нормальных клеток, хотя генетическая природа этой активности окончательно еще не установлена. Образование белков с избыточной последовательностью играет определенную роль при обычной инфекции фагами λ и Q β . В ретикулоцитах кролика была зарегистрирована сквозная трансляция β -глобиновой мРНК, функциональное значение которой пока неизвестно. Обнаружено, что проявляющаяся в ретикулоцитах UGA-супрессорная активность обусловлена наличием особого вида тРНК^{Trp}, способной подставлять триптофан в положение, соответствующее этому терминаторному кодону, и тем самым приводить к сквозной трансляции. Удавалось наблюдать сквозную трансляцию, проходящую через терминаторные кодоны UAG и UGA, но не через кодон UAA. Судя по всему, кодон UAA служит наиболее эффективным сигналом, используемым для терминации трансляции. Не исключено, что наблюдаемая в норме сквозная трансляция является проявлением еще одного, пока еще слабо изученного механизма, позволяющего дополнительно расширить возможности использования содержащейся в геноме информации.

В процессе обеспечения точности полипептидного синтеза принимают участие и рибосомы. Так, антибиотическое действие стрептомицина реализуется за счет связывания с одним из рибосомных белков и остановки синтеза белковой цепи. При низкой концентрации стрептомицина в среде клетки *E. coli* Str^S, несущие *nonsense*-мутации, приобретают способность к супрессии всех трех видов *nonsense*-кодонов. Мутации, в той или иной степени изменяющие структуру рибосом, оказывают влияние на точность трансляции. Так, Str^R-мутанты *E. coli* обладают измененным 30S-рибосомным белком, благодаря которому заметно повышается эффективность преждевременной терминации трансляции на возникших в результате мутаций *nonsense*-кодонах. Другая мутация, *ram* (*ribosomal ambiguity mutation*), действует на тот же 30S-

рибосомный белок и повышает частоту «пробоя» *nonsense*-мутаций. В клетках, несущих *nonsense*- или *missense*-супрессоры, мутация *gam* повышает эффективность супрессии.

Таким образом, можно отметить, что, помимо обычных антикодон-кодоновых взаимодействий, существует еще целый ряд факторов, влияющих на процесс считывания кодонов с мРНК. Точность образования пары антикодон—кодон зависит от структуры участков молекулы тРНК, расположенных за пределами антикодоновой петли, и от структуры определенных участков рибосомы. Кроме того, в соответствии с гипотезой Крика образование системы водородных связей между антикодонами и кодонами не является строго однозначным, т.е. допускает определенное разнообразие структур соответствующих элементов. На все эти факторы могут влиять мутации, возникающие в генах, кодирующих структуру любых компонентов трансляционного аппарата.

В ходе эволюции у прокариотических и эукариотических организмов сформировались системы биосинтеза белка, которые по структурной организации существенно отличаются друг от друга. С учетом этого обстоятельства, а также того, что сам процесс узнавания кодонов может подвергаться определенным генетически обусловленным модификациям, можно только удивляться тому, что как прокариоты, так и эукариоты используют совершенно идентичный генетический код, представленный в табл. 12.1. Универсальность генетического кода—наиболее серьезное подтверждение эволюционных предположений, согласно которым все организмы произошли от одного общего предка. Именно поэтому весьма неожиданным оказалось, что генетический код митохондрий, как было впервые установлено в 1979 г., характеризуется отличиями от обычных значениями некоторых кодонов и некоторыми особыми правилами узнавания кодонов.

Генетический код митохондрии

Методы клонирования и секвенирования ДНК позволили провести тщательный сравнительный анализ генетической организации митохондриальных геномов у целого ряда организмов, от грибов до человека. Определение полной нуклеотидной последовательности человеческой митохондриальной ДНК, содержащей 16 569 нуклеотидных пар, было завершено в 1981 г. Известны также частичные последовательности митохондриальных геномов быка, дрожжей и *Neurospora*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что митохондриальные геномы высших и низших эукариот, кодирующие примерно один и тот же набор функций, в то же время характеризуются различиями в смысловом значении некоторых кодонов, в правилах антикодон-кодонового узнавания и существенными различиями в общей структурной организации. Можно полагать, что существенным фактором эволюции митохондриальных геномов была селекция на максимальную структурную компактность при максимальной информационной нагруженности (см. *Дополнение 12.1*). Это, вероятно, достигалось за счет таких изменений генетического кода, которые позволили сократить необходимый для считывания набор тРНК. При этом митохондрии млекопитающих, характеризующиеся наиболее компактной организацией генома, подверглись соответ-

ственно более существенным эволюционным изменением, чем митохондрии грибов.

Генетический код, используемый в митохондриях, удалось расшифровать с помощью сопоставления аминокислотных последовательностей митохондриальных белков с соответствующими фрагментами нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК. Так, оказалось, что и у дрожжей, и у млекопитающих триптофан кодируется как триплетом UGG, так и триплетом UGA, который, согласно табл. 12.1, служит терминаторным кодоном. Например, в аминокислотной последовательности субъединицы II митохондриальной цитохром-с-оксидазы человека из пяти остатков триптофана три соответствуют кодону UGA, а два других – кодону UGG. Поэтому ясно, что кодон UGA в митохондриях человека не может выступать в роли терминатора трансляции. Расшифрованный таким образом генетический код, используемый в митохондриях человека, представлен в табл. 12.9. Среди других отличий от обычного универсального кода можно отметить то, что кодон AUA вместо изолейцина кодирует метионин, а триплеты AGA и AGG являются не аргининовыми кодонами, а сигналами терминации трансляции.

Анализ нуклеотидной последовательности митохондриального генома свидетельствует о том, что он содержит только 22 гена тРНК, что соответствует существенно меньшему разнообразию, чем в случае универсального кода, для считывания которого необходимо иметь 32 вида тРНК. Структура антикодонов митохондриальных тРНК указывает на то, что нескольким группам кодонов («четверкам», отмеченным в табл. 12.9) соответствует по одному виду тРНК. Первое положение антикодона в этих тРНК занимает остаток урацила, способный, таким образом, к образованию пары U:N с любым из четырех нуклеотидов в третьем положении кодона. Остальные кодоны группируются в «пары». Каждой из них соответствует один вид тРНК, в антикодоне которых первое положение занимает либо G (связывается с U или C, см. табл. 12.7), либо модифицированный остаток урацила, который может связываться только с A или G. В митохондриальной ДНК был идентифицирован только один ген, кодирующий тРНК^{Met}, в то время как в самих митохондриях удается обнаружить оба вида метионин-специфичной тРНК – тРНК^{Met}₁ и тРНК^{Met}. Происхождение митохондриальной тРНК^{Met} пока остается неизвестным. Судя по всему, инициация трансляции в митохондриях происходит как на обычном AUG-кодоне, так и на кодонах AUA и AUU. Для этого, по-видимому, необходимо, чтобы в антикодоне CAU произошла модификация C, позволяющая ему образовывать пары с G, A и U.

Аналогичные исследования генетического кода митохондриальных геномов дрожжей и *Neurospora* выявили определенные отличия как от универсального генетического кода, так и от кода, используемого в митохондриях человека. В митохондриях дрожжей и *Neurospora*, так же как и в человеческих митохондриях, триплет UGA считывается не как терминаторный, а как триптофановый кодон. В дрожжевом митохондриальном коде в отличие от всех остальных, включая универсальный, семейство триплетов типа CUN кодирует не лейцин, а треонин. Трансляция всего этого семейства, так же как и в митохондриях других организмов, осуществляется с помощью одного типа молекул тРНК, несущих антикодон UAG. Как в дрожжевых, так и в человеческих

Таблица 12.9. Генетический код митохондрий человека¹⁾

		Второе положение					
		U	C	A	G		
Первое положение	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
		UUC } Leu		UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
		UUA } Leu		UCA } Ser	UAA Ter	UGA } Trp	A
		UUG } Leu		UCG } Ser	UAG Ter	UGG } Trp	G
C	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC } Leu		CAC } His		CGC } Arg	C
		CUA } Leu		CAA } Gln		CGA } Arg	A
		CUG } Leu		CAG } Gln		CGG } Arg	G
A	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC } Ile		AAC } Asn		AGC } Ser	C
		AAA } Met		ACA } Thr	AAA } Lys	AGA Ter	A
		AUG } Met		ACG } Thr	AAG } Lys	AGG Ter	G
G	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
		GUC } Val		GAC } Asp		GGC } Gly	C
		GUA } Val		GAA } Glu		GGA } Gly	A
		GUG } Val		GAG } Glu		GGG } Gly	G

¹⁾ Цветом выделены кодоны, отличающиеся по значению от универсального кода (табл. 12.1). Отмечены семейства кодонов, каждое из которых считывается молекулами тРНК одного вида, содержащими остаток в первом положении.

митохондриях триплеты AG_G^A кодируют аргинин, а триплеты AUC^U —изолейцин. Однако у дрожжевых митохондрий для трансляции последней тройки кодонов используются однотипные молекулы тРНК, у которых в первом положении антикодона стоит не I, а G. Образование необычных пар в этом случае, вероятно, достигается за счет модификации остатка G антикодона. Для дрожжевого митохондриального генома характерно также наличие двух видов тРНК с антикодоном CAU—это тРНК^{Met} и тРНК_I^{Met}. Всего в митохондриях для трансляции кода используется 24 вида молекул тРНК.

Дрожжевой митохондриальный код характеризуется еще одним необычным свойством: ни один из его структурных генов не использует триплетов семейства CGN для кодирования аргинина в составе митохондриальных белков. В то же время в трансляционном аппарате дрож-

жевых митохондрий имеется тРНК, содержащая необычный остаток А в первом положении соответствующего антикодона АСG, который, вообще говоря, мог бы узнаваться триплетами семейства CGN. Пока еще неизвестно, происходит ли в действительности аминоацилирование тРНК этого типа аргинином.

Дополнение 12.1. Генетическая организация митохондриального генома

Митохондриальные геномы дрожжей и человека характеризуются очень сходными функциями и в то же время весьма существенными различиями в способах генетической организации. Оба генома кодируют рРНК, входящие в состав больших и малых рибосомных субъединиц, мРНК некоторых митохондриальных белков (большинство митохондриальных белков закодированы в ядерном геноме), а также набор тРНК, необходимых для считывания митохондриальных мРНК.

В митохондриальном геноме человека содержится информация о структуре лишь 13 белков, в их числе — три субъединицы цитохром-*c*-оксидазы, цитохром *b*, субъединица-6 митохондриальной АТФазы. Для восьми оставшихся белков с неизвестной функцией обнаружены только соответствующие гены, обозначаемые обычно символом *URF* (от англ. *unidentified reading frames* — неидентифицированные рамки считывания, см. рис. 12.10). В дрожжевом митохондриальном геноме закодировано несколько большее число белков. Помимо белков, аналогичных пяти вышеупомянутым, кодируются также субъединица-9 АТФазы, фермент сплайсинга, отвечающий за удаление интронов из предшественников мРНК (в ДНК митохондрий человека интроны отсутствуют), и еще несколько неидентифицированных белков, которые не удается совершенно однозначно сопоставить с *URF*-белками человека. Митохондриальная ДНК дрожжей содержит около 78 000 пар нуклеотидов (п. н.), в то время как человеческая митохондриальная ДНК — лишь 16 569. Как показано на рис. 12.10, организация мито-

хондриального генома человека более экономична чем структура митохондриального генома дрожжей. Такая экономия достигается не только благодаря отсутствию интронов в структурных генах, но также и за счет сведения к необходимому минимуму набора тРНК, существенного уменьшения размера рРНК [16SpРНК (1559 п. н.) по сравнению с 21SpРНК у дрожжей и 12SpРНК (954 п. н.) по сравнению с 15SpРНК у дрожжей]. Кроме того, в человеческой митохондриальной ДНК отсутствуют спейсерные участки, характерные для дрожжевого митохондриального генома, а в гене, кодирующем 16SpРНК, в отличие от соответствующего дрожжевого гена 21SpРНК нет интрона.

Транскрипция дрожжевой митохондриальной ДНК происходит при участии ряда различных промоторов. В то же время в транскрипции митохондриального генома человека участвуют только два промотора, по одному для каждой из двух комплементарных цепей ДНК. Как показано на рис. 12.11, обе цепи практически целиком транскрибируются в соответствующие цепи РНК. Эти первичные транскрипты далее подвергаются эндонуклеазному расщеплению с образованием зрелых молекул РНК. Любопытно, что в большинстве случаев между последовательностями, кодирующими мРНК и рРНК, без каких-либо промежуточных нуклеотидов располагаются последовательности, кодирующие тРНК, которые образуют как бы систему пунктуации для разграничения двух типов последовательностей. После точного вырезания

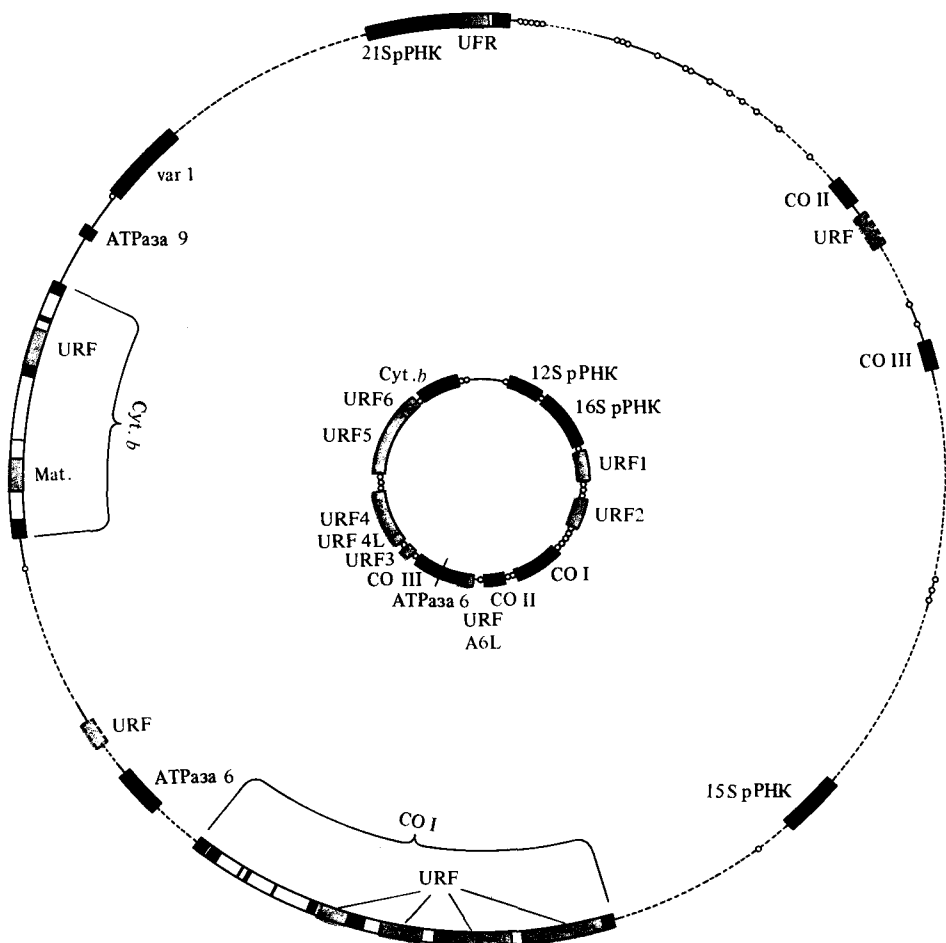


Рис. 12.10. Организация митохондриального генома дрожжей (внешнее кольцо) и человека (внутреннее кольцо). Фрагменты нуклеотидной последовательности с известными функциями отмечены черным. Интроны изображены в виде белых прямоугольников, за исключением тех случаев, когда в них содержатся открытые рамки считывания (URF), изображенные в виде цветных прямоугольни-

ков. Второй интрон, расположенный внутри гена дрожжевого цитохрома *b*, кодирует фермент сплайсинга или матуразу. Гены тРНК показаны белыми кружками. Пунктирными линиями отмечены фрагменты ДНК с неустановленной последовательностью. Дополнительные подробности см. в тексте. (По *Borst P., Grivell Z. A.* 1981. *Nature*, 290, 443.)

из первичного транскрипта к 3'-концу последовательности тРНК присоединяется акцепторный триплет ССА, завершающий структуру функционально активной молекулы тРНК. Зрелые молекулы мРНК формируются при полиаденилировании соответствующим образом процессированных предшественников. В челове-

ском митохондриальном геноме информация настолько сконцентрирована, что в последовательностях, кодирующих мРНК, как правило, частично удалены нуклеотиды, соответствующие 3'-концевым терминаторным кодоном. Доработка этих кодонов также достигается за счет присоединения дополнительных

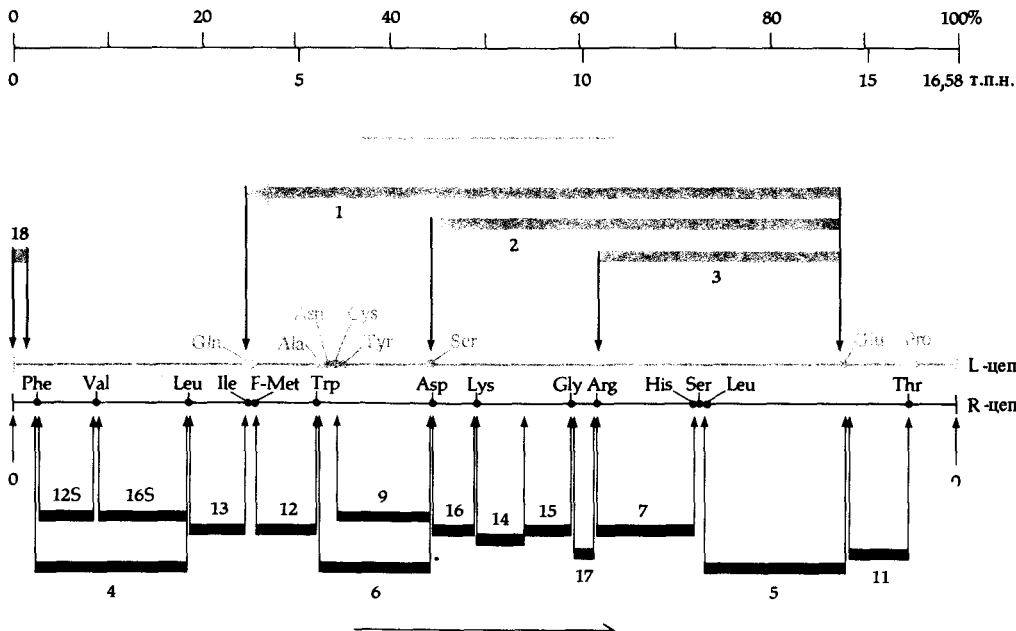


Рис. 12.11. Идентифицированные РНК-транскрипты комплементарных цепей ДНК человеческого митохондриального генома. Кольцевая карта генома линеаризована по точке начала репликации ДНК. Обозначения цепей отражают направление их транскрипции.

РНК-транскрипты, кодируемые Z-цепью (левосторонняя транскрипция), показаны цветными прямоугольниками, а транскрипты с R-цепи (правосторонняя транскрипция) — черными прямоугольниками. (По Ojala D., Montoya J., Attardi G. 1981. Nature, 290, 470.)

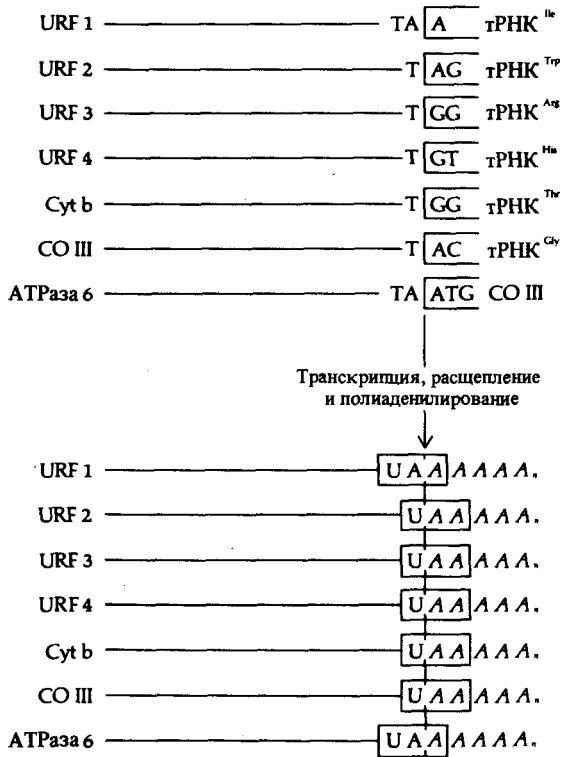


Рис. 12.12. Специфическое расщепление и полиаденилирование транскриптов с человеческой митохондриальной ДНК приводят к формированию терминаторных кодонов на концах последовательности молекул мРНК, показанных на рисунке. (По Anderson S. et al. 1981. Nature, 290, 457.) (Reprinted by permission. Copyright © 1981 — Macmillan Journals Limited.)

остатков А при полиаденилировании мРНК-предшественников в ходе их созревания (рис. 12.12).

Закономерно, что для митохондриальных геномов, функциональная роль которых сводится к обеспечению внутримитохондриального синтеза небольшого набора белков в условиях стабильного

внутриклеточного окружения самих митохондрий, в ходе эволюции возникла возможность развития необычных способов организации и выражения генетической информации. Дальнейшие исследования митохондрий других организмов, вероятно, позволят выявить новые, еще неизвестные пути реализации информационных возможностей генома.

Литература

- Anderson S. et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, **290**, 457–464.
- Barrell B. G., Bankier A. T., Drouin J.* (1979). A different genetic code in human mitochondria, *Nature*, **282**, 189–194.
- Borst P., Grivell L. A.* (1981). Small is beautiful—portrait of a mitochondrial genome, *Nature*, **290**, 443–444.
- Crick F. H. C. et al.* (1961). General nature of the genetic code for proteins, *Nature*, **192**, 1227–1232.
- Garen A.* (1968). Sense and nonsense in the genetic code, *Science*, **160**, 149–159.
- Geller A. I., Rich A.* (1980). A UGA termination suppression tRNA^{Trp} active in rabbit reticulocytes, *Nature*, **283**, 41–46.
- Goodman H. et al.* (1968). Amber suppression: a nucleotide change in the anticodon of a tyrosine transfer RNA, *Nature*, **217**, 1019–1024.
- Hendry L. B. et al.* (1981). First approximation of a stereochemical rationale for the genetic code based on the topography and physicochemical properties of “cavities” constructed from models of DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7440–7444.
- Hirsh D.* (1971). Tryptophan transfer RNA as the UGA suppressor, *J. Mol. Biol.*, **58**, 439–458.
- Lagerkvist U.* (1981). Unorthodox codon reading and the evolution of the genetic code, *Cell*, **23**, 305–306.
- Macino G. et al.* (1979). Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3784–3785.
- Nirenberg M. W., Matthaei J. H.* (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1588–1602.
- Piper P. W. et al.* (1977). Nonsense suppressors of *Saccharomices cerevisiae* can be generated by mutation of the tyrosine tRNA anticodon, *Nature*, **262**, 757–761.
- Sanger F. et al.* (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage $\phi \times 174$, *J. Mol. Biol.*, **125**, 225–246.
- The Genetic Code, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XXXI, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1966.

Ключевые слова и понятия

Бесклеточная система синтеза белка
 Внегенная супрессорная мутация
 Внутригенная супрессорная мутация
 Вырожденность кода
 Генетический код
 Инициаторный кодон
 Кодон

Митохондриальный генетический код
 Мутация со сдвигом рамки
nonsense-Мутация
 Перекрывающиеся кодирующие последовательности
 Правила неоднозначного соответствия
 Терминаторный кодон

Задачи

12.1. Почему нельзя ожидать, что внутригенные взаимно супрессирующие мутации сдвига рамки могут происходить в любых положениях внутри данного гена?

12.2. Синтетическая РНК получена сополимеризацией смеси UDP и CDP в молярном соотношении 1 : 4. С какими относительными частотами в этом сополимере будут встречаться различные кодоны? Какие аминокислоты будут включаться в состав полипептидов, образующихся в бесклеточной системе синтеза белка, с использованием этой синтетической матрицы?

12.3. Нуклеотидный состав ДНК различных организмов, в особенности микроорганизмов; варьирует в очень широких пределах. Так, в ДНК *Micrococcus lysodeikticus* относительное содержание (G + C) достигает 72%, а в ДНК *Bacillus cereus* — 35%. Для простейших, типа *Tetrahymena pyriformis*, сумма (G + C) составляет лишь 25% от общего числа оснований в ДНК. И в то же время белки организмов, существенно различающихся по нуклеотидному составу ДНК, характеризуются очень сходным аминокислотным составом. Как можно объяснить это наблюдение? Предложите способ проверки вашей гипотезы.

12.4. Внегенная супрессия некоторых мутаций сдвига рамки осуществляется за счет мутации, картируемой в структурном гене тРНК^{Gly}. Как вы считаете, с какими изменениями структуры тРНК^{Gly} может быть связана эта супрессорная мутация? Как можно было бы проверить вашу гипотезу, не определяя непосредственно нуклеотидную последовательность нормальной и мутантной тРНК?

12.5. Для гена, кодирующего β-галактозидазу *E. coli*, была обнаружена новая мутация, NG813, вызывающая преждевременную терминацию полипептидного синтеза. Эта мутация не супрессируется в присутствии факторов F', несущих *amber*- или *ochre*-супрессорные гены. Мутация картируется в непосредственной близости от известной ранее *amber*-мута-

ции, вызывающей терминацию трансляции на том же аминокислотном остатке, что и NG813. Дополнительная мутация, связанная с заменой одного основания, приводит к тому, что вместо NG813 появляется мутантный кодон UAA, подверженный *ochre*-супрессии. В то же время замена единичного основания в том же кодоне в гене дикого типа может сопровождаться возникновением или *amber*-мутаций, или мутаций типа NG813. Какова природа мутации NG813?

12.6. Все *ochre*-супрессорные гены служат одновременно и *amber*-супрессорами, но не все *amber*-супрессоры могут играть роль *ochre*-супрессоров. Объясните почему.

12.7. Как определить, может ли одноцепочечная РНК, выделенная из РНК-содержащего вируса, выполнять непосредственно роль мРНК или служить только в качестве комплементарной цепи, направляющей процесс образования мРНК после инфекции соответствующего хозяина?

12.8. Известны температурочувствительные мутации гена $su3^+$ *E. coli*. Предложите метод обнаружения таких мутаций. По аналогии с известными температурочувствительными белками предложите интерпретацию феномена чувствительности к повышенной температуре этих тРНК^{Tyr}-мутантов.

12.9. Определенная *amber*-мутация (*Aam18*) фага φX174 приводит к потере функции цистрона A при развитии на Su⁻-хозяине. Размножение мутантного (*Aam18*) штамма на Su⁺-хозяине с последующей инфекцией Su⁻-хозяина и выращиванием при 30°C позволяет отобрать спонтанные ревертанты и псевдоревертанты этого *amber*-мутанта. Некоторые из отобранных штаммов оказываются неспособными к росту на Su⁻-хозяине при повышенной температуре (42°C). Комплементация фенотипа температурочувствительности этих штаммов может наблюдаться при совместной инфекции Su⁻-хозяина ревертантом и исходным *Aam18*-мутантом. Предложите интерпретацию этих наблюдений.

Генетический контроль синтеза ДНК

Удивительная простота полуконсервативной модели репликации ДНК (см. гл. 4) скрывает сложнейшие биохимические процессы, обеспечивающие эту репликацию. Можно не сомневаться, что эволюция, в результате которой сформировался сложный репликационный аппарат, была подчинена стремлению обеспечить максимальную точность передачи информации от родительских к дочерним молекулам ДНК. По существующим оценкам ошибки репликации, приводящие к появлению неправильного нуклеотида в молекуле ДНК *E. coli*, происходят с частотой порядка одной на 10^8 – 10^{10} нуклеотидов. И в то же время синтез прокариотической ДНК происходит с очень высокой скоростью – около 1000 нуклеотидов в секунду в области репликативной вилки. Эукариотическая ДНК синтезируется медленнее, со скоростью порядка 100 нуклеотидов в секунду, однако частота возникновения ошибок репликации при этом не меньше, чем в случае прокариот. Более низкая скорость репликации эукариотической ДНК, по-видимому, обусловлена ее прочным связыванием с гистоновыми белками, диссоциация которых является непременным условием продвижения репликативной вилки вдоль цепи ДНК.

Ферменты и другие белки, вовлеченные в процесс полуконсервативной репликации, представляют собой лишь небольшую часть всех белков, участвующих в метаболизме молекул ДНК. Существуют другие ферменты, входящие в систему репарации – устранения и замены неправильных или поврежденных нуклеотидов, удаленных от репликативной вилки. Некоторые из этих ферментов участвуют также в рекомбинации вместе со специализированными ферментами, функциональная роль которых сводится только к обеспечению рекомбинационных процессов.

Таблица 13.1. Различные ферменты и типы ферментативной активности, вовлеченные в биосинтез ДНК

Хеликаза (раскручивание двойной спирали)
Белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (SSB-белок)
Топоизомераза (удаление супервитков спирали)
ДНК-полимераза (рост цепи ДНК за счет поликонденсации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов)
Праймаза [синтез РНК-затравки (праймера)]
5' → 3' экзонуклеаза (удаление РНК-затравки, репарация)
3' → 5' экзонуклеаза (исправление ошибок репликации)
ДНК-лигаза (соединение 3'-ОН- и 5'-PO ₄ -концов одноцепочечного разрыва)
Эндонуклеаза (репарация)
Гликозилаза (репарация)

Многие из ферментативных функций, связанных с метаболизмом ДНК, характерны как для прокариот, так и для эукариот. Обсуждение процессов репликации, репарации и рекомбинации в соответствующих разделах опирается на рассмотрение участия в них определенных типов ферментов, что позволяет выявить биохимические основы организации этих процессов у прокариотических и эукариотических организмов. Некоторые из этапов метаболизма ДНК удается однозначно интерпретировать в рамках действия фермента определенного типа. В то же время в некоторых организмах данная функция может реализоваться при участии более чем одного фермента, и наоборот – один и тот же фермент может участвовать в нескольких различных процессах. Судя по всему, эволюция породила целый ряд различных механизмов, обеспечивающих метаболизм ДНК и поддерживающих сохранность наследственной информации, закодированной в ДНК.

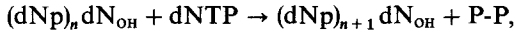
В таблице 13.1 приведен перечень основных типов ферментов, вовлеченных в процесс биосинтеза ДНК. В данной главе действие этих ферментов будет обсуждаться сначала в связи с их участием в полуконсервативной репликации ДНК, а затем в контроле репарационных процессов. Как мы убедимся при рассмотрении материала гл. 14, эти же типы ферментов обеспечивают реализацию механизмов рекомбинации.

Генетический анализ играет ключевую роль в изучении совокупности сложнейших биохимических процессов метаболизма ДНК. С помощью мутаций, модифицирующих или полностью инактивирующих тот или иной фермент, участвующий в метаболизме ДНК, удается выявить функциональную роль этого фермента *in vivo*. Если такая мутация является летальной или условно-летальной, то соответствующему ферменту с большой вероятностью принадлежит ключевая роль в рассматриваемом процессе.

Полимеризация ДНК в репликативной вилке

После расплетания и разделения родительских цепей двойной спирали ДНК они могут выступать в роли матриц, по которым синтезируются растущие комплементарные дочерние цепи. Синтез новых цепей напра-

вляется ДНК-полимеразой, использующей в качестве субстратов дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dTTP и dCTP). Для осуществления реакции матричной сополимеризации этих субстратов любым ДНК-полимеразам необходимо наличие затравки со свободным 3'-ОН-концом (см. рис. 4.8), к которому мог бы присоединиться следующий нуклеотид растущей цепи ДНК. Реакция, катализируемая ДНК-полимеразой, может быть отражена следующей схемой:



где $(dNp)_n dN_{OH}$ — это растущая цепь ДНК с 3'-ОН-группой на конце, dNTP — молекула дезоксирибонуклеозидтрифосфата, а P-P — молекула неорганического пирофосфата. Очередной нуклеотид присоединяется к 3'-концу растущей цепи, при этом происходит отщепление пирофосфата. 3'-ОН-группа присоединившегося таким образом нуклеотида в свою очередь выступает в роли затравки для присоединения следующего нуклеотида. Цепи ДНК в предложенной Уотсоном и Криком структуре двойной спирали антипараллельны, то есть в области репликативной вилки присутствуют и 3'- и 5'-концы синтезируемых цепей. Как уже упоминалось, для действия ДНК-полимеразы необходимо наличие 3'-ОН-затравки, и поэтому только одна из двух растущих цепей ДНК (*ведущая* цепь) может синтезироваться непрерывно. Синтез другой (*отстающей*) цепи идет прерывисто (рис. 13.1, А). Экспериментальные данные, свидетельствующие о прерывистом характере роста в репликативной вилке одной из цепей, были получены с помощью *пульсового* введения метки ^3H -тимидина в синтезируемую в клетках ДНК. Если перед экстракцией ДНК из клеток они находились в контакте с радиоактивным субстратом лишь в течение нескольких секунд, то оказывается, что значительная часть новосинтезированной ДНК (идентифицируемая по содержанию радиоактивности) при щелочной денатурации распадается на ряд небольших одноцепочечных фрагментов длиной около 1000–2000 нуклеотидов. Они получили название *фрагментов Оказаки*, по имени Рейджи Оказаки, впервые обнаружившего эту особенность репликации ДНК. Если пульсовое введение ^3H -тимидина прерывают перенесением растущих клеток на обычную среду, не содержащую меченых предшественников, и подрачивают клетки в течение нескольких минут (метод «*пульс-чейз*»), то радиоактивность обнаруживается уже в составе весьма протяженных фрагментов ДНК (рис. 13.2).

Поначалу тот факт, что «отстающая» цепь ДНК синтезируется не непрерывно, представлялся весьма удивительным, поскольку неясно было, откуда всякий раз берутся новые затравки («праймеры»). Как известно, для работы ДНК-полимеразы необходимо наличие 3'-ОН-затравки, без которой фермент не способен направлять рост цепи. Так, очищенная ДНК-полимераза оказывается абсолютно неактивной в смеси, содержащей кольцевую одноцепочечную ДНК фага ϕX174 в качестве матрицы и необходимые субстраты. В то же время, как мы знаем, РНК-полимераза может инициировать синтез РНК по одноцепочечной ДНК-матрице в отсутствие какой бы то ни было затравки.

Это свойство РНК-полимеразы подтверждается, как отмечалось в гл. 11, тем, что на 5'-конце синтезируемых молекул РНК содержится трифосфатная группировка. Впоследствии было установлено, что на 5'-конце фрагментов Оказаки находятся участки РНК. Это указывает на участие РНК-полимеразы в образовании РНК-затравок при репликации

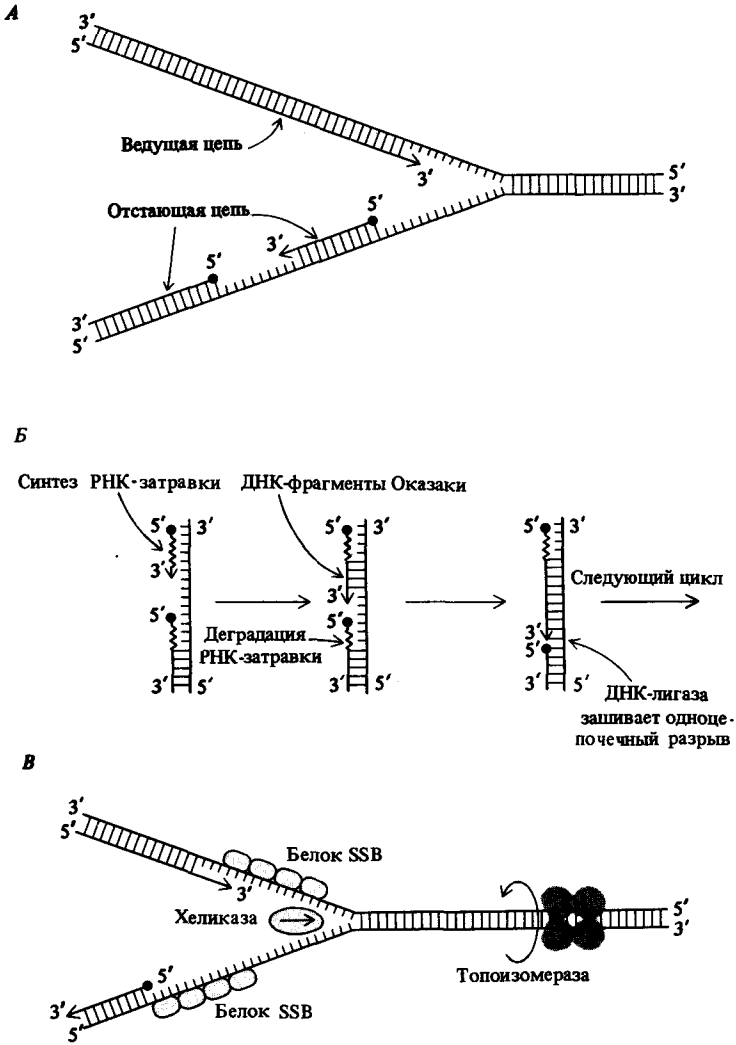


Рис. 13.1. А. В репликативной вилке особенности синтеза каждой из двух цепей ДНК зависят от полярности цепи. Синтез ведущей цепи в направлении 5' → 3' происходит непрерывно. Для синтеза отстающей цепи с противоположной полярностью необходимо постоянное образование новых затравочных участков. Б. Отстающая цепь синтезируется относительно небольшими фрагментами (фрагменты Оказаки), для инициации которых необходимо предварительное образование коротких РНК-затравок (праймеров).

РНК-затравочный участок одного фрагмента ДНК удаляется после того, как завершается синтез следующего фрагмента. Разрыв между двумя фрагментами закрывается благодаря действию ДНК-лигазы. В. Участие хеликазы, SSB-белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК, и топоизомеразы в расплетании двойной спирали родительской ДНК при движении репликативной вилки. (По Alberts B., Sternglanz R, 1977. Nature, 269, 655.)

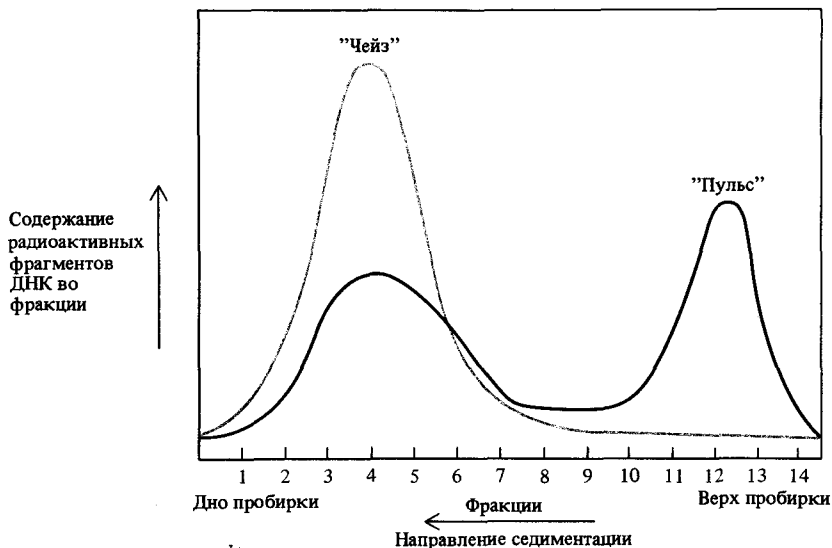


Рис. 13.2. Эксперимент, подтверждающий модель, согласно которой часть новообразованной ДНК *E. coli* состоит из небольших одноцепочечных фрагментов, которые в дальнейшем включаются в состав протяженных цепей. Черная кривая отражает распределение по размерам одноцепочечных фрагментов ДНК, наблюдаемое при пульсовом введении метки и последующем центрифугировании в сахарозном градиенте плотности при pH 12 для предотвращения образования водородных связей между комплементарными цепя-

ми. Небольшие фрагменты, содержащиеся в пике, расположенном в верхней части центрифужной пробирки, через некоторое время после удаления из среды радиоактивных предшественников (период «чейз») оказываются включенными в состав протяженных одноцепочечных участков (цветная линия). Разделение основано на том, что большие по размеру одноцепочечные цепи характеризуются более высокой скоростью седиментации, чем небольшие фрагменты.

ДНК. Эту РНК-полимеразу, отличающуюся от ферментов, которые непосредственно участвуют в процессе транскрипции, называют *праймазой*.

РНК-затравочные участки не сохраняются в структуре зрелой ДНК. После реализации своей функции для инициации репликации ДНК они удаляются за счет проявления $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы (рис. 13.1, Б и 13.3). После удаления РНК-затравки и ее замещения на фрагмент ДНК, инициация синтеза которого происходит на следующей РНК-затравке, расположенной ближе к области репликативной вилки, между двумя соседними синтезированными фрагментами ДНК остается разрыв. Этот разрыв (отсутствие ковалентной связи между $3'$ -ОН- и $5'$ - PO_4 -концами фрагментов цепи) устраняется при участии фермента — ДНК-лигазы, — направляющего образование фосфодиэфирной связи (рис. 13.4).

Синтез ведущей и отстающей цепей происходит по мере продвижения репликативной вилки вдоль двойной спирали родительской ДНК (см. рис. 13.1). Процесс расплетания двойной спирали и экспонирования

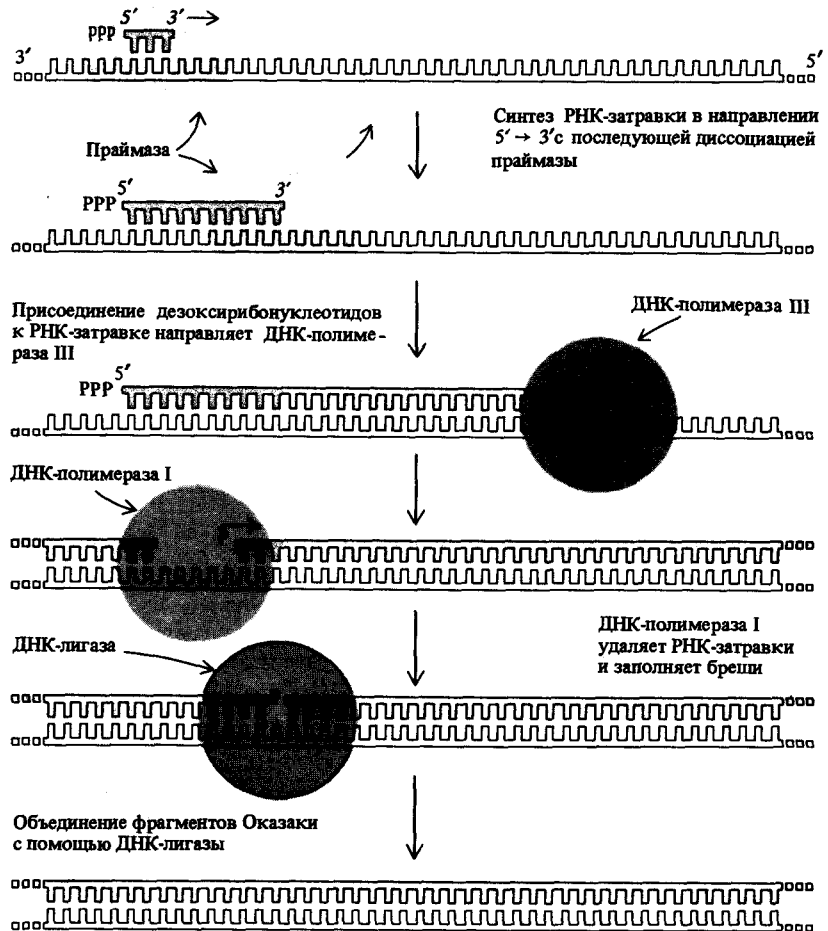


Рис. 13.3. Синтез отстающей цепи ДНК инициируется праймазой, при действии которой образуются короткие РНК-фрагменты, комплементарные соответствующим участкам матричной цепи ДНК. 3'-ОН-концы этих фрагментов выступают в качестве затравки для синтеза ДНК, направляемого ДНК-полимеразой III. ДНК-полимераза I удаляет РНК-затравку, начиная с 5'-конца. При этом

3'-ОН-конец предшествующего фрагмента цепи ДНК служит затравкой для проявления 5' → 3'-экзонуклеазной активности (удаление РНК) и полимеразной активности (заполнение бреши) ДНК-полимеразы I. После замены участка РНК на соответствующий участок ДНК между двумя соседними фрагментами цепи ДНК остается разрыв, который закрывается ДНК-лигазой.

двух матричных цепей ДНК происходит при участии трех типов белков (см. табл. 13.1) и сопровождается значительными энергетическими затратами. Белок первого типа, хеликаза, осуществляет собственно расплетание спирали, а необходимая для этого энергия поставляется за счет гидролиза АТФ. Белок второго типа (SSB) специфически связывает

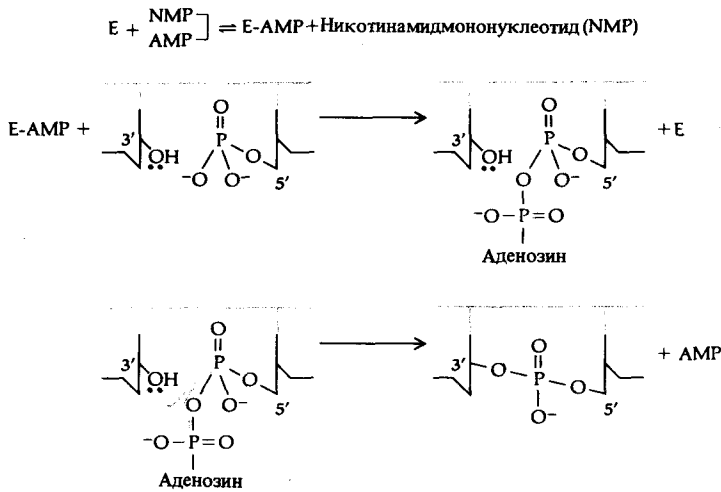


Рис. 13.4. ДНК-лигаза (E) «зашивает» одноцепочечный разрыв в цепи ДНК, используя энергию, поставляемую за счет гидролиза никотинамидадениндинуклеотида (NMP-РМА). Реакция протекает через образование промежуточного комплекса фермент—AMP. Остаток AMP переносится на 5'-фосфатную группу в ме-

сте разрыва. Образовавшийся дифосфатный остаток гидролизуются за счет атаки 3'-ОН-группы следующего нуклеотида с образованием ковалентной фосфодиэфирной связи. ДНК-лигаза фага T4 для образования интермедиата (фермент—AMP) вместо никотинамидадениндинуклеотида предпочитательно использует АТФ.

ся с одноцепочечной ДНК, предотвращая преждевременную реассоциацию цепей. Расплетание двойной спирали родительской ДНК без вращения приводит к образованию дополнительных витков или узлов на участках ДНК впереди репликативной вилки, аналогичных узлам, которые возникают при быстром разъединении скрученных нитей волокна. Белок третьего типа, топоизомераза, способствует релаксации сверхскрученных участков ДНК, внося одноцепочечные разрывы фосфодиэфирных связей и раскручивая узлы в области родительской двойной спирали перед репликативной вилкой. После такого раскручивания и снятия напряжения, связанного с образованием дополнительных витков спирали, топоизомераза вновь замыкает разорванные фосфодиэфирные связи и восстанавливает структурную целостность родительской ДНК. Схема действия трех названных белков в процессе репликации представлена на рис. 13.1, В.

Генетический анализ репликации ДНК

Генетический анализ, который сыграл весьма существенную роль в изучении энзимологии и молекулярного механизма процесса репликации ДНК, основан на выделении и исследовании мутантов, характеризующихся либо полной утратой, либо повреждением той или иной суще-

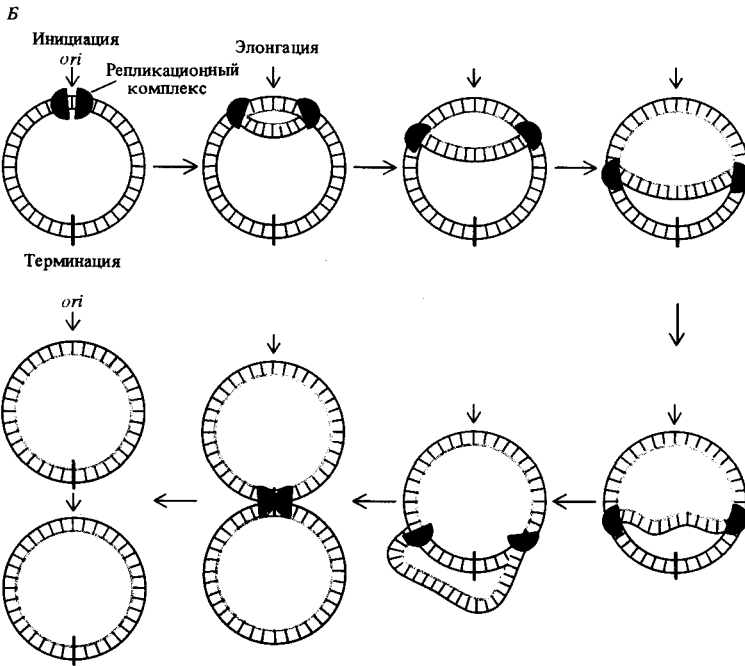
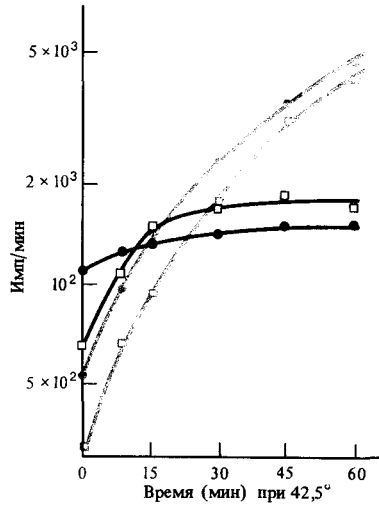
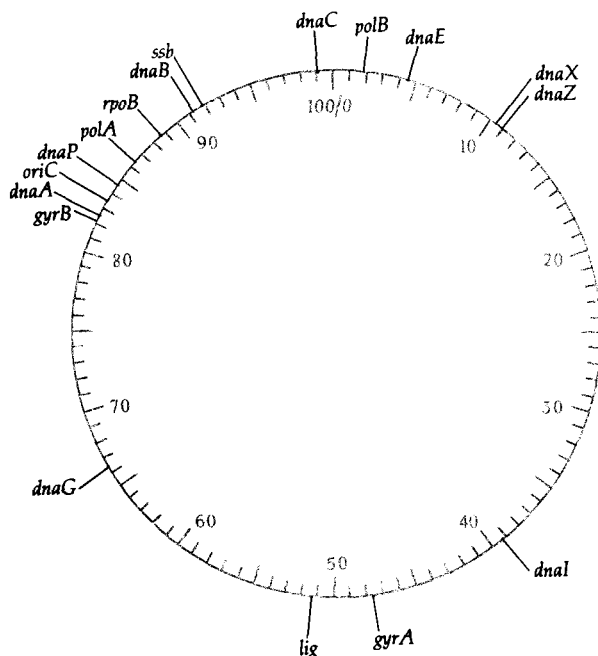


Рис. 13.5. А. Включение ^3H -тимина (черные кружки) и ^{14}C -лейцина (цветные кружки) в клетки температурочувствительного мутанта *dnaE* при рестриктивной температуре. После температурного сдвига до $42,5^\circ$ синтез ДНК практически немедленно прекращается, в то время как синтез белка продолжается с нормальной скоростью. Сравните это с поведением клеток температурочувствительного мутанта *dnaA* (включение ^3H -тимина – черные квадратики; включение ^{14}C -лейцина – цветные

квадратики), которые в течение 15 мин после повышения температуры до $42,5^\circ$ продолжают синтезировать ДНК. (По Wechsler J. A., Gross J. D., 1971. *Molec. Gen. Genetics*, **113**, 273.) Б. На приведенной диаграмме проиллюстрированы различия между процессами инициации и элонгации при репликации хромосомы *E. coli*. Мутация *dnaE* затрагивает элонгацию, а мутация *dnaA* – инициацию репликации.

Рис. 13.6. Положение генов, вовлеченных в синтез ДНК, на хромосоме *E. coli*.



Локус	Функция
<i>pol B</i>	ДНК-полимераза II
<i>dna E</i>	Субъединица ДНК-полимеразы III
<i>dna X</i>	Субъединица ДНК-полимеразы III
<i>dna Z</i>	Субъединица ДНК-полимеразы III
<i>dna I</i>	Инициация репликации ДНК
<i>gyr A</i>	Субъединица ДНК-гиразы(топоизомеразы II)
<i>lig</i>	ДНК-лигаза
<i>dna G</i>	Праймная субъединица праймосомы
<i>gyr B</i>	Субъединица ДНК-гиразы(топоизомеразы II)
<i>dna A</i>	Инициация репликации ДНК
<i>ori C</i>	Участок инициации репликации ДНК
<i>dna P</i>	Инициация репликации ДНК
<i>pol A</i>	ДНК-полимераза I
<i>rpo B</i>	Субъединица РНК-полимеразы
<i>dna B</i>	Субъединица праймосомы
<i>ssb</i>	SSB-белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК
<i>dna C</i>	Субъединица праймосомы

ственной генетической функции. Некоторые мутации такого рода сопровождаются изменениями, затрагивающими уже идентифицированные ферменты. Другие позволяют идентифицировать новые ферменты. Если данная мутация является летальной или условно-летальной, то затрагиваемая ею функция, вероятно, играет важную роль в изучаемом процессе.

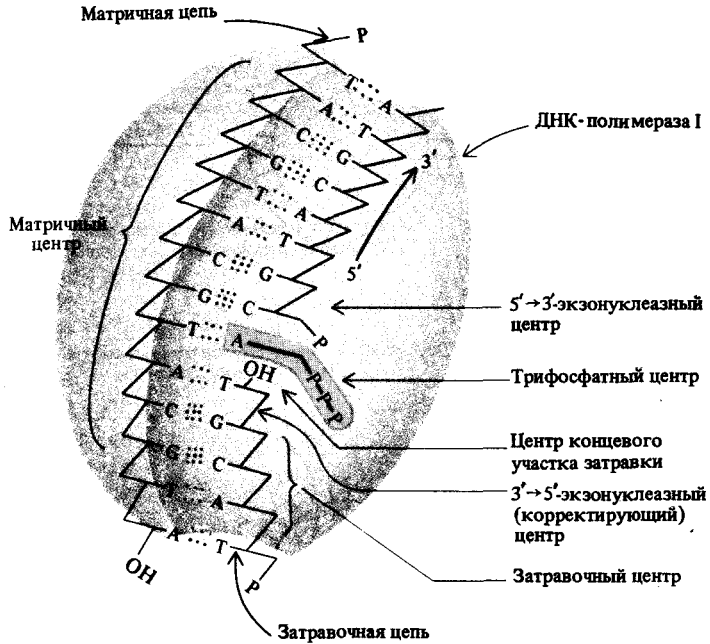
Первые указания на то, что в системе репликации ДНК участвует целый ряд важных генетических функций, были получены благодаря выделению широкого набора условно-летальных температурочувствительных мутантов *E. coli* (*dna*⁻), комплементационный анализ которых позволил соотнести их с мутациями в ряде различных генов. Среди них можно выделить два класса мутантов, которые при рестриктивной температуре: (1) немедленно прекращают синтез ДНК или (2) в течение относительно протяженного временного интервала постепенно прекращают синтезировать ДНК (рис. 13.5). Первый фенотип связан с нарушением процесса синтеза ДНК в репликативной вилке, а второй — с исчезновением способности инициировать новый цикл репликации хромосомы. (В несинхронизированной культуре индивидуальные клетки мутантов второго класса, находящиеся на различных стадиях репликации, начавшейся еще при перmissive температуре, не прекращают синтезировать ДНК после повышения температуры до полного завершения цикла репликации хромосомы.) После сопоставления выделенных мутаций с определенными белками, на которых сказываются эти мутации, можно начать изучение функциональной роли этих белков *in vivo*. Локализация генов, ответственных за репликацию ДНК, на хромосоме *E. coli* показана на рис. 13.6.

Биохимический анализ репликации ДНК

В клетках *E. coli* содержатся три различных фермента с ДНК-полимеразной активностью. Среди них наиболее полно изучена представленная в клетке наибольшим числом молекул ДНК-полимераза I (Pol I). Этот фермент способен направлять синтез комплементарной цепи по матричной цепи ДНК при наличии соответствующей комплементарной затравочной цепи со свободной 3'-ОН-группой, связанной водородными связями с матричной цепью. Полимеризация происходит в направлении 5' → 3' за счет взаимодействия очередного дезоксирибонуклеозидтрифосфата с 3'-ОН группой растущей (затравочной) цепи. Фермент Pol I обладает также 5' → 3'-экзонуклеазной активностью, т.е. способен последовательно отщеплять 5'-нуклеотиды от цепи ДНК, связанной с матричной цепью. На рис. 13.7 изображена модель структуры ДНК-полимеразы I с указанием расположения соответствующих функциональных центров. Особые ферментативные свойства ДНК-полимеразы I сделали этот фермент эффективным и весьма распространенным инструментом для изучения нуклеиновых кислот (см. Дополнение 13.1).

Фермент Pol I считали единственной ДНК-полимеразой *E. coli* до тех пор, пока не была обнаружена мутация (*polA*), подавляющая эту полимеразную активность (не менее чем на 98%), однако не сказывающаяся существенно на способности мутантного штамма к размножению. Благодаря обнаружению мутантного штамма *polA* биохимикам удалось идентифицировать и выделить две другие ДНК-полимеразы, Pol II и Pol III, которые в обычных штаммах *E. coli* вносят небольшой вклад в общую ДНК-полимеразную активность.

Рис. 13.7. Модель ДНК-полимеразы I, показывающая расположение функциональных центров фермента по отношению к матричной и затравочной цепям ДНК.

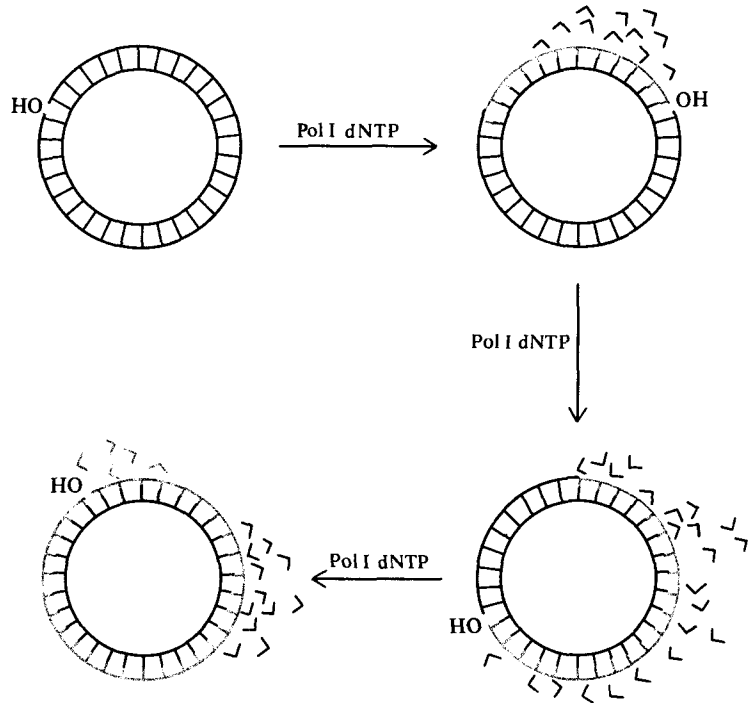


Дополнение 13.1. Применение ДНК-полимеразы I *E. coli*

ДНК-полимераза I (или Pol I) *E. coli* находит широкое применение в работе с рекомбинантными ДНК и при определении нуклеотидной последовательности ДНК. Одно из важнейших применений этого фермента связано с введением радиоактивной метки в ДНК *in vitro* с помощью так называемой ник-транслации, направляемой ферментом за счет сопряженных полимеразной и 5' → 3'-экзонуклеазной активностей. Этот процесс позволяет добиться необычайно высокого включения радиоактивной метки в ничтожные количества ДНК, т. е. получать препараты с гораздо более высокой удельной активностью (оцениваемой в импульсах в минуту на 1 мкг ДНК), чем при введении метки *in vivo*. Радиоактивные ДНК-зонды, полученные с помощью ник-транс-

ляции, могут использоваться при скрининге библиотек рекомбинантных ДНК для обнаружения клонов, содержащих комплементарные последовательности ДНК, или для идентификации соответствующих фрагментов рестрикции ДНК после электрофоретического разделения в геле (см. гл. 9). В присутствии двуцепочечной ДНК, содержащей одноцепочечный разрыв фосфодиэфирной связи, и меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов ДНК-полимераза I направляет одновременно включение радиоактивных предшественников в растущую цепь и деградацию немеченой цепи ДНК (рис. 13.8). Двуцепочечную меченую ДНК затем денатурируют тепловой или щелочной обработкой и получают одноцепочечный зонд.

Рис. 13.8. Синтез *in vitro* радиоактивной цепи ДНК (цветная линия) при действии ДНК-полимеразы I. Совместное действие полимеризационного и экзонуклеазного центров (см. рис. 13.7) приводит к перемещению одноцепочечного 3'-ОН/5'-PO₄-разрыва вокруг показанной на рисунке кольцевой матричной цепи. Поэтому данный процесс называется *ник-трансляцией* (т.е. перемещением разрыва).

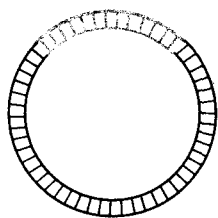


Помимо этого ДНК-полимераза I является необходимым компонентом важнейшего метода определения последовательности ДНК, который называют «методом терминации цепи». Для установления последовательности ДНК, как обсуждалось в гл. 9, необходимо получить серии радиоактивно меченых перекрывающихся фрагментов, причем в рамках каждой серии все фрагменты должны начинаться с одной общей точки и статистически распределяться по длине таким образом, чтобы на противоположном конце каждого фрагмента находилось основание одного определенного (для данной серии) типа – А, Т, G или С. В этом методе серии перекрывающихся фрагментов получают с помощью ДНК-полимеразы I по одноцепочечной ДНК-матрице с использованием небольшого затравочного олигонуклеотида (праймера), комплементарного определенному участку матрицы, и радиоактивных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Для каждой матрицы проводят четыре независимые реакции полимеризации, при этом каждый раз

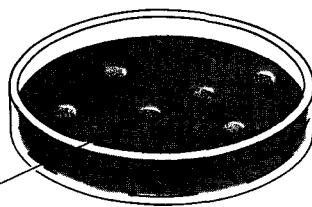
в реакционной смеси содержится некоторая доля одного из четырех дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов, встраивание которых вызывает терминацию роста цепи, что обусловлено отсутствием у встроившегося нуклеотида 3'-ОН-группы, необходимой для осуществления следующего этапа элонгации. Например, в реакционной смеси, содержащей дидезоксиаденозинтрифосфат и четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата, в каждое положение растущей цепи, соответствующее остатку тимина в матричной цепи, будут конкурентно включаться и дезоксиаденозин, и дидезоксиаденозин. В тех случаях, когда будет происходить включение дидезоксиаденозина, дальнейший рост цепи на данной матрице будет уже невозможен. При включении дезоксиаденозина полимеризация будет продолжаться без помех вплоть до следующего матричного остатка тимина, где вновь с некоторой вероятностью может произойти включение дидезоксиаденозина, приводящее к терминации цепи. Таким образом может быть получена серия всех

Клонированный вектор M13 со вставочной последовательностью

Бляшки фага M13, несущего вставочную последовательность

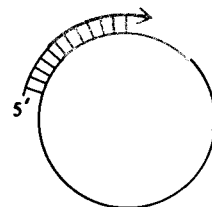
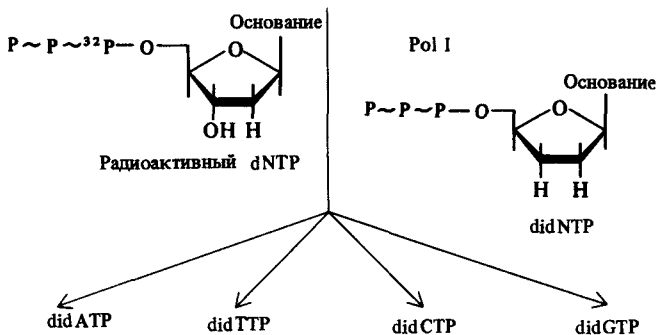
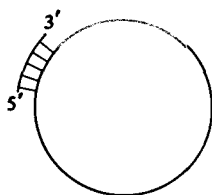


E. coli
Обработка Ca^{2+}



Из отдельной бляшки получают культуру фага, выделяют фаговую одноцепочечную ДНК

Добавляют затравку, комплементарную последовательности M13, примыкающей к вставке



Нагревают для отделения наборов перекрывающихся фрагментов от матрицы. Фракционируют фрагменты с помощью электрофореза



Рис. 13.9. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК с помощью клонирования на фаге M13 и последующего использования метода терминирования цепи с применением фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I. Сравните строение обычных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP) и терминирующих дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов (didNTP).

лимеразы I. Сравните строение обычных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP) и терминирующих дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов (didNTP).

возможных перекрывающихся фрагментов, начинающихся с праймерного участка и статистически обрывающихся на 3'-концевом остатке А.

Данный способ определения последовательности ДНК наиболее эффективно применяется для рестрикционных фрагментов ДНК, встроенных в двухцепочечную репликативную форму клонирующего вектора, сконструированного на основе одноцепочечной ДНК фага М13. Выделение фаговых частиц, образующихся после трансфекции полученным таким образом двухцепочечным рекомбинантным фаговым геномом, служит непосредственным источником кольцевых одноцепочечных ДНК-матриц, которые используют для определения нуклеотидной последовательности. Описанный метод схематически изображен на рис. 13.9.

ДНК-полимеразу I, используемую для

определения последовательности ДНК методом терминации цепи, определенным образом обрабатывают для того, чтобы избавиться от свойственной этому ферменту 5' → 3' экзонуклеазной активности. Активность этого типа может мешать осуществлению манипуляций, приведенных на рис. 13.9, атакуя 5'-конец праймера, используемого для инициации полимеризации. При обработке ДНК-полимеразы I протеиназой субтилизином, происходит расщепление фермента на два крупных полипептида, один из которых проявляет 5' → 3' экзонуклеазную активность, а другой содержит каталитический центр полимеризации. Последний фрагмент (известный как фрагмент Клёнова) сохраняет полимеразную активность и может быть полностью очищен от примеси 5' → 3'-эксонуклеазного фрагмента.

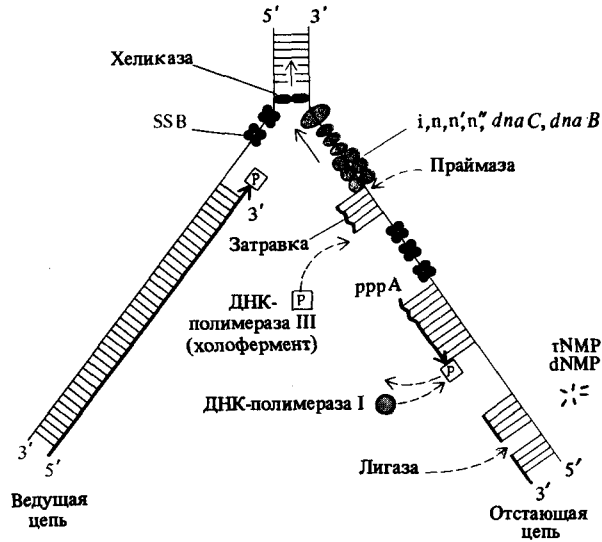
На первый взгляд казалось, что это наблюдение свидетельствует о функциональной заменимости ДНК-полимеразы I. Однако дальнейшие исследования показали, что мутация *polA* не затрагивает 5' → 3'-эксонуклеазной активности Pol I. Удалось получить добавочные температурочувствительные мутации гена *polA*, подавляющие 5' → 3'-эксонуклеазную активность и летальные при рестриктивной температуре. На основании этих данных был сделан вывод о том, что 5' → 3'-эксонуклеазная активность Pol I является жизненно важной функцией, необходимой для удаления РНК-затравок при репликации, т.е. для обеспечения нормального синтеза полноценной отстающей цепи ДНК (рис. 13.3). В действительности для исходного *polA*-мутанта было показано, что фрагменты Оказаки встраиваются в протяженные участки цепи ДНК с некоторым запаздыванием, и это свидетельствовало о возможном участии ДНК-полимеразы I в заполнении пустот, возникающих после удаления РНК-затравок из отстающей цепи. В то же время эту функцию Pol I нельзя назвать жизненно важной, поскольку в *polA*-мутантном штамме с ней вполне успешно справляется фермент Pol III.

Изучение штаммов, мутантных по гену *pol II* (например, мутация *pol V* полностью выводит из строя этот фермент), показало, что активность этой ДНК-полимеразы не является жизненно важной; ее непосредственная функциональная роль в клетке не установлена. С другой стороны, генетический анализ продемонстрировал, что присутствие Pol III необходимо для синтеза ДНК в репликативной вилке. ДНК-полимераза III — это полисубъединичный фермент, субъединицы которого кодируются жизненно важными генами *dna E*, *dna X* и *dna Z*, а также некоторыми другими, еще не идентифицированными генами. Этот фермент необходим для синтеза как ведущей, так и отстающей цепей ДНК. При синтезе отстающей цепи Pol III использует РНК-затравки, синтезируемые праймазой, которую кодирует жизненно важный ген *dna G*.

Биохимический анализ механизма репликации ДНК основан на выделении и очистке ферментов и других белков, осуществляющих одну или несколько стадий репликационного процесса *in vitro*. Разработке и изучению системы репликации *in vitro* в значительной мере способствовало использование в качестве матриц небольших подробно охарактеризованных вирусных геномов, например фага фХ174, поскольку продукты их репликации *in vitro* также легко поддаются изучению. Образование способных к инфекции молекул вирусной ДНК *in vitro* может лежать в основе однозначного биологического теста на аутентичность продукта репликации. Системы репликации *in vitro* были разработаны для одноцепочечных кольцевых ДНК фагов фХ174, G4 и M13. Благодаря этим исследованиям удалось сделать весьма примечательное наблюдение, что эти фаги, каждый из которых может инфицировать *E. coli*, используют для своей репликации различные наборы генетических функций *E. coli*, связанных с синтезом хозяйской ДНК. На ДНК M13, окруженной SSB-белками, инициация синтеза комплементарной цепи ДНК зависит от синтеза РНК-затравки в определенном участке кольца, направляемого РНК-полимеразой хозяина, которая в норме отвечает за транскрипцию хозяйской ДНК. РНК-полимеразу ингибирует антибиотик рифампицин, который подавляет также репликацию ДНК фага M13 *in vitro* и *in vivo*. С другой стороны, ДНК фага G4, также связанная с SSB-белком, для синтеза иницирующей РНК-затравки использует другой фермент клетки-хозяина – праймазу (продукт гена *dna G*). В то же время для синтеза РНК-затравки и инициации репликации ДНК фага фХ174, связанной с SSB-белком, требуется участие целого ряда хозяйских белков, включая и продукты генов *dna B* и *dna C*. Во всех трех случаях синтез ДНК на образовавшейся РНК-затравке иницируется ДНК-полимеразой III. По-видимому, в репликации фХ174 участвуют все ферменты хозяина, связанные с синтезом отстающей цепи ДНК в репликативной вилке, а в случае фагов G4 и M13 необходимым является участие тех ферментов, которые используются только для инициации репликации хромосомы.

Совокупность процессов, связанных с синтезом ДНК в репликативной вилке, схематически представлена на рис. 13.10. Для образования вилки фермент хеликаза разделяет цепи родительской ДНК. В этом процессе участвует также топоизомераза, релаксирующая возникающие при расплетании дополнительные витки. С открывшимися одноцепочечными участками ДНК связываются молекулы SSB-белка. Синтез ведущей цепи направляется ДНК-полимеразой III. Синтез затравочных фрагментов (праймеров), необходимых для образования отстающей цепи, осуществляется сложным ферментативным комплексом, который называют *праймсомой*, функционирующим в тесном контакте с хеликазой. В состав праймосомы входят продукты генов *dna B*, *dna C* и *dna G*, а также еще четыре белка – продукты неидентифицированных генов *n*, *n'*, *n''* и *i*. Вероятно, большая часть этих белков используется для удаления молекул SSB-белка и экспонирования участка, на котором праймаза (*dna G*) может иницировать синтез затравки. По мере расплетания родительской двойной спирали праймосома вместе с хеликазой активно продвигаются по цепи. Для осуществления этого процесса требуется затрата энергии, поставляемой за счет гидролиза АТФ белком *n'*. РНК-затравки необходимы для инициации синтеза ДНК ферментом Pol III. Удаление затравок реализуется за счет 5' → 3'-экзонуклеазной активно-

Рис. 13.10. Предполагаемая роль белков праймосомы (цветные) и других белков, участвующих в репликации ДНК в репликативной вилке у *E. coli*. (По Arai K. I., Low R. L., Kornberg A., 1981. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 707.)



сти ДНК-полимеразы I, которая благодаря своей полимеразной активности может также участвовать в заполнении брешей, возникших после удаления затравочных фрагментов. Остающиеся после этого 3'-ОН/5'-PO₄-одноцепочечные разрывы зашиваются ДНК-лигазой, которая, таким образом, завершает образование непрерывного сахарофосфатного остова отстающей цепи.

Инициация синтеза ДНК в точке начала репликации

Репликация ДНК инициируется на участках с определенной нуклеотидной последовательностью, обозначаемых *ori* (от англ. *origin*—начало). В большинстве прокариотических геномов содержится по одному участку *ori*, а в значительно превышающих их по размеру эукариотических хромосомах имеется, как правило, целый ряд таких участков (см. рис. 4.24). При инициации репликации ДНК обычно возникают две репликативные вилки, продвигающиеся в противоположных направлениях от точки инициации. Биохимические детали механизма инициации репликации хромосомы *E. coli* изучены достаточно слабо. С помощью генетического анализа удалось обнаружить, что для инициации репликации необходимо участие продуктов генов *dna A*, *dna I* и *dna P*, а также генов *gyrA* и *gyrB*, кодирующих субъединицы топоизомеразы II. Кроме того, при инициации или сразу после нее требуется наличие ДНК-полимеразы III и продуктов генов *dnaB* и *dnaC*, вероятно, для того, чтобы начать полимеризацию в новообразовавшейся репликативной вилке. Инициация синтеза ДНК ингибируется рифампицином, что указывает на возможное участие РНК-полимеразы, отличной от собственно праймазы. Однако какова именно роль РНК-полимеразы в этом процессе — неизвестно.

Недавно с помощью методов генной инженерии были сконструиро-

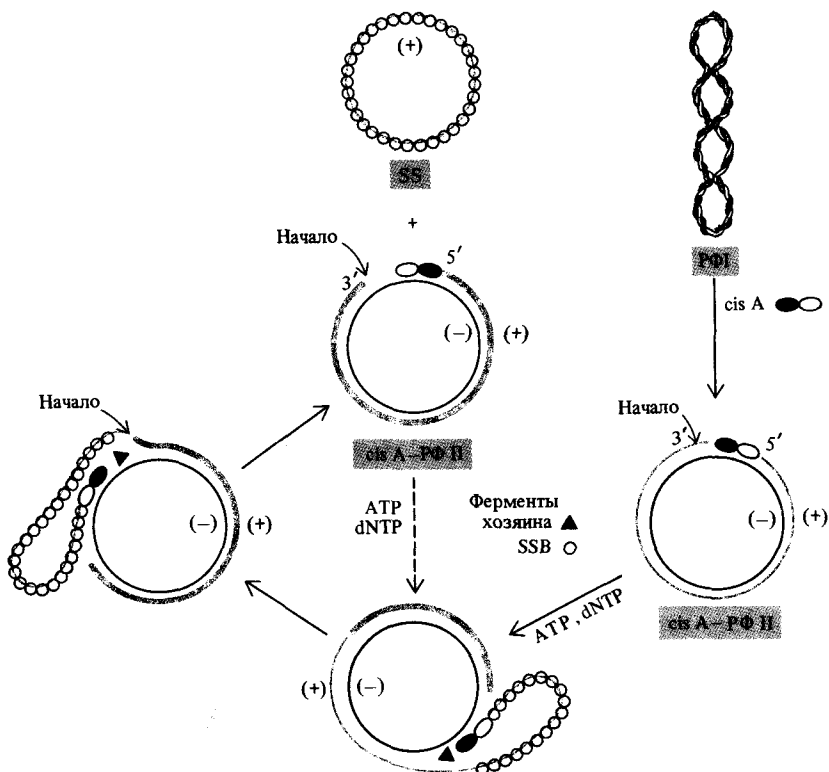


Рис. 13.11. Участие белка *cisA* фага фХ174 в инициации и терминции синтеза (+)-цепи одноцепочечного фагового генома и репликации РФ-фаговой ДНК *in vitro*. Символом РФИ обозначена ковалентно замкнутая (суперспирализованная) кольцевая двухцепочечная ДНК. РФИ—это промежуточная двухцепочечная структура, содержащая разрыв в одной цепи. Обратите внимание на димерную структуру белка *cisA* (один из моно-

меров закрашен черным). Одна из субъединиц (или мономеров) белка образует ковалентную связь с 5'-фосфатной группой разрыва на участке *ori*. SSB-белки обозначены неокрашенными кружками. Хозяйские функции, необходимые для репликации *in vitro*, включают хеликазу, топоизомеразу, праймосому, ДНК-полимеразы I и III. (По Eisenberg S. *et al.*, 1977. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 3198.)

ваны небольшие плазмиды, репликация которых зависит от встроенного в них участка *ori* из хромосомы *E. coli*. Используя эти плазмиды, можно будет создать систему инициации репликации *in vitro*, включающую продукты генов *dnaA*, *dnaI* и *dnaP*, с помощью которой, вероятно, удастся изучить детали механизма инициации.

До сих пор наиболее подробно процесс инициации репликации был изучен на двухцепочечной ДНК фага фХ174. Образование такой формы из одноцепочечной геномной ДНК происходит вскоре после инфекции и зависит только от клетки-хозяина, в частности от рассмотренного выше функционирования праймосомы. Однако последующая репликация двухцепочечной кольцевой ДНК и образование одноцепочечных колец, входящих в состав дочерних фаговых частиц, зависит уже от действия

белка, кодируемого фаговым цистроном *A*, а также от праймосомы, хеликазы, топоизомеразы и ДНК-полимеразы I клетки-хозяина. Белок, продукт *cis A*, является эндонуклеазой, узнающей участок *ori* на ДНК фX174 (расположенный внутри самого цистрона *A*) и вносящей разрыв в (+)-цепь. Таким образом, возникает 3'-ОН-затравка, на которой иницируется репликация по механизму катящегося кольца, направляемого ДНК-полимеразой III. Одна из двух идентичных субъединиц димерного белка *cis A* образует ковалентную связь с 5'-PO₄-концом одноцепочечного разрыва. По окончании одного цикла репликации (рис. 13.11) образуется двухцепочечная кольцевая ДНК, содержащая новообразованную (+)-цепь, связанную с белком *cis A*, и отделяется дочерняя одноцепочечная фаговая ДНК. Ковалентное замыкание этой одноцепочечной ДНК в кольцо осуществляется самим белком *cis A*. Интересно отметить, что подобно тому, как у фага фX174 участок *ori* находится внутри гена *A*, так и у фага λ участок *ori* находится внутри последовательности гена *O*, кодирующего белок, необходимый для репликации фаговой ДНК.

Неизвестно, насколько универсален описанный механизм инициации репликации, основанный на действии *ori*-специфичной эндонуклеазы. Участие в инициации репликации хромосомы *E. coli* топоизомеразы II (ДНК-гиразы) позволяет предположить возможность существования альтернативного механизма инициации, не связанного с участием особой эндонуклеазы. ДНК-гираза направляет АТР-зависимый процесс расплетания двойной спирали, вводя отрицательные супервитки. Это может приводить к необходимому экспонированию матричных нитей без внесения одноцепочечного разрыва в точке начала репликации.

Синтез ДНК у эукариот

Подходы, разработанные при изучении процесса синтеза ДНК в прокариотических клетках, были применены и для анализа репликации эукариотических ДНК. Знание типов генетических функций, необходимых для репликации прокариотических ДНК, способствовало выявлению с помощью биохимического анализа сходных функций и в эукариотических клетках. Геномы вирусов эукариот, такие, как двухцепочечная кольцевая ДНК вируса SV40, послужили удобной моделью для изучения эукариотических репликативных функций, подобно тому как небольшие фаговые геномы оказались весьма полезными для анализа процесса репликации у *E. coli*. До настоящего времени генетический анализ процесса репликации у эукариот не играл столь существенной роли, как это было в случае прокариот.

В эукариотических клетках были обнаружены три вида ДНК-полимеразной активности. Фермент Pol α служит основной полимеразой, вовлеченной в синтез ДНК в репликативной вилке. Фермент Pol β , судя по всему, участвует главным образом в репарационных процессах, а Pol γ —это единственная полимеразы, обнаруженная в митохондриях, используемая, вероятно, для репликации митохондриального генома. Для функционирования всех трех видов полимераз требуется наличие 3'-ОН-затравочного конца. Было показано также участие РНК-затравок в репликации эукариотических ДНК. В то же время были выявлены весьма существенные различия в том, как прокариотические и эукариотические

тические ДНК-полимеразы осуществляют процесс исправления ошибок репликации (см. следующий раздел). В эукариотических клетках были обнаружены и выделены в чистом виде ферменты, обладающие хеликазной и топоизомеразной активностями, а также белки, специфически связывающиеся с одноцепочечными участками ДНК. Несмотря на отсутствие исчерпывающей информации о протекании процессов синтеза ДНК, есть все основания полагать, что они в основных чертах являются общими как для прокариотических, так и для эукариотических клеток.

Точность синтеза ДНК

Частота ошибочного включения нуклеотидов в новообразующуюся при репликации цепь ДНК, порождающая спонтанные мутации, крайне низка (10^{-8} – 10^{-10}). В то же время на основании физико-химического рассмотрения специфичности образования системы водородных связей между основаниями может быть предсказана значительно более высокая частота ошибочного включения – вплоть до 10^{-2} . Таким образом, в обеспечении точности репликации ДНК помимо непосредственного образования водородных связей между комплементарными основаниями участвуют и дополнительные факторы контроля. Некоторые из этих дополнительных факторов, как оказалось, обусловлены функциональными особенностями самих полимераз.

Изучение ДНК-полимеразы I *E. coli* позволило выявить три фактора, вносящие вклад в обеспечение точности функционирования этого фермента. Считают, что при подходе и связывании очередного дезоксирибонуклеозидтрифосфата с трифосфатным центром (рис. 13.7) фермент осуществляет контроль общего размера новой пары оснований, возникающей при взаимодействии с основанием в матричной цепи, прежде чем запустить реакцию полимеризации. Только благодаря такому контролю частота возникновения ошибок снижается до 10^{-4} – 10^{-5} . Связавшийся нуклеотид затем перемещается к центру связывания концевого участка затравки, где вновь происходит проверка правильности образования водородных связей между основаниями. Для образования ковалентной связи с 3'-ОН-группой концевого нуклеотида растущей цепи необходимо наличие правильной системы водородных связей, обеспечиваемой комплементарными взаимодействиями между основаниями. В случае ошибочного включения неправильного нуклеотида дальнейшая полимеризация блокируется и активируется присущая ферменту 3' → 5'-экзонуклеазная активность. Происходит вырезание ошибочно включенного нуклеотида, фермент перемещается назад так, что в центр концевого участка затравки попадает предыдущий нуклеотид, после чего полимеризация продолжается обычным путем. Таким образом, правильность каждого включающегося в растущую цепь нуклеотида проверяется дважды. 3' → 5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы при этом осуществляет корректорскую функцию (*proofreading*). Если каждый этап проверки снижает частоту возникновения ошибок на два порядка (10^{-2}), то при реализации двух независимых этапов проверки частота возникновения ошибок уже будет оцениваться величиной 10^{-4} . Исследование точности репликации ДНК фага φX174 *in vitro* ДНК-полимеразой I, с использованием в качестве теста – определения инфекционной способности образующихся молекул ДНК, выявило возникно-

вление ошибок с частотой около 10^{-6} , очень близкой к величине, предсказанной на основании подобных расчетов ($10^{-2} \cdot 10^{-2} \cdot 10^{-2}$). Добавление к реакционной смеси очищенного SSB-белка понижало частоту возникновения ошибок еще в 10 раз.

ДНК-полимераза III *E. coli* также обладает $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью, придающей ферменту дополнительную корректорскую функцию. При использовании этого фермента для репликации ДНК фага фХ174 в системе *in vitro*, подобно тому как это показано на рис. 13.11, частота возникновения ошибок оценивается величиной $5 \cdot 10^{-7}$. Существенно отметить, что даже такая низкая величина намного превышает реальное значение частоты возникновения ошибок при синтезе ДНК *E. coli in vivo* (10^{-8} – 10^{-10}). Наблюдаемая повышенная точность процессов, протекающих *in vivo*, обусловлена существованием дополнительных репарационных функций, которые обсуждаются в следующем разделе.

Эукариотические ДНК-полимеразы не обладают $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью и обуславливают гораздо более высокую частоту возникновения ошибок при репликации ДНК фага фХ174 *in vitro*. При одинаковых условиях для эукариотических полимераз наблюдались следующие частоты: $3 \cdot 10^{-5}$ для ДНК-полимеразы α (Pol α), $1,2$ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ для ДНК-полимераз β и γ . Очевидно, что для обеспечения необходимой точности репликации в эукариотических клетках должны присутствовать дополнительные ферменты, повышающие точность этого процесса. Некоторые биохимические данные свидетельствуют о наличии у эукариот фермента с $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью, действующего в контакте с ДНК-полимеразой α . Этот фермент может обеспечивать корректорскую функцию *in vivo*, утрачиваемую в ходе очистки ДНК-полимеразы α .

Можно думать, что эволюция системы коррекции и других вариантов исправления ошибок репликации сделала возможным использование РНК в качестве затравки для обеспечения механизма синтеза отстающей цепи ДНК. Способность РНК-полимеразы синтезировать цепь *de novo* без какой бы то ни было затравки, вероятно, сопряжена с более высокой частотой возникновения ошибок, чем в случае ДНК-полимераз, способных функционировать только при наличии затравки. Удаление потенциально ошибочной РНК-затравки $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазами и ее замещение на ДНК, являющуюся объектом тщательного контроля и коррекции, устраняют проблему возникновения ошибок, связанную с инициацией синтеза *de novo*.

Исправление ошибок репликации и репарация ДНК

Несмотря на корректорские функции, присущие ДНК-полимеразам *E. coli*, некоторые нуклеотиды оказываются все же ошибочно включенными в новообразованную цепь ДНК. Их присутствие делает возможным возникновение спонтанных мутаций, в том случае если ошибки не будут исправлены до начала следующего цикла репликации. Свидетельства в пользу существования пострепликационных систем исправления ошибок, или репарации, были получены при изучении таких явлений, как

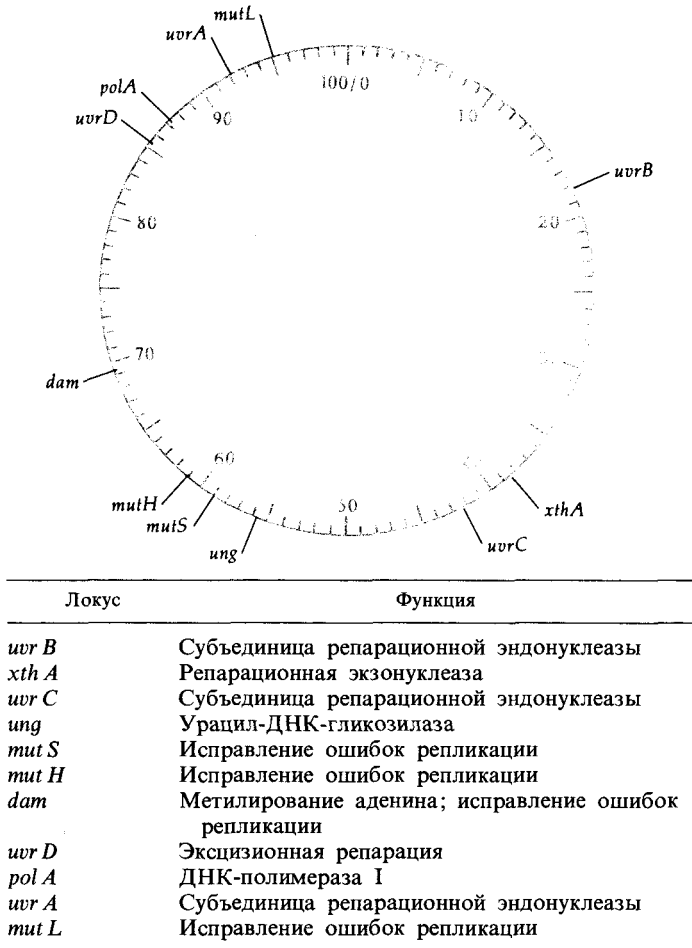
генная конверсия и высокая отрицательная интерференция, связанных с рекомбинационными процессами (см. гл. 14). Дополнительные данные были получены благодаря обнаружению мутаций, инактивирующих ферменты, вовлеченные в систему исправления ошибок репликации. Эти мутации заметно повышают частоту спонтанных мутаций во всех генах организма. Наиболее полно система исправления ошибок репликации изучена у *E. coli*.

Для нормального функционирования аппарата исправления ошибок, связанных с включением неправильных нуклеотидов, необходимо располагать механизмом, позволяющим отличать новосинтезированную цепь ДНК от родительской матричной цепи. В противном случае с вероятностью 1/2 будет происходить «исправление» нуклеотида в родительской цепи, приводящее к закреплению потенциально мутагенной ошибки, допущенной ДНК-полимеразой. Вероятно, для установления различий между родительской и дочерней цепями ДНК в *E. coli* используется метилирование аденина в последовательности GATC. Эта палиндромная последовательность обычно метилирована в обеих цепях родительской ДНК. При полуконсервативной репликации метилированной ДНК образуется дочерняя ДНК, в которой одна цепь, пришедшая от родительской ДНК, метилирована, а новообразованная цепь в течение некоторого времени после выхода из области репликативной вилки остается неметилированной. Следует заметить, что метилирование новообразованной цепи ДНК осуществляется ферментом, отличным от метилаз, входящих в систему рестрикции—модификации, обсуждавшуюся в гл. 9. Бактерии *dam*⁻, дефектные по метилированию аденина в результате нарушения синтеза соответствующей метилазы характеризуются повышенной частотой спонтанных мутаций, что подтверждает гипотезу об участии метилазы *dam* в системе исправления ошибок репликации.

Система исправления ошибок в ДНК включает несколько различных ферментативных функций. Процесс исправления начинается с вырезания участка новообразованной цепи, содержащей неправильно встроившийся нуклеотид, за которым следует заполнение образовавшейся брешы в ходе репарационного синтеза с использованием в качестве матрицы верной нуклеотидной последовательности родительской цепи. Было установлено участие в процессе вырезания четырех генов, точная функциональная роль каждого из которых пока неизвестна. Мутации в любом из этих генов (*mut H*, *mut L*, *mut S* и *uvr D*) вызывают проявление «мутаторного» фенотипа. Локализация этих генов на генетической карте *E. coli* показана на рис. 13.12. Полной инактивации системы исправления ошибок, описанной выше, можно достичь совмещением мутаций в этих генах в пределах одного и того же штамма *E. coli*. Такой штамм характеризуется частотой спонтанных мутаций около 10^{-6} – 10^{-7} ошибок на нуклеотид, т.е. такой же величины, что и при действии ДНК-полимеразы III *in vitro*. Таким образом, крайне низкий уровень спонтанных мутаций, наблюдаемый в норме у *E. coli*, обусловлен действием корректирующих функций ДНК-полимераз I и III, которые дополнительно подстрахованы системой исправления ошибок в новообразованной цепи ДНК.

Помимо ошибок, возникающих при репликации, ДНК также подвержена повреждениям, которые могут возникать спонтанно или под воздействием особых условий окружения. Для инициации удаления поврежденных нуклеотидов используются два основных типа репарационных

Рис. 13.12. Локализация генов *E. coli*, участвующих в исправлении ошибок репликации и репарации



функций. После удаления поврежденных участков бреши, образовавшиеся в одной из цепей, заполняются за счет репарационного синтеза с использованием в качестве матрицы комплементарной цепи ДНК. Первым важнейшим компонентом системы репарации ДНК служит специфическая репарационная эндонуклеаза. Она узнает заметно искаженные участки двойной спирали, возникающие в результате действия повреждающих агентов. Подобные искажения могут быть вызваны димеризацией пиримидиновых оснований, находящихся рядом в одной из цепей, под влиянием ультрафиолетового излучения (рис. 13.13) или образованием поперечных сшивок между двумя цепями ДНК за счет действия алкилирующих агентов. Репарационная эндонуклеаза у *E. coli* кодируется тремя различными генами, мутации которых повышают чувствительность клетки к действию повреждающих агентов. Расположение этих генов (*uvr A*, *uvr B*, *uvr C*) на хромосоме показано на

Рис. 13.13. Образование тиминовых димеров в одной из цепей ДНК включает формирование циклобутанового кольца (состоящего из четырех углеродных атомов) при взаимодействии атомов соседних пиримидиновых оснований.

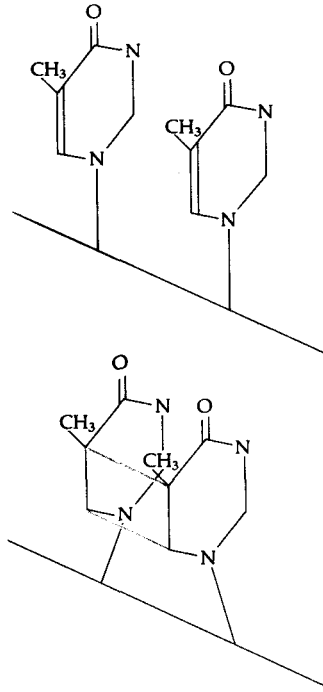
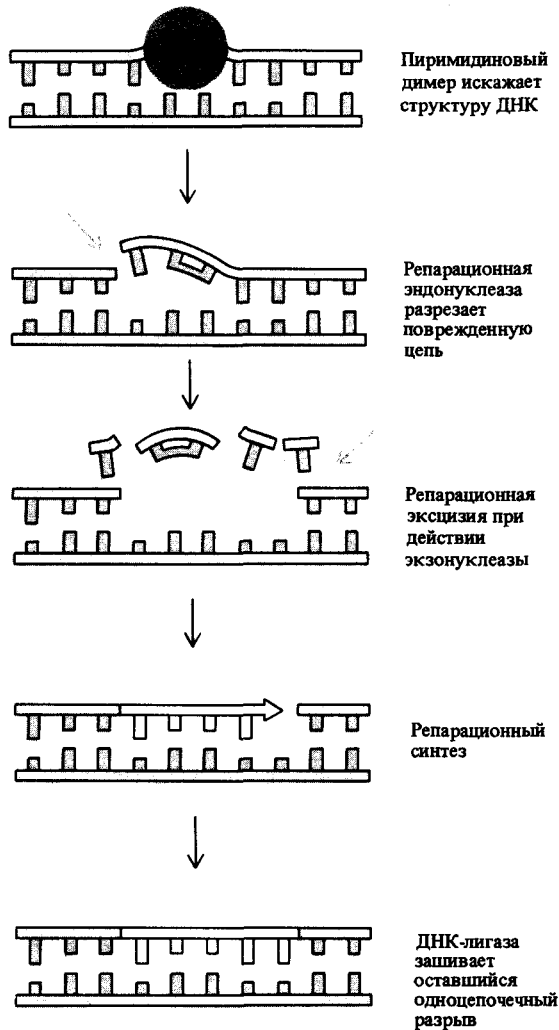


рис. 13.12. Репарационная эндонуклеаза вносит одноцепочечный разрыв фосфодиэфирной связи 3'-ОН/5'-РО₄ со стороны 5'-конца рядом с поврежденным участком. Далее за счет действия 5' → 3'-экзонуклеазной активности, например ДНК-полимеразы I, происходит вырезание поврежденного участка. Брешь заполняется ДНК-полимеразой I, выступающей в роли репарационной полимеразы (рис. 13.14).

Другой тип репарационных процессов основан на действии фермента, называемого ДНК-N-гликозилазой. Этот фермент узнает поврежденное основание и расщепляет его N-гликозидную связь с остатком дезоксирибозы в сахарофосфатном остове цепи ДНК. Таким образом, имеет место локальная апуринизация или апириминизация; возникает так называемый AP-сайт, узнаваемый AP-специфической эндонуклеазой, которая расщепляет фосфодиэфирную связь рядом с AP-сайтом (рис. 13.15). Остающийся на 5'-конце одноцепочечного разрыва остаток дезоксирибозы удаляется экзонуклеазой III (продукт гена *xthA*), а брешь заполняется с помощью обычного репарационного синтеза. В бактериальных и эукариотических клетках был обнаружен целый ряд различных N-гликозилаз. Один из ферментов этого типа узнает неправильную пару dG/dU, возникшую в результате спонтанного дезаминирования остатка dC из пары dG/dC. Дезаминирование цитозина может привести при репликации к возникновению мутантной нуклеотидной пары dA/dT, поскольку с точки зрения образования водородных связей урацил ведет себя аналогично тимину. Этот фермент — урацил-ДНК-гликозилаза в *E. coli* кодируется геном *ung*. Мутации в этом гене лишают клетку способности исправлять повреждения описанного типа, что по-

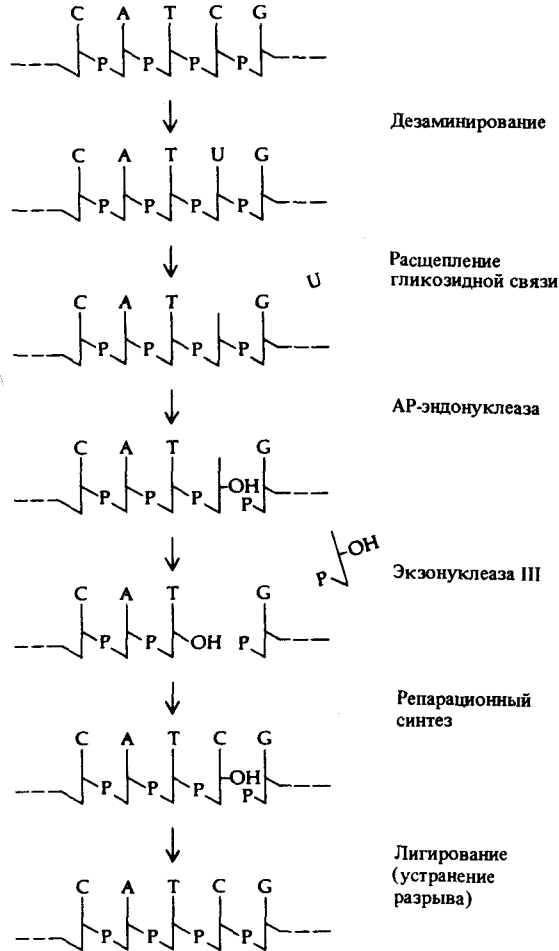
Рис. 13.14. Этапы вырезания и репарации поврежденного участка молекулы ДНК.



вышает частоту возникновения мутаций в 5 раз (рис. 13.15). Другие N-гликозилазы проявляют специфичность к повреждениям, вызванным действием алкилирующих агентов, таких, как сильный канцероген – диметилнитрозамин. Известны также N-гликозилазы, ответственные за репарацию тиминовых димеров, образование которых индуцируется ультрафиолетовым излучением.

Некоторые люди, гомозиготные по мутантному гену, вызывающему пигментную ксеродерму (*Xeroderma pigmentosum*), обладают повышенной чувствительностью к солнечному свету, склонны к аномальной пигментации кожи и подвержены заболеванию раком кожи. Известно несколько различных генетических форм этой болезни, и по крайней мере некоторые из них связаны с неспособностью клеток к вырезанию тиминовых димеров.

Рис. 13.15. Удаление поврежденного основания при действии урацил-ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы сопровождается в дальнейшем репарационным синтезом ДНК с использованием в качестве матрицы комплементарной цепи (не показана).



Каждый день появляются все новые данные, свидетельствующие о большом разнообразии систем репарации ДНК, функционирующих как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Эволюция этих систем несомненно обусловлена особым значением метаболических путей, обеспечивающих сохранность и точность передачи наследственной информации. В то же время ясно, что никакая система передачи информации не может быть совершенной и допускает возникновение мутаций, которые могут выступать в роли «сырья» для естественного отбора.

Литература

- Alberts B., Sternglanz R. (1977). Recent excitement in the DNA replication problem, *Nature*, **269**, 655–661.
- Arai K.-I., Kornberg A. (1979). A general priming system employing only *dnaB* protein and primase for DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4308–4312.
- Arai K.-I., Arai N., Shlomag J., Kornberg A. (1980). Replication of duplex DNA of phage ϕ X174 reconstituted with purified enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3322–3326.
- Arai K.-I., Low R.L., Kornberg A. (1981). Movement and site selection for priming by the primosome in phage ϕ X174 DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 707–711.
- Fersht A.R. (1979). Fidelity of replication of phage ϕ X174 DNA by DNA polymerase III holoenzyme: spontaneous mutation by misincorporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4946–4950.
- Grickman B.W., Radman M. (1980). *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1063–1067.
- Kaguni J.M., Fuller R.S., Kornberg A. (1982). Enzymatic replication of *E. coli* chromosomal origin is bidirectional, *Nature*, **296**, 623–627.
- Kornberg A., 1980. *DNA Replication*, W. H. Freeman, San Francisco.
- Kunkel T.A., Loeb L.A. (1981). Fidelity of mammalian DNA polymerases, *Science*, **213**, 765–767.
- Lehman I.R. (1974). DNA ligase: structure, mechanism, and function, *Science*, **186**, 790–797.
- Lehman I.R., Uyemura D.G. (1976). DNA polymerase I: essential replication enzyme, *Science*, **193**, 963–969.
- Shlomag J., Kornberg A. (1980). An *Escherichia coli* replication protein that recognizes a unique sequence within a hairpin region in ϕ X174 DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 799–803.
- Wechsler J.A., Gross J.D. (1971). *Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis, *Mol. Gen. Genet.*, **113**, 273–284.

Ключевые слова и понятия

- | | |
|---|---|
| Белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (SSB-белок) | Праймаза |
| Ведущая цепь | Праймосома |
| Гены <i>dna</i> | Пятнистая ксеродерма (<i>Xeroderma pigmentosum</i>) |
| ДНК-N-гликозилаза | Репарационная эндонуклеаза |
| ДНК-лигаза | Репарация ДНК |
| ДНК-полимеразы α , β и γ | Топоизомераза |
| ДНК-полимеразы I, II и III (PolI, PolII, PolIII) | Фрагменты Оказаки |
| Затравка (праймер) | Хеликаза |
| Исправление ошибок репликации | Экзонуклеазная активность |
| Одноцепочечный разрыв | 5' → 3' |
| Отстающая цепь | 3' → 5' |
| <i>ori</i> (точка начала репликации) | Экзационная репарация |

Задачи

13.1. Перечислите основные отличия ДНК-полимераз и РНК-полимераз. Каковы общие свойства этих ферментов?

13.2. Объясните, каким образом генетический анализ можно использовать для

изучения этапов сложного биохимического процесса.

13.3. Выделены три некомплементирующие температурочувствительные мутации по инициации репликации ДНК у *E.*

coli. Клеточные экстракты каждого из трёх мутантных штаммов проверяли на способность направлять синтез комплементарных цепей по одноцепочечной кольцевой ДНК-матрице *in vitro*. На основании данных, приведенных в таблице («+» означает протекание репликации), определите, в каких генах могут локализоваться рассматриваемые мутации. Предскажите характер поведения клеточных экстрактов двойных мутантов *wz*, *xz*, *wx*.

Клеточный экстракт	ДНК-матрица		
	φX174	G4	M13
Мутант <i>w</i>	—	—	—
Мутант <i>x</i>	—	+	+
Мутант <i>z</i>	+	+	—

13.4. Как, располагая температурочувствительной мутацией, блокирующей синтез бактериальной ДНК при рестриктивной температуре, определить, затрагивает ли она процесс элонгации цепи ДНК в репликативной вилке или инициацию синтеза ДНК на участке *ori*?

13.5. Изобразите предполагаемую кинетику включения ³H-тимина в ДНК до и после изменения температуры от 30° до 42° при культивировании температурочувствительных мутантов *E. coli*, содержащих мутации: (а) в гене *dna A* и (б) в гене *dna E*. Известно, что рифампицин ингибирует РНК-полимеразу. Изобразите ожидаемый кинетический профиль включения ³H-тимина в ДНК до и после добавления рифампицина к культуре *E. coli* дикого типа.

13.6. Объясните, почему нормальная система исправления ошибок репликации *E. coli* вызывает повышение частоты возникновения мутаций у штаммов *dam*⁻?

13.7. Фаг λ дикого типа неспособен формировать бляшки на газоне мутантных штаммов *E. coli dna B*⁻, *dna C*⁻, *dna E*⁻, *dna G*⁻ при рестриктивной температуре. В то же время фаг T7 дикого типа способен нормально развиваться на всех этих хозяевах при рестриктивной температуре. Какой вывод можно сделать о структуре генома этих двух типов фагов?

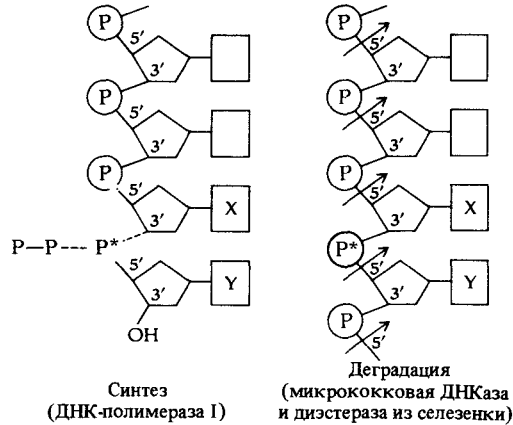
13.8. Предложите метод, с помощью которого можно определить, играет ли В-белок существенную роль в репликации ДНК *E. coli* или участвует только в репликации одноцепочечной фаговой ДНК.

13.9. Опишите два различных способа, которые могут использоваться для репарации дефектных оснований в ДНК.

13.10. Фаг T7 содержит линейную двухцепочечную по всей длине молекулу ДНК. Частичное расщепление этой ДНК экзонуклеазой III с последующим отжигом выявляет наличие в ее структуре концевых повторов. При этом в отличие от фагов T2 и T4 у фага T7 не происходит кольцевых перестановок генов. При инфекции фагом T7 репликация фаговой ДНК иницируется на участке *ori*, расположенном на расстоянии, соответствующем 17% общей длины молекулы от левого конца ДНК. В репликации участвует линейная молекула ДНК; кольцевые формы не образуются. На более поздних стадиях инфекции наблюдается образование весьма протяженных линейных конкатемеров ДНК T7. Предложите модель репликации ДНК фага T7, объясняющую необходимость возникновения конкатемерных структур для полной репликации линейного фагового генома.

13.11. Используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из любого организма, расщепленную на относительно небольшие фрагменты, содержащие одноцепочечные разрывы, с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* можно получить представительный набор меченых последовательностей, соответствующих последовательностям исходной ДНК. Если единственным радиоактивным предшественником служит один из четырех нуклеотидов [α -³²P] dUTP, то при последующей ферментативной деградации меченой ДНК будут образовываться 3'-³²P-дезоксирибонуклеотиды, как показано на рис. 13.16. При наличии в реакционной смеси одного из четырех меченых предшественников (dNTP) и трех немеченых предшественников (dNTP) после синтеза и деградации по аналогичной схеме, располагая методом разделения и идентификации всех четырех 3'-³²P-дезоксирибонук-

Рис. 13.16. Введение метки (^{32}P) при синтезе ДНК с помощью ДНК-полимеразы I и последующая деградация ДНК под действием микрококковой ДНКазы и дизстеразы из селезенки. Матричная цепь не показана. Заметьте, что радиоактивный фосфор, первоначально связанный с нуклеотидом Y, переносится при расщеплении на нуклеотид X.



клеотидов, можно для каждого из них определить количество связавшейся метки ^{32}P . С помощью такого подхода можно определить для нуклеотида частоту встречаемости соседних нуклеотидов. Поясните, как это сделать. Как, опираясь на полученные данные, показать, что в двухцепочечной структуре ДНК комплементарные цепи скорее антипараллельны $5' \text{---} 3'$ $3' \text{---} 5'$, чем параллельны $5' \text{---} 3'$ $5' \text{---} 3'$?

13.12. Штамм *E. coli lacZ⁻*, несущий $F' \text{Lac}^+$ -фактор, мутагенизировали и высевали на лактозный ЕМВ-питательный агар при температуре 30° . (На этой среде колонии Lac^+ имеют красную окраску, а Lac^- бесцветны.) Выросшие колонии перепечатаывали на другую чашку с ЕМВ-питательным лактозным агаром и инкубировали при 42° . На этой чашке удалось обнаружить несколько бесцветных коло-

ний, которые на исходной чашке при 30° были красными. Некоторые бесцветные колонии возникли в результате температурочувствительных мутаций *lac* в факторе $F' \text{Lac}^+$; другие сформированы температурочувствительными мутантами по репликации фактора F' . Предложите способ, с помощью которого можно различить между собой представителей этих двух типов мутантов. Среди штаммов, теряющих при 42° $F' \text{Lac}^+$ -фактор, некоторые несут температурочувствительную мутацию, блокирующую репликацию F' -фактора в бактериальной хромосоме, а другие — на самом факторе F' . Как бы вы могли различить эти мутанты? Какие виды генов могут оказаться поврежденными в этих мутантах? (Заметьте, что для репликации фактора F' необходимо его прикрепление к особым участкам клеточной мембраны.)

Рекомбинация

Рекомбинационные процессы между родительскими геномами с различными генотипами приводят к возникновению новых сочетаний генов в дочерних геномах. Есть основания полагать, что рекомбинация является одним из важнейших факторов эволюции. Она позволяет новым генетическим вариантам, возникшим у различных представителей популяции, объединиться и пройти проверку на совместимость в рамках одного и того же организма. Возникновение и развитие механизмов (половых процессов), способствующих обмену генетической информацией между отдельными особями, прослеживается на уровне любых живых организмов — от одноклеточных прокариот до высших эукариот.

Разделение клеточной ДНК на относительно независимые компоненты (хромосомы) облегчает рекомбинацию посредством независимого комбинирования компонентов, в роли которых могут выступать, например, различные хромосомы гороха в опытах Менделя (см. гл. 2), бактериальные кольцевые хромосомы и эписомы (см. гл. 8). Помимо этого, как было показано в 1-й части книги, существенную роль играют рекомбинационные процессы между последовательностями ДНК в схожих, или гомологичных, хромосомах.

В этой главе основное внимание будет уделено молекулярным механизмам процессов, связанных с рекомбинацией ДНК. Эти процессы можно разделить на три категории: *общая рекомбинация*, которая происходит между гомологичными последовательностями ДНК; *сайт-специфическая рекомбинация*, затрагивающая молекулы ДНК, характеризующиеся ограниченным структурным сходством, и так называемая *незаконная рекомбинация*, в которую могут вовлекаться молекулы ДНК, не имеющие никакого структурного сходства.

Общая рекомбинация

Общая рекомбинация, протекающая между гомологичными молекулами ДНК или гомологичными хроматидами в мейозе, широко обсуждалась при изложении материала предыдущих глав, поскольку это явление лежит в основе генетического картирования. Протекание рекомбинационных процессов между гомологичными ДНК характеризуется очень высокой точностью, обусловленной точным спариванием оснований нуклеотидных последовательностей, вступающих в рекомбинацию родительских цепей ДНК.

На рис. 14.1 проиллюстрированы наши сегодняшние представления о последовательности событий, приводящих к возникновению рекомбинантных ДНК из двух родительских молекул ДНК. В первой серии изображений (рис. 14.1, А–Г) показан процесс обмена одноцепочечными участками между родительскими двухцепочечными молекулами ДНК, который сводится к образованию структуры креста. После образования такой структуры центр ее может перемещаться вдоль спаренных цепей ДНК подобно замку застёжки «молния». При этом происходит размыкание водородных связей между комплементарными основаниями внутри одной родительской молекулы ДНК и замыкание соответствующих связей между основаниями цепей из различных родительских молекул ДНК. Этот процесс может приводить к образованию протяженных гетеродуплексных участков в обеих родительских молекулах ДНК (рис. 14.1, Д). Благодаря возникновению гетеродуплексов обеспечивается высокая точность взаимодействия гомологичных участков ДНК. Образование такой крестообразной структуры, или *структуры Холлидея*, было впервые предсказано в 1964 г. Робином Холлидеем, исходя из генетических данных по изучению геной конверсии (этот процесс рассмотрен ниже). Структуру Холлидея можно изобразить так, как показано на рис. 14.1, Е. Вращение такой структуры вокруг точки перекреста может приводить к образованию другой изомерной формы (рис. 14.1, Ж, З). При разрезании структуры двумя возможными способами (рис. 14.1, И–Л) могут вновь возникать линейные молекулы ДНК различного типа. При разрезании по вертикальной оси образуются линейные молекулы, рекомбинантные по родительским генетическим маркерам, расположенным по обе стороны от гетеродуплексного участка ДНК. При разрезании по горизонтальной оси две образовавшиеся молекулы ДНК не будут рекомбинантными по родительским маркерам, фланкирующим область перекреста, но обе будут содержать по гетеродуплексному участку.

Современные представления о механизме общей рекомбинации, отраженные на рис. 14.1, являются результатом многолетних генетических и биохимических исследований этого процесса как у прокариотических, так и у эукариотических организмов. Мы вкратце рассмотрим данные, свидетельствующие в пользу рассмотренной модели рекомбинации. Большая часть таких данных была получена при физическом и генетическом изучении молекул ДНК плазмид или бактериофагов. Ввиду относительно небольшого размера этих молекул при работе с ними довольно легко удастся избежать их физического повреждения. Некоторые генетические данные, позволившие предсказать определенные детали механизма рекомбинации, были получены при изучении явлений геной

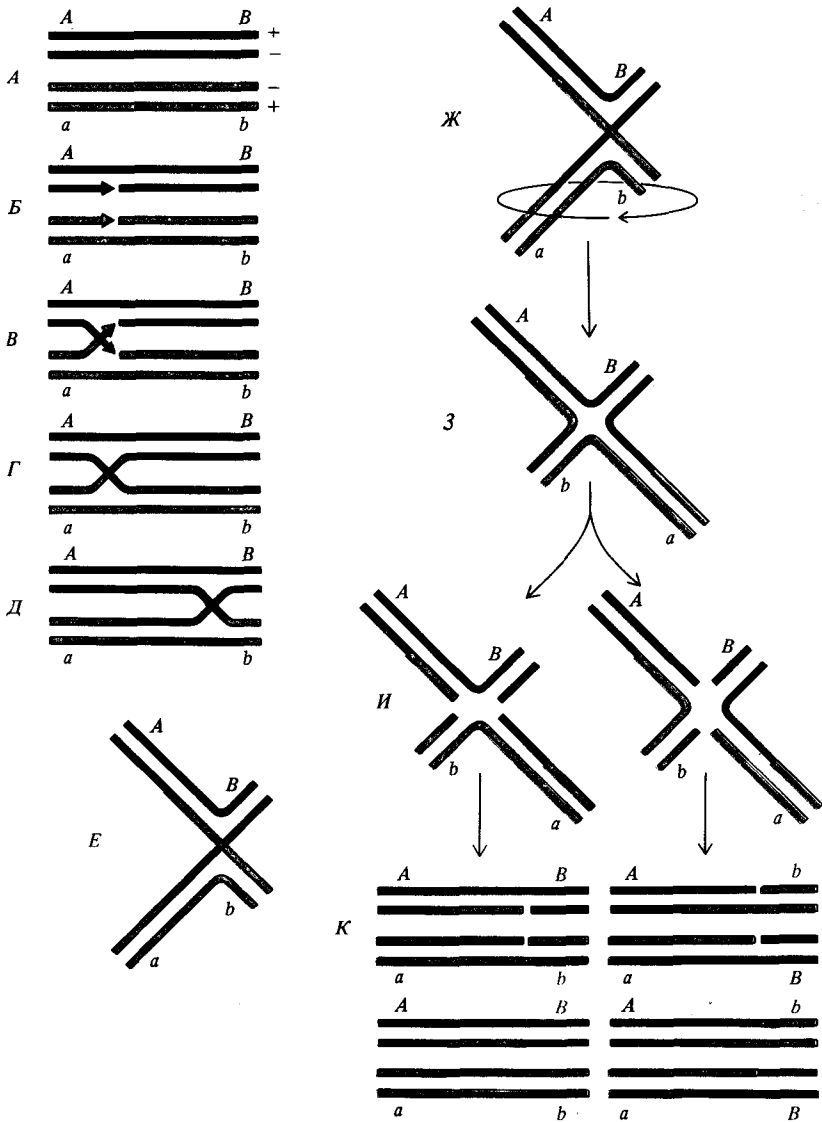


Рис. 14.1. Общая рекомбинация – модель Холлидея. Обратите внимание, что перемещение области перекреста может приводить к образованию протяженных участков гетеродуплексной ДНК. Показаны два варианта промежуточной структуры при рекомбинации, отличающиеся поворотом на 180° вокруг вертикальной оси. Возможны два спо-

соба расщепления структуры креста: один из них приводит к рекомбинации маркеров, фланкирующих гетеродуплексную область ДНК, расщепление вторым способом не приводит к рекомбинации. (По Potter H., Dressler D., 1976. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3000.)

конверсии у грибов и высокой отрицательной интерференции (о которой также пойдет речь позже) у целого ряда организмов. Кроме того, генетический анализ рекомбинационных процессов у *E. coli* позволил выявить и изучить *in vitro* ряд важнейших ферментов, участвующих в рекомбинации.

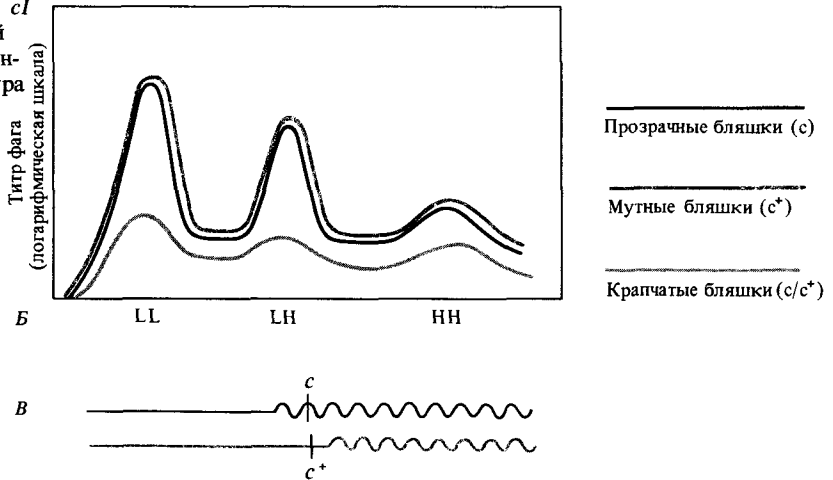
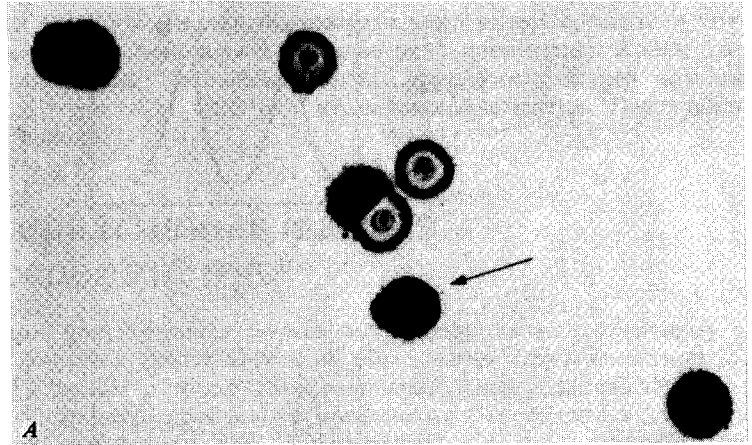
Консервативный разрыв и воссоединение

Важнейшим допущением в рамках модели, проиллюстрированной на рис. 14.1, является представление об образовании рекомбинантных молекул ДНК за счет разрыва и воссоединения цепей родительских молекул. Этот процесс происходит независимо от процесса полуконсервативной репликации ДНК. Консервативная природа рекомбинации была впервые выявлена при работе с фагом λ .

Фаги, размножившиеся в клетках *E. coli*, растущих на среде, содержащей тяжелые изотопы азота и углерода — ^{15}N и ^{13}C , могут быть легко отделены от фагов, культивируемых на обычной среде, содержащей легкие изотопы ^{14}N и ^{12}C (рис. 14.2, А). На рис. 14.2, Б показано распределение по плотности фагового потомства, образующегося при инфекции «тяжелыми» фагами (множественность инфекции около 1) клеток, растущих на «легкой» среде. Большинство дочерних фагов содержит «легкую» ДНК, состоящую из двух новосинтезированных легких цепей. В небольшой части фагового потомства содержится ДНК, возникшая в результате полуконсервативной репликации родительской ДНК «тяжелых» фагов и состоящая из одной тяжелой и одной легкой цепи. Такие фаговые частицы характеризуются более высокой плотностью. На рис. 14.2, В показан характерный профиль распределения по плотности дочерних фагов, образующихся при заражении «легких» клеток «тяжелыми» фаговыми частицами с высокой множественностью инфекции (~ 20 фагов на клетку). В этом случае некоторые из вошедших в клетку фаговых геномов не успевают реплицироваться, а заново упаковываются в головки, образовавшиеся при созревании фагового потомства. Эти нереплицированные геномы можно идентифицировать в виде третьего, самого тяжелого пика при фракционировании смеси дочерних фагов. Изучение фагового потомства, образовавшегося при одновременной множественной инфекции клеток, растущих на легкой среде, тяжелыми фагами с двумя различными генотипами $a+$ и $+b$, показало, что некоторые фаговые частицы с нереплицированным геномом характеризуются рекомбинантным генотипом $+/+$ (рис. 14.2, Г). Это означает, что рекомбинация родительских геномов может происходить независимо от репликации ДНК.

На рис. 14.1 показано, что образование рекомбинантных молекул ДНК за счет разрыва и воссоединения цепей сопровождается возникновением гетеродуплексного участка ДНК. Образование таких гетеродуплексов не обязательно связано с последующим «разрезанием» структуры Холлидея, которое приводит к рекомбинации фланкирующих генетических маркеров. Генетическим свидетельством образования гетеродуплексных молекул ДНК является факт существования гетерозиготных фагов λ , которые при инфекции с множественностью 1 фаг на

Рис. 14.3. А. Фотография чашки Петри, на которой видна морфология негативных колоний (бляшек), образуемых фаговыми частицами λcI (прозрачные), λcI^+ (мутные) и гетерозиготами $\lambda cI^+ / cI$ (кряпчатые; показана стрелкой). (Courtesy Dr. Meselson, Harvard University.) Б. Распределение по плотности фагового потомства, образующегося при инфекции клеток на легкой среде целиком тяжелыми фагами с генотипами cI и cI^+ при высокой множественности инфекции. В. Структура ДНК гетерозиготы $\lambda cI^+ / cI$.

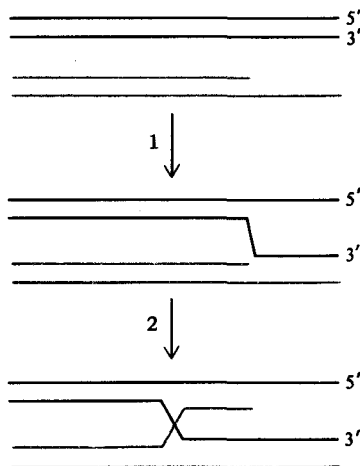


Генетический анализ рекомбинации

С помощью генетического анализа удалось идентифицировать ферменты, участвующие в процессе общей рекомбинации у *E. coli*. При скрининге мутагенезированных клеток F^- методом «отпечатков» можно на исходной чашке обнаружить колонии мутантных клеток, неспособных к образованию рекомбинантов при конъюгации с клетками Hfr на чашке-реплике. Оказалось, что мутации, влияющие на способность к рекомбинации, локализируются в трех генах, обозначенных *recA*, *recB* и *recC*. При изучении таких мутантов удалось идентифицировать функционирующие в нормальных клетках белки, кодируемые каждым из трех генов.

Белок *RecA* представляет собой удивительный полифункциональный фермент, вовлеченный как в общую рекомбинацию, так и в репарацию ДНК. Ген $recA^+$ необходим для протекания всех процессов в системе

Рис. 14.4. Белок RecA принимает участие в двух последовательных этапах переноса цепей при образовании структуры Холлидея. Этап 1: перенос одной из цепей двухцепочечной ДНК к комплементарному участку другой молекулы ДНК, содержащему разрыв в гомологичной цепи. Этап 2: реципрокный перенос цепи с образованием области перекреста, которая может перемещаться вдоль двухцепочечных участков ДНК обоих партнеров.



общей рекомбинации у *E. coli*. Очищенный белок способен направлять все основные этапы образования структур Холлидея *in vitro*. Молекулы белка RecA связываются как с двухцепочечными, так и с одноцепочечными молекулами ДНК и, используя энергию гидролиза АТФ, могут расплетать двойную спираль ДНК. Благодаря этому оказывается возможным взаимодействие комплементарных цепей различных молекул ДНК, участвующих в рекомбинации. Эта функция белка RecA обеспечивает осуществление процесса конъюгации (синапсиса) молекул ДНК с гомологичными нуклеотидными последовательностями (см. рис. 14.4, этап 1). Белок RecA катализирует также последующую переориентацию цепей с образованием крестообразной структуры Холлидея и дальнейшим перемещением области перекреста (рис. 14.4, этап 2).

Удобной моделью для изучения рекомбинации *in vivo* могут служить присутствующие в клетках *E. coli* небольшие кольцевые молекулы плазмидных ДНК. При электронном микроскопировании очищенных препаратов ДНК плазмиды ColE1 видно, что они содержат преимущественно кольцевые молекулы единичной длины, то есть мономеры. Однако удается обнаружить и некоторое количество молекул ДНК, имеющих форму восьмерки, в которой две мономерные плазмиды соединены в одной точке пересечения. Плаزمид ColE1 содержит один сайт узнавания для рестриктазы *EcoRI*. Расщепление «восьмерок» этой рестриктазой приводит к образованию двух изомерных форм, напоминающих структуры Холлидея (рис. 14.5). При этом, как видно из рис. 14.5, образуются по две пары плеч одинаковой длины, что указывает на то, что вышеупомянутые «восьмерки» действительно состоят из двух одинаковых плазмидных молекул, соединенных между собой крестообразной перемычкой. В плазмидных препаратах, полученных из штаммов *E. coli recA⁻*, «восьмерки» не образуются. Это означает, что они, по всей видимости, представляют собой промежуточные структуры, возникающие в ходе *recA⁺*-зависимой рекомбинации между плазмидами. В то же время эти промежуточные структуры присутствуют в препаратах ДНК из

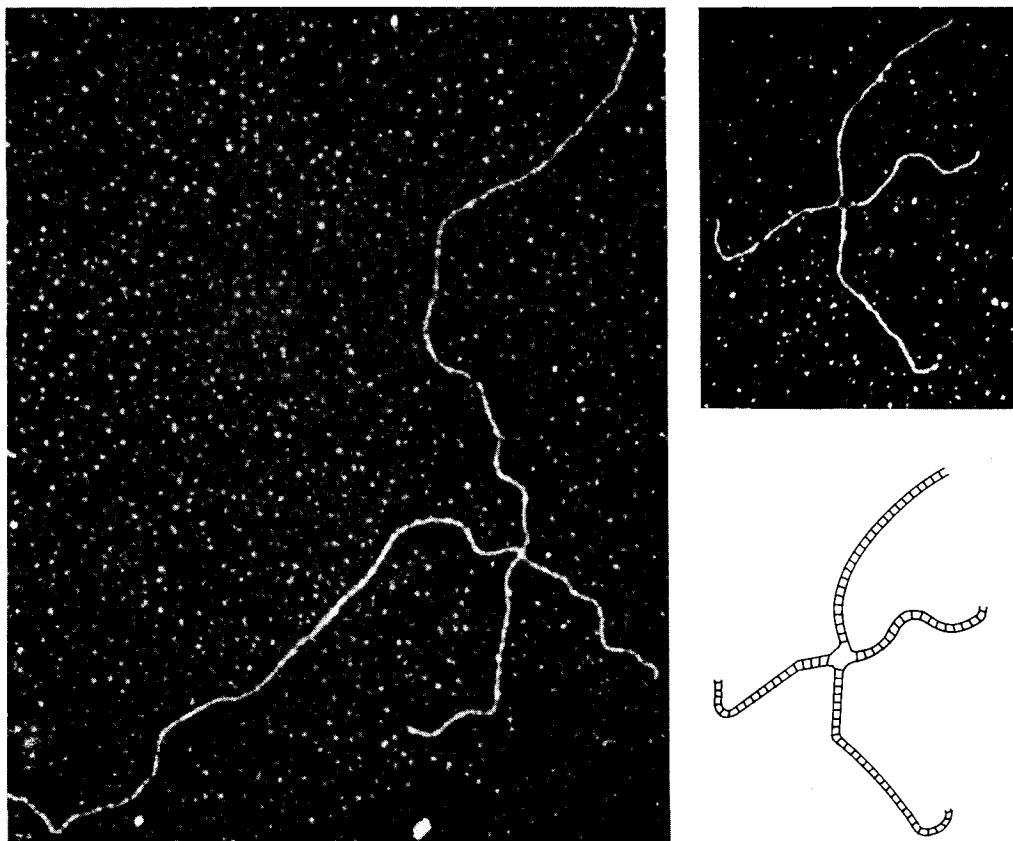


Рис. 14.5. Полученная с помощью электронного микроскопа фотография структуры Холлидея, образующейся при рекомбинации кольцевых плазмидных ДНК в *E. coli*. Кольцевые молекулы линейаризованы при расщеплении рестриктазой *Eco* RI (данная плаزمида содержит только один участок расщепления

рестриктазой *Eco* RI). Две изображенные структуры являются изомерными формами структуры Холлидея. На правой фотографии видна область расхождения одноцепочечных участков. (По Potter H., Dressler D., 1976. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3000.)

штаммов *E. coli* *recB*⁻ или *recC*⁻. То есть можно предположить, что продукты этих двух генов участвуют в рекомбинационном акте после белка RecA. В действительности гены *recB*⁺ и *recC*⁺ кодируют две субъединицы АТР-зависимой нуклеазы. Эта нуклеаза, вероятно, выступает в роли фермента, специфически разрезающего (разрешающего) структуру Холлидея для завершения процесса рекомбинации.

Белок RecA играет также ключевую роль в репарации повреждений ДНК, вызванных воздействием ультрафиолетовых лучей или некоторых химических агентов на клетки *E. coli*. Активация такой репарационной функции происходит при взаимодействии с одноцепочечными участками ДНК, образование которых непосредственно связано с повреждениями в молекуле ДНК. Белок RecA обладает протеолитической активностью, стимулируемой одноцепочечными ДНК. Эта протеолитическая активность проявляется в расщеплении по крайней мере двух типов белков-

репрессоров. Один из них – это репрессор фага λ , расщепление которого приводит к индукции профага. Другой *recA*-чувствительный репрессор является продуктом гена *lexA*. Этот репрессор вовлечен в регуляцию уровня экспрессии гена *recA* и ряда других генов, отвечающих за репарацию ДНК и другие, так называемые SOS-функции, способствующие выживанию клетки в экстремальных условиях. В норме репрессор *lexA* обеспечивает лишь невысокий уровень экспрессии гена *recA*, достаточный для обеспечения процессов общей рекомбинации. Однако при повреждении ДНК, угрожающем жизни клетки, стимулируется протеолитическая активность белка RecA и происходит расщепление репрессора *lexA*. Это приводит к индукции генов *uvr* (они обсуждались в гл. 13) и других генов, связанных с репарацией ДНК и восстановлением нормальной жизнедеятельности клетки. Белок RecA в условиях его повышенной продукции, вероятно, непосредственно участвует в репарации, направляя рекомбинацию между поврежденными и неповрежденными участками дочерних молекул ДНК после репликации. Рассмотренные в этом разделе экспериментальные наблюдения позволяют сделать вывод о том, что образование структур Холлидея является промежуточным этапом в процессе рекомбинации у *E. coli*. Формирование и разрешение структур этого типа находится под генетическим контролем. Модель Холлидея была изначально предложена им для интерпретации данных по рекомбинации при мейотическом делении, т. е. для эукариот. Применимость этой модели и для прокариот позволяет считать, что основные механизмы рекомбинации, характерные для прокариот и эукариот, очень схожи. Сейчас мы перейдем к рассмотрению доказательств реального существования структур Холлидея, а также данных, позволяющих представить процесс образования таких структур у эукариот.

Высокая отрицательная интерференция и генная конверсия

Анализ частот возникновения рекомбинантных генотипов при трехфакторном скрещивании дает дополнительное (хотя и косвенное) подтверждение тому, что процесс рекомбинации сопровождается образованием гетеродуплексных участков ДНК. Впервые это было отмечено при изучении явления высокой отрицательной интерференции при скрещиваниях с участием очень тесно сцепленных генетических маркеров. Понятие «интерференция» (I), введенное нами в гл. 5, определяется формулой $I = 1 - c$, где c – коэффициент совпадения (коинциденции), т. е. отношение числа наблюдаемых двойных перекрестов к числу ожидаемых, при трехфакторном скрещивании. В большинстве случаев при скрещиваниях с участием маркеров в трех различных сцепленных генах ($x - y - z$) оказывается, что образование перекреста между x и y снижает вероятность образования второго перекреста в интервале между y и z . То есть в таких скрещиваниях величина c меньше 1, а I соответственно положительное число, отражающее наблюдаемую величину интерференции (см. гл. 5).

Рекомбинация очень тесно сцепленных маркеров как в прокариотических, так и в эукариотических организмах, как правило, характери-

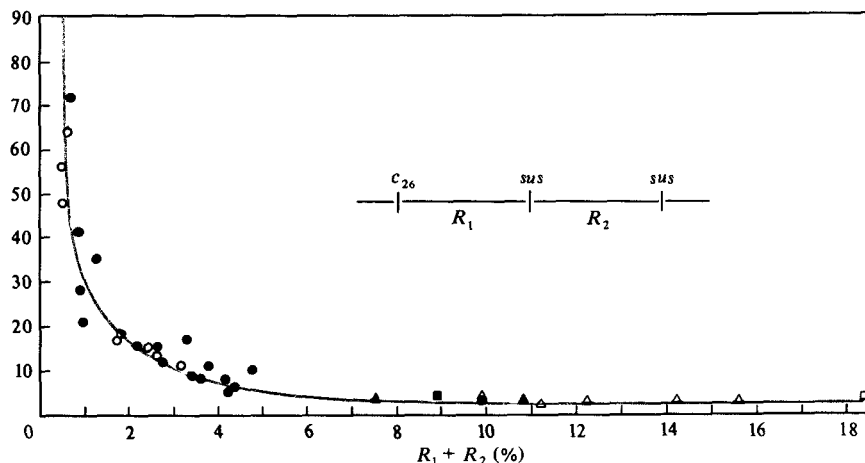


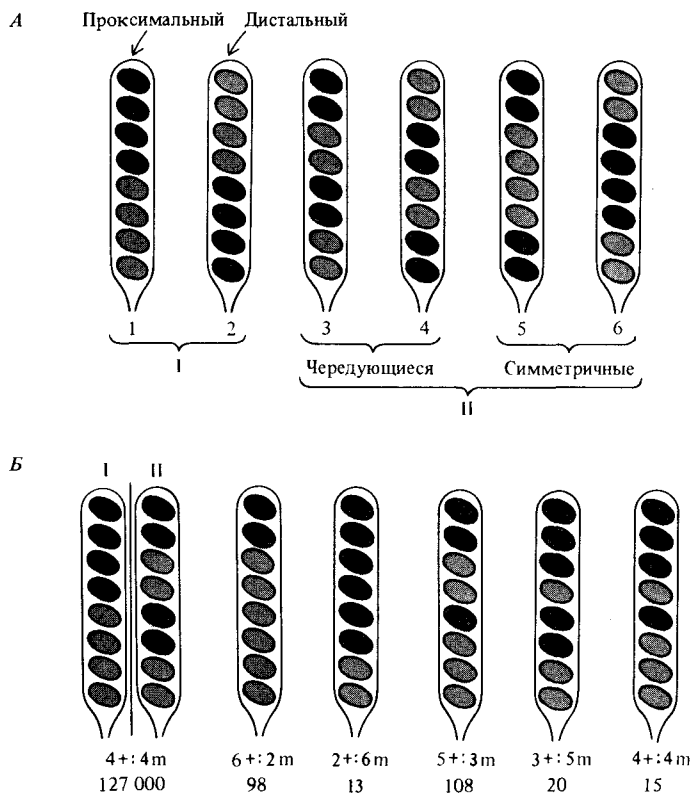
Рис. 14.6. Коэффициент коинциденции c является функцией суммы частот рекомбинации R_1 и R_2 между маркерами фага λ в серии различных трехфакторных скрещиваний (область рекомбинации отмечена). (По Amati P., Meselson M., 1965. Genetics, 51, 369.)

зуется значениями c , значительно большими 1. Это явление, характеризующее отрицательными значениями величины I , называют *высокой отрицательной интерференцией*. Иначе говоря, вероятность двойного кроссинговера оказывается значительно выше ожидаемой. В этом можно убедиться на ряде примеров (приведенных в гл. 7 и 8), отражающих данные по генетическому картированию, которое проводилось для некоторых фагов и бактерий. Высокая отрицательная интерференция (иногда называемая также локализованной отрицательной интерференцией) наблюдается, например, в ряде трехфакторных скрещиваний между мутантами фага λ . Значения c для каждого скрещивания представлены на графике (рис. 14.6) в форме зависимости от суммы частот рекомбинации в двух интервалах для каждой пары из трех использованных мутантов. При $R_1 + R_2 < 0,01$ наблюдаемое значение c для внешних маркеров превышает 70, что соответствует высоким отрицательным значениям I .

Четырех- или пятифакторное скрещивание позволяет наблюдать тройные и четверные перекресты. При этом также обнаруживается, что тройные и четверные обмены имеют место чаще, чем можно было бы ожидать, полагая, что они происходят независимо друг от друга.

Достаточно наивная и, как стало ясно впоследствии, неверная интерпретация этих наблюдений сводилась к предположению, что на небольших участках ДНК двойные перекресты возникают чаще, чем можно ожидать на основании данных о частоте кроссинговера для каждой пары генетических маркеров. Сегодня мы понимаем, что явление высокой отрицательной интерференции в действительности связано не с возникновением множественных кроссинговеров на небольших участках хромосомы, как можно было бы полагать, исходя из определения интерференции. Напротив, в основе этого явления лежат процессы, затрагивающие область единичного перекреста. Механизмы, обуславливающие высокую отрицательную интерференцию, наблюдающуюся при фаговом скрещивании, оставались неясными до тех пор, пока аналогич-

Рис. 14.7. Нормальные и aberrантные аски, возникающие при скрещивании мутанта с серыми спорами и штамма дикого типа (черный цвет спор) гриба *Sordaria fimicola*. А. Изображены по группам обычные варианты расщепления: I. Проксимальный и дистальный варианты, образующиеся в результате расщепления при первом делении. II. Варианты чередующегося и симметричного распределения при расщеплении в ходе второго деления. Б. Нормальные и aberrантные аски распределены по группам независимо от симметрии расщепления. В нижней строчке приведены количественные данные, отражающие частоту образования каждого типа асков. (По Kitani Y. et al., 1962. Am. J. Bot., 49, 697.)



ное явление не было обнаружено и изучено у грибов и связано с другим процессом, получившим название *генной конверсии*. У грибов все продукты мейоза представлены в виде группы спор, расположенных внутри аска (см. гл. 5). При скрещивании двух родительских штаммов, несущих различные аллели определенного гена, оба родительских генома оказываются в равной степени представлены в образующейся диплоидной клетке, которая впоследствии и подвергается мейозу. Диплоидная клетка гетерозиготна – в ней присутствуют одновременно оба аллеля интересующих нас генов. Можно полагать, что образовавшиеся при мейозе и содержащиеся в одном аске споры будут характеризоваться одинаковым содержанием каждого из двух аллелей, участвовавших в скрещивании. В этом можно убедиться на примере распределения двух аллелей гена, ответственного за пигментацию спор у гриба *Sordaria fimicola*. Характер расщепления мутантного (серые споры) и дикого (черные споры) аллелей представлен на рис. 14.7. В зависимости от того, происходит расщепление при первом или при втором мейотическом делении, наблюдается один из вариантов расщепления, изображенных в верхней части рисунка. Каждый аск содержит по четыре черные споры дикого типа и по четыре серые мутантные споры [4 + :4m]. Однако при анализе большого числа асков в некоторых из них обнаруживается aberrантный характер расщепления. Пять типов aberrантных асков изображены на

рис. 14.7 с указанием количественных данных, характеризующих частоту встречаемости для каждого типа.

А priori можно было бы полагать, что aberrантные аски возникают за счет мутаций, превращающих черные споры дикого типа в серые и, напротив, серые мутантные споры в черные в ходе мейоза. Однако внимательное изучение этого явления показало, что образование aberrантных асков не связано непосредственно с возникновением мутаций. Напротив, было установлено, что причина aberrантного расщепления заключена в явлении, связанном с рекомбинацией и получившем название *генной конверсии*. Генная конверсия наблюдается у многих организмов, для которых удается обнаружить все или по крайней мере половину продуктов мейотического деления. В частности, ее можно наблюдать у *Drosophila* благодаря использованию сцепленных X-хромосом, позволяющему обнаружить половину образующихся тетрад.

Явление генной конверсии подробно изучалось на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, аски которых содержат лишь четыре споры, которые в отличие от спор *Sordaria* или *Neurospora* расположены неупорядоченно. Нормальные аски, образующиеся из диплоидных дрожжевых гетерозигот, содержат аллели в соотношении 2:2, а aberrантные аски — в соотношении 3:1 или 1:3. Фогель, Мортимер и их коллеги провели детальное исследование конверсии гетероаллелей цистрона *arg4* *S. cerevisiae*, кодирующего фермент аргининсукциназу (рис. 14.8). Благодаря этому исследованию можно сделать три важных заключения относительно природы процесса генной конверсии. Во-первых, примерно половина всех конверсионных явлений связана с рекомбинацией фланкирующих маркеров. Это доказывает, что конверсия не является результатом случайных мутаций, поскольку нет никаких оснований предполагать наличие взаимосвязи для процессов мутации и рекомбинации. Во-вторых, конверсия характеризуется определенной специфичностью. Гетероаллель дикого типа *arg4-4* при конверсии превращается в мутантный аллель *arg4-4*, а дикый гетероаллель *arg4-17* — в мутантный *arg4-17*. Ясно, что случайные мутации не могут проявлять такой специфичности. В-третьих, *соконверсия* (одновременная конверсия двух гетероаллелей) происходит гораздо чаще, чем это можно было бы ожидать для двух совершенно независимых событий. Это свидетель-

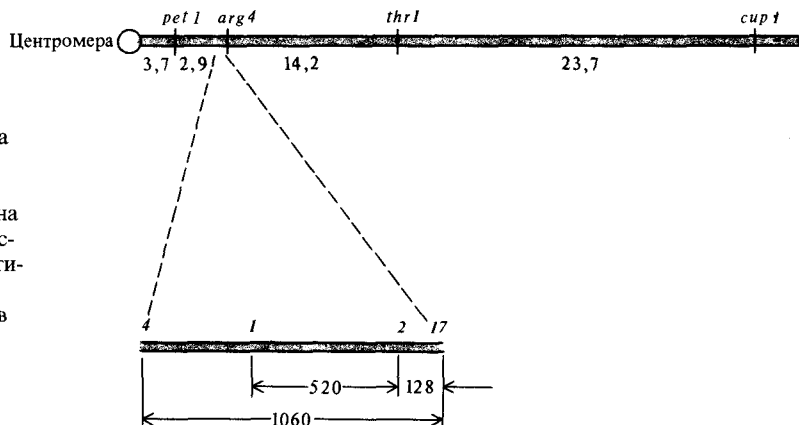


Рис. 14.8. Хромосома VIII *Saccharomyces cerevisiae*; показана тонкая структура гена *arg4*. Межгенные расстояния даны в сантиморганах, внутригенные расстояния — в нуклеотидных парах. (По Fogel S., Mortimer R., 1969. Genetics, 62, 96.)

ствуется о том, что конверсионные процессы затрагивают скорее целые участки хромосомы, нежели единичные сайты. Более того, частота соконверсии для тесно сцепленных гетероаллелей (2 и 17) оказывается выше, чем для более отдаленных (4 и 17) (см. рис. 14.8). И это тоже доказывает, что конверсия затрагивает не единичные сайты, а достаточно протяженные области, поскольку именно в этом случае два сайта скорее могут быть одновременно вовлечены в конверсию, если они находятся рядом, а не на большом расстоянии друг от друга. В *Дополнении 14.1* приведены некоторые данные, подтверждающие правильность сформулированных выводов.

Обнаружение генной конверсии, в частности при образовании асков с соотношением сегрегантов 5:3, а также aberrантных асков с соотношением 4:4 (рис. 14.7, Б), указывает на то, что мейотическому делению предшествует возникновение гетеродуплексных ДНК. Это описывается в рамках модели Холлидея, основанной на предположении об образовании симметричных гетеродуплексных участков ДНК в ходе формирования структуры креста (рис. 14.1). Если гетеродуплексные участки ДНК перекрываются с участками, обеспечивающими гетерозиготность по данным генетическим маркерам, то в структуре гетеродуплекса будут присутствовать ошибочные, некомплементарные пары оснований. Подобная ситуация схематически отражена на рис. 14.9. При мейозе и последующем митотическом делении образуются aberrантные аски с соотношением 4:4 (тетрада I на рис. 14.9). Возникновение асков с соотношением 5:3 и 6:2 в рамках модели Холлидея объясняется действием системы репарации, которая удаляет неподходящие нуклеотиды в одной из двух цепей и использует вторую цепь в качестве матрицы для репарационного синтеза ДНК. Если исправление некомплементарной пары не характеризуется специфичностью к определенной цепи, то репарация будет с равной вероятностью происходить одним из двух возможных способов. Кроме того, симметричные неправильные пары оснований на каждой хроматиде могут быть репарированы по-разному, а в отдельных случаях могут избежать репарации. Некоторые возможные варианты репарации и их генетические «последствия», предсказываемые моделью Холлидея, представлены на диаграммах II–IV рис. 14.9. В зависимости от того, какие из нуклеотидов подвергаются репарации, наблюдаются конверсия по одному из сайтов, соконверсия или отсутствие конверсии. Некоторые из вариантов при этом имитируют двойной или тройной кроссинговер. Возникновение двойных или тройных перекрестов хроматид приводит к высоким наблюдаемым значениям коэффициента совпадения c и проявляется в высокой отрицательной интерференции, когда эти хроматиды входят в популяцию неупорядоченно распределенных спор или гамет. Это означает, что если бы для изучения генетической рекомбинации маркеров, отмеченных на рис. 14.9, использовались случайно выбранные споры, а не целые аски, то реальная частота генной конверсии могла бы оказаться заниженной. При этом были бы зарегистрированы преимущественно кажущиеся множественные «перекресты», которые можно было бы интерпретировать действительно как свидетельство в пользу представления о множественном кроссинговере. Истинная же природа этих явлений могла бы так и остаться непонятной.

Далее, обратите внимание на то, что возможны два варианта расщепления крестообразной структуры Холлидея (рис. 14.1, И). Расщепление

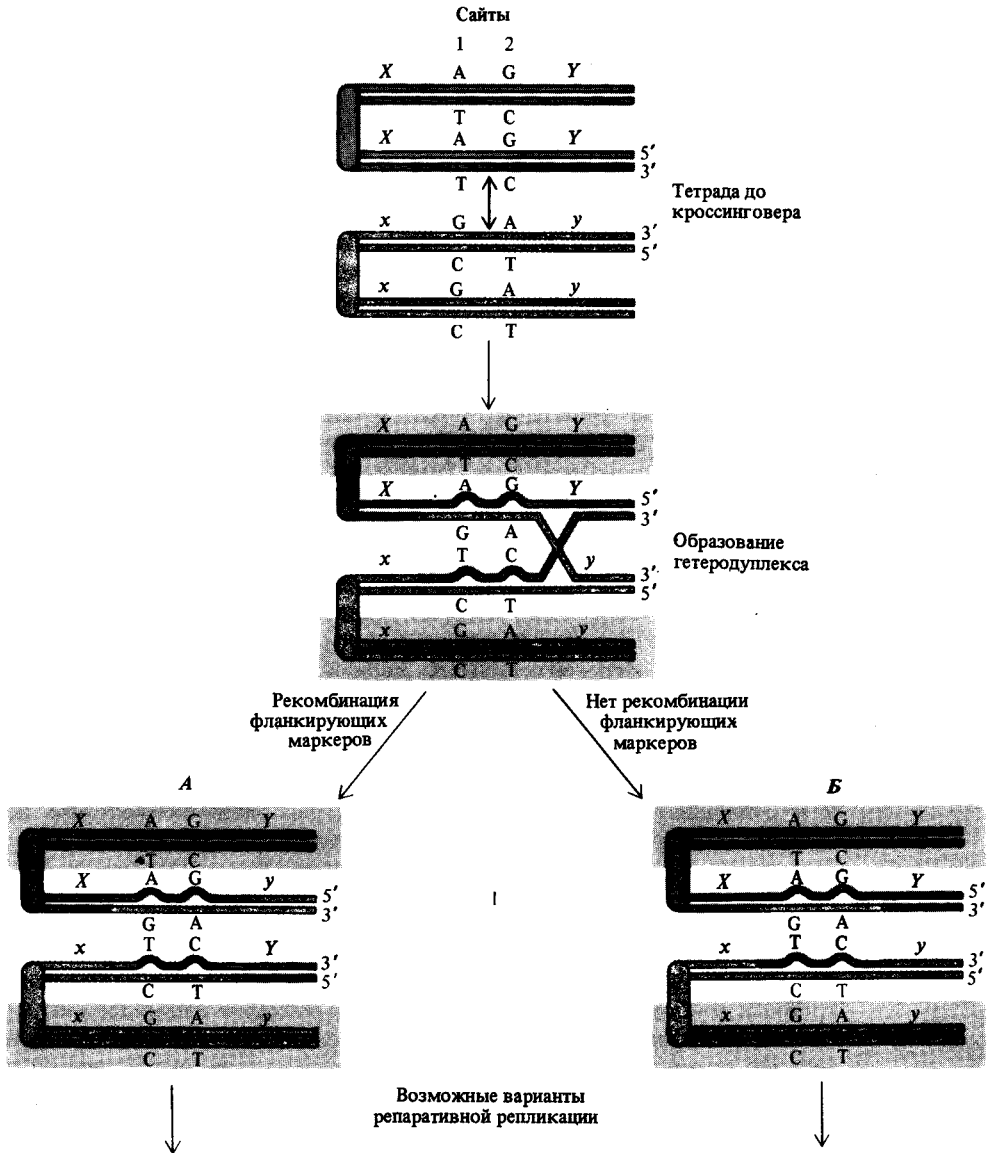
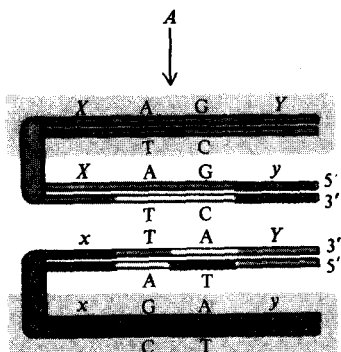
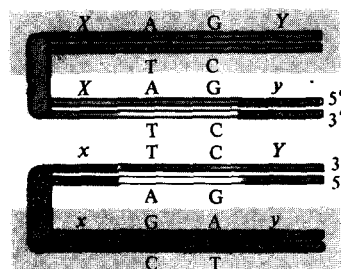


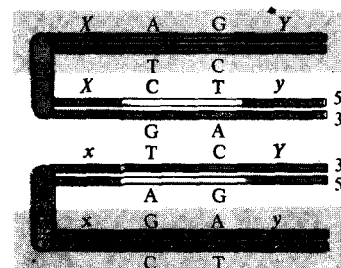
Рис. 14.9. В соответствии с моделью Холлидея образование симметричных участков гетеродуплексной ДНК внутри области генетической гетерозиготности предшествует генной конверсии. Формирование гетеродуплексных ДНК может сопровождаться (А) или не сопровождаться (Б) рекомбинацией фланкирующих маркеров. Постмейотическое расщепление без репарации неправильных нуклеотидных пар приводит к возникновению aberrantных асков с распределением 4:4. (I) Изображены также тетрады, возникающие при реализации некоторых вариантов репарации (II–IV).



Конверсия в сайте 1 (3AT:1CG) с образованием одной хроматиды с кажущимся тройным перекрестом и сохранением одной хроматиды с единичным перекрестом

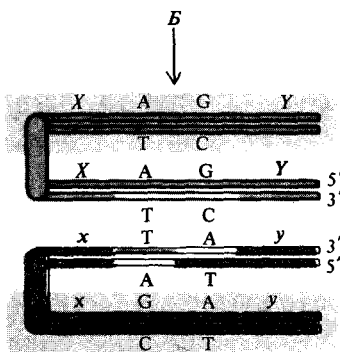


Двойная конверсия в сайтах 1 (3AT:1CG) и 2 (3GC:1TA) с сохранением двух хроматид с единичными перекрестами



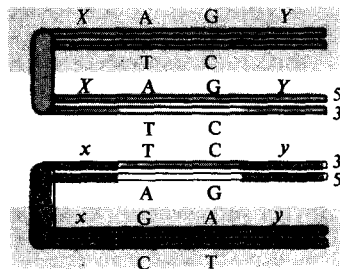
Отсутствие конверсии в каком-либо сайте (2:2) с сохранением двух хроматид с единичными перекрестами

II



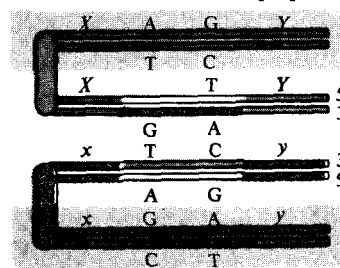
Конверсия в сайте 1 (3AT:1CG) с образованием хроматиды с кажущимся двойным перекрестом

III



Двойная конверсия в сайтах 1 (3AT:1CG) и 2 (3GC:1TA) с образованием хроматиды с кажущимся двойным перекрестом

IV



Отсутствие конверсии в каком-либо сайте (2:2) с образованием двух хроматид с кажущимся двойным перекрестом

по «горизонтальной оси» приводит к образованию продуктов, нерекombинантных по фланкирующим маркерам, но содержащих гетеродуплексные участки ДНК. При расщеплении «по вертикали» образуются рекомбинанты по фланкирующим маркерам, также содержащие гетеродуплексные участки. Если оба варианта расщепления структуры Холлидея равновероятны, то генетический обмен в половине случаев будет сопровождаться рекомбинацией фланкирующих генетических маркеров.

В первом приближении это предположение нашло подтверждение в рассмотренных опытах по изучению генной конверсии. Напомним, что половина всех наблюдаемых генно-конверсионных событий в локусе *arg4* сопровождалась рекомбинацией фланкирующих маркеров. Это можно рассматривать, как генетическое подтверждение процесса изомеризации структур Холлидея (рис. 14.1, Ж, З) и дополнительное указание на то, что структуры этого типа выступают в качестве интермедиатов при генетической рекомбинации у эукариот. В действительности «горизонтальное» расщепление структуры Холлидея, не сопровождающееся рекомбинацией фланкирующих маркеров, но приводящее к закреплению гетеродуплексных участков в дочерних молекулах ДНК, проявляется подобно двойному кроссинговеру и характеризуется высокой отрицательной интерференцией даже в отсутствие репарации неправильных пар нуклеотидов (см. первую диаграмму на рис. 14.9, Б).

Дополнение 14.1. Гетероаллельная конверсия в локусе *arg4* дрожжей

Данные, приведенные в таблице 14.1, отражают процессы гетероаллельной конверсии, наблюдаемые в асках, образуемых четырьмя различными диплоидными генотипами *Saccharomyces cerevisiae*, каждый

из которых гетерозиготен по каким-либо двум из четырех гетероаллелей, отмеченных на генетической карте (рис. 14.8). Кроме того, каждый из диплоидов гетерозиготен по фланкирующим маркерам,

Таблица 14.1. Связь генной конверсии в локусе *arg4* с рекомбинацией фланкирующих маркеров

Диплоид	Генотип <i>arg4</i>	Число асков	Конвертируемые аллели	Число конверсий 3:1 плюс 1:3	Фланкирующие маркеры	Число конверсий, сопровождающихся рекомбинацией фланкирующих маркеров
BZ34	$\frac{4+}{+17}$	690	4	8	<i>pet1-17</i>	7
			17	42	<i>4-thr1</i>	19
			4-17	5	<i>pet1-thr1</i>	3
BZI40	$\frac{2+}{+17}$	544	2	1	<i>pet1-17</i>	1
			17	7	<i>2-thr1</i>	3
			2-17	28	<i>pet1-thr1</i>	14
X841	$\frac{1+}{+2}$	367	1	3	<i>pet1-2</i>	1
			2	14	<i>1-thr1</i>	8
			1-2	19	<i>pet1-thr1</i>	8
X901	$\frac{1+}{+2}$	116	1	2	<i>c-2</i>	2
			2	6	<i>1-thr1</i>	3
			1-2	5	<i>c-thr1</i>	4
Всего		1717		140		73

в частности *pet1* и *thr1*, за рекомбинацией которых при мейозе можно вести наблюдение.

Например, диплоид BZ34 характеризуется наличием маркеров *arg 4-4* и *thr1* на одной и *pet1* и *arg 4-17* на другой гомологичной хромосоме:

$$\frac{+ \textit{arg4-4} + \textit{thr1}}{\textit{pet1} + \textit{arg4-17} +}$$

Для 690 асков, образуемых этим диплоидом, наблюдалось восемь случаев конверсии *arg 4-4*, семь из которых сопровождалась рекомбинацией маркеров *pet1* и *arg 4-17*, фланкирующих *arg 4-4*. В приведенных данных не делается различий между конверсией от *arg 4-4* к дикому типу и конверсией от дикого типа к *arg 4-4*, обнаруживаемых в асках с распределением аллелей 1:3 и 3:1. Кроме того, были зарегистрированы 42 случая конверсии *arg 4-17*, из которых 19 сопровождалась рекомбинацией фланкирующих маркеров *arg 4-4* и *thr1*. И наконец, в 5 случаях наблюдалась двойная конверсия *arg 4-4* и *arg 4-17*, при этом в 3 случаях имела место рекомбинация фланкирующих маркеров *pet1* и *thr1*. В таблице 14.1 аналогичным* образом представлены также результаты, полученные при изучении конверсии для трех других диплоидов.

На основании данных, приведенных в таблице 14.1, можно сделать три важных заключения. Во-первых, около половины (73/140) всех конверсионных событий связаны с рекомбинацией фланкирующих маркеров. Во-вторых, конверсия представляет собой замену одного исходного аллеля на другой, участвующий в скрещивании. Так, аллель *arg 4-4* дикого типа переходит при конверсии в мутантный аллель *arg 4-4*, а мутантный *arg 4-4* – в соответствующий аллель дикого типа. То есть конверсия не является случайным событием в том смысле, что не приводит к конверсии одного гетероаллеля в другой произвольный аллель. И в-третьих, соконверсия двух гетероаллелей при скрещивании происходит чаще, чем этого можно было бы ожидать от двух независимых событий. Так, частота конверсии для *arg 4-4* составляет 0,012 (8/690), а для *arg 4-17* – 0,061 (42/690). Если бы два этих события были совершенно независимы, то частота совместной конверсии составляла бы 0,00073 (0,012 × 0,061). В то же время наблюдаемая частота совместной конверсии этих маркеров в действительности достигает 0,0072 (5/690). Этот и аналогичные ему расчеты, сделанные на основании данных таблицы 14.1 для других пар гетероаллелей *arg4*, приведены в таблице 14.2.

Таблица 14.2. Ожидаемая и наблюдаемая частоты совместной конверсии в дрожжевом гене *arg 4*

Пары гетероаллелей	Частота единичной конверсии	Частота совместной конверсии	
		Ожидаемая	Наблюдаемая
4 и 17	(4) 0,0012	0,00073	0,0072
	(17) 0,061		
1 и 2	(1) 0,010	0,00041	0,050
	(2) 0,041		
2 и 17	(2) 0,002	0,00003	0,051
	(17) 0,013		

Образование структур Холлидея у эукариот

Согласно модели Холлидея, образование одноцепочечных разрывов и реципрокный обмен цепями (рис. 14.1, Б–Д) приводят к формированию симметричных гетеродуплексных участков ДНК у обоих партнеров, участвующих в обмене. В то же время анализ aberrantных асков, возникающих у некоторых видов грибов, указывает на то, что довольно часто гетеродуплексные участки ДНК при скрещивании образуются только у одного из партнеров.

В качестве примера рассмотрим трехфакторное скрещивание между двумя штаммами *Ascobolus*, при котором наблюдали за конверсией маркера *m* в асках, нерекомбинантных по фланкирующим маркерам *a* и *b*. Модель Холлидея предсказывает образование с одинаковой частотой двух типов aberrantных асков 5:3 (рис. 14.10), возникающих за счет случайного выбора одной из двух цепей ДНК партнеров в качестве

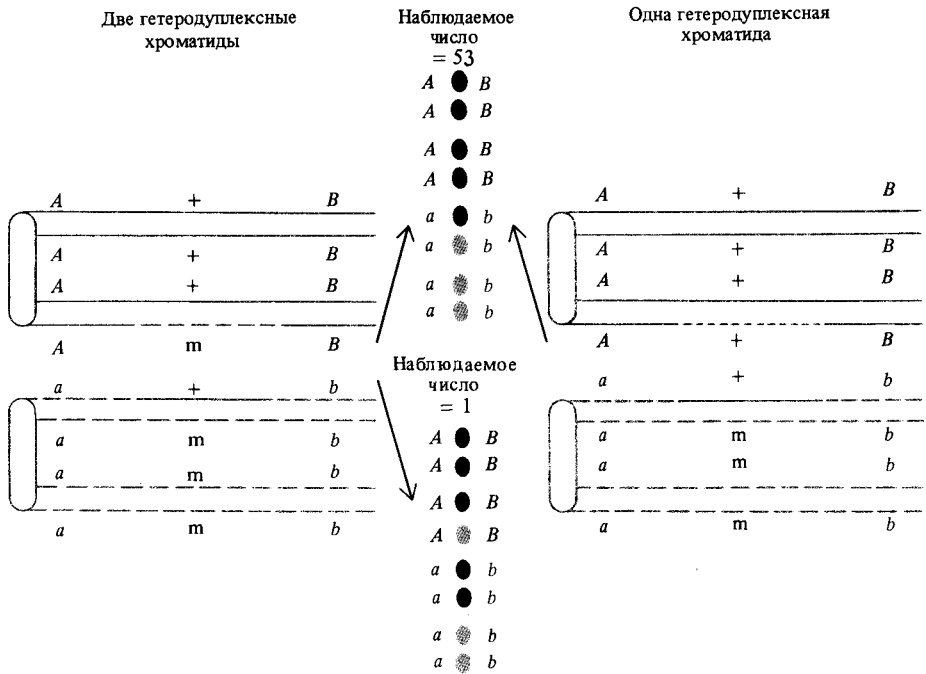
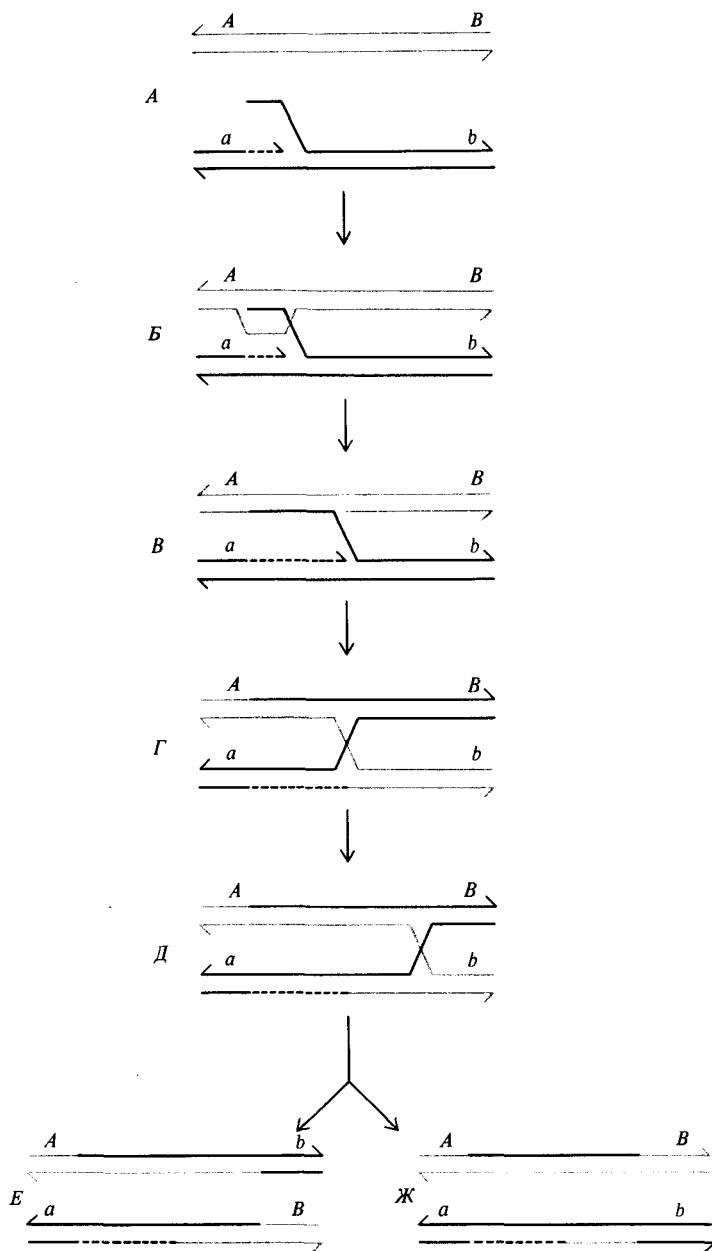


Рис. 14.10. Аберрантные аски типа 5 + :3m и 3 + :5m, образующиеся при скрещивании между штаммами *Ascobolus*, несущими различные аллели окраски спор (+/m) и фланкирующих маркеров *A/a* и *B/b*. Показаны только аски, нерекомбинантные по фланкирующим маркерам. Для упрощения вместе сгруппированы аски типов 3 + :5m и 5 + :3m, что позволяет подчеркнуть принципиальные различия между двумя возможными

вариантами образования гетеродуплексных ДНК в ходе обмена (симметричный – слева и асимметричный – справа). Полагают, что распределение неправильных нуклеотидных пар, вовлеченных или невовлеченных в процесс репарации, для хроматид и аллелей является случайным. (По Stadler D. R., Towe A. M., 1971. *Genetics*, 68, 401–413.)

Рис. 14.11. Модель Мезелсона – Рэдинга. Рекомбинация начинается с образования одноцепочечного разрыва в ДНК одной хроматиды, за которым следуют репарационный синтез и вытеснение соответствующей цепи (А). Вытесняемая цепь внедряется в структуру двойной спирали партнера, образуя петлю (Б). Вытесняемая при этом цепь ДНК партнера подвергается деградации. Вслед за этим конец внедрившейся цепи соединяется ковалентно с концом, образовавшимся при деградации петли. В ДНК первого партнера продолжается репарационный синтез, приводящий к образованию асимметричного гетеродуплекса (В). Изомеризация приводит к образованию структуры Холлидея (Г), а перемещение области перекреста порождает симметричные участки гетеродуплексной ДНК в обоих партнерах (Д). Разрешение структуры Холлидея при расщеплении в области перекреста может завершаться рекомбинацией фланкирующих маркеров (Е) или сохранением типа сцепления, характерного для родительских молекул ДНК. (По Meselson M. S., Radding C. M., 1975. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 358–361.)



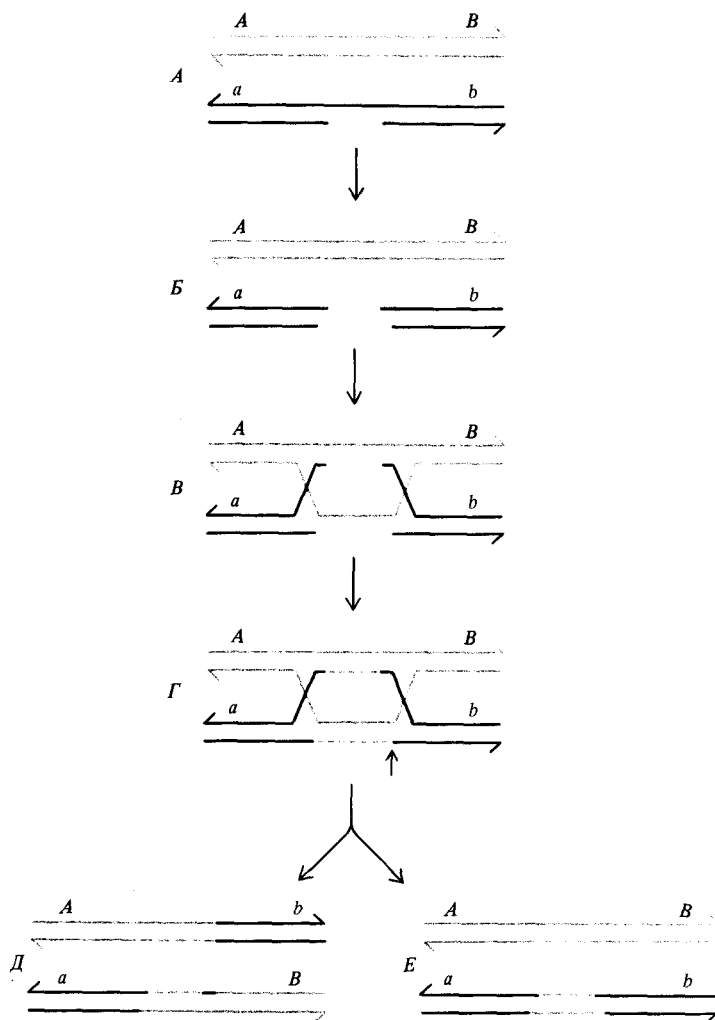
мишени для репарации, а также за счет того, что некоторые неправильные пары нуклеотидов остаются нерепарированными. Только при выполнении последнего условия возможно возникновение асков с распределением 5:3. Экспериментальные данные, отраженные на рис. 14.10, указывают на значительную неравномерность в возникновении двух типов асков 5:3. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что во многих случаях рекомбинация не начинается с реципрокного обмена цепями.

Для интерпретации асимметричности в обмене цепями были предложены две различные модели. Каждая из них связана с образованием структуры Холлидея. Различия между ними обусловлены главным образом различиями в предполагаемых способах образования этих структур. Модель Мезелсона–Рэддинга (рис. 14.11) основана на предположении об образовании одноцепочечного разрыва в ДНК одного из партнеров. В месте разрыва иницируется репарационный синтез ДНК, при этом происходит вытеснение одной цепи, которая в итоге вступает во взаимодействие с комплементарной ей цепью ДНК другого партнера. Сопряженное протекание репарационного синтеза одной цепи в двойной спирали ДНК «донора» и деградация соответствующей цепи в ДНК «реципиента» приводят к возникновению структуры Холлидея, содержащей гетеродуплексный участок только в реципиентной ДНК. Модель Мезелсона–Рэддинга в сочетании с представлением о статистической репарации неправильных нуклеотидных пар может объяснить большинство результатов, полученных при изучении генной конверсии и анализе aberrантного расщепления у грибов.

Модель двухцепочечного разрыва–репарации (рис. 14.12) предполагает образование разрыва в обеих цепях с выступающими одноцепочечными концами в молекуле ДНК одного из партнеров. Оба выступающих конца внедряются в двойную спираль ДНК другого партнера. Репарационный синтез в обоих партнерах приводит к образованию асимметрических гетеродуплексных участков в реципиентной спирали. Разрыв в структуре донора закрывается, при этом содержащаяся на его месте информация полностью замещается на ту, что содержится в соответствующей области ДНК реципиента. Образуются сразу две структуры Холлидея, разрешение которых может привести (как и в случае единичной структуры Холлидея) к возникновению конструкций, как рекомбинантных, так и нерекомбинантных по фланкирующим маркерам. Настоящая модель способна объяснить не только ряд уникальных наблюдений, сделанных при изучении рекомбинации у дрожжей, но также и те явления, которые с равным успехом интерпретируются в рамках модели Мезелсона–Рэддинга.

Развитие методов генной инженерии привело к разработке системы трансформации для дрожжей, что способствовало более глубокому изучению у них механизма рекомбинации. Гибридные плазмиды, содержащие участки дрожжевой ДНК с известными маркерами, клонированные на векторе *E. coli*, могут быть введены в клетки дрожжей. При этом может происходить встраивание плазмидной ДНК в хозяйскую хромосому за счет рекомбинации между гомологичными последовательностями хромосомы и участка дрожжевой ДНК, входящего в состав плазмиды. При использовании плазмидной ДНК в замкнутой кольцевой форме удается с заметной частотой отобрать трансформированные дрожжевые клетки. В то же время введение двухцепочечного разрыва в дрожжевую

Рис. 14.12. Модель «двухцепочный разрыв – репарация». Возникновение одноцепочечного разрыва в ДНК одной хроматиды инициирует деградацию этой цепи с образованием бреши (А). Дальнейшее действие нуклеаз приводит к образованию разрыва, а затем и бреши во второй цепи (Б). Рекомбинация начинается с внедрения одноцепочечных концов в двойную спираль ДНК партнера (В). В ходе репарационного синтеза закрываются бреши и образуются два перекреста (Г). Правый перекрест разрешается за счет разрыва во внешней цепи (показано стрелкой). Оставшаяся структура Холлидея (слева) может быть разрешена при расщеплении в области перекреста, приводящем к рекомбинации фланкирующих маркеров (Д) или к восстановлению типов сцепления, характерных для исходных молекул ДНК (Е). В обоих случаях с каждой стороны от репарированной бреши возникают асимметричные участки гетеродуплексной ДНК. (По Szostak J. W. et al., 1983. Cell, 33, 25–35.)



часть гибридной плазмиды с помощью рестрицирующей эндонуклеазы сопровождается 3000-кратным повышением частоты трансформации. Более того, если в дрожевой участок плазмиды вводится делеция с помощью удаления внутреннего рестриционного фрагмента, то частота трансформации не снижается. Отобранные трансформанты содержат интегрированную плазмиду с внутренним фрагментом, последовательность которого оказывается полностью восстановленной на основе информации, заключенной в соответствующей области клеточной ДНК. Восстановление утраченного фрагмента происходит при участии гена

rad52, необходимого также для нормального протекания мейоза и репарации двухцепочечных разрывов, вызванных облучением. Таким образом, представляется весьма вероятным, что рекомбинация при мейозе действительно может начинаться с возникновения двухцепочечного разрыва.

Наконец, при изучении с помощью электронной микроскопии дрожжевой ДНК, выделенной из клеток на стадии мейотического деления, было обнаружено, что сочлененные молекулы ДНК соединены между собой не в одной точке, как это было показано на рис. 14.5 для плазмид *E. coli*, а в двух, расположенных на расстоянии 100–1000 п.н. друг от друга. Если такие структуры действительно представляют собой интермедиаты, возникающие в ходе рекомбинации, то это скорее подтверждает модель «двухцепочечный разрыв – репарация», чем модель Мезелсона – Рэддинга.

Сайт-специфическая и незаконная рекомбинация

Для рекомбинации между молекулами ДНК, которые характеризуются низким уровнем или даже полным отсутствием гомологии, используются механизмы, совершенно отличные от механизмов общей рекомбинации. С сайт-специфической рекомбинацией мы уже встречались на примере интеграции профагов (гл. 7), а с незаконной рекомбинацией – при знакомстве с подвижными генетическими элементами (гл. 8). У *E. coli* протекание как сайт-специфической, так и незаконной рекомбинации не зависит от генов *recA*, *recB* или *recC*. Различия между этими двумя типами рекомбинации выражены не очень четко и связаны со степенью сходства нуклеотидных последовательностей, участвующих в рекомбинации. В случае умеренных бактериофагов типа λ участки *attP* и *attB* характеризуются очень высокой специфичностью в отношении связывания специализированных белков, направляющих рекомбинацию, которые кодируются фаговыми генами *int* и *xis*. Поэтому интеграция профага практически всегда происходит в участке *attB*, локализованном в хромосоме *E. coli* между генами *gal* и *bio*. Однако при делеции сайта *attB* интеграция профага все же происходит с заметной, хотя и значительно более низкой частотой, в целый ряд других участков на хромосоме *E. coli*. Подвижные генетические элементы характеризуются существенными различиями в уровне специфичности при выборе мишени для транспозиции.

Поскольку для этих типов рекомбинации степень сайт-специфичности варьирует в широких пределах, для классификации процессов рекомбинации, отличных от общей рекомбинации, можно опираться на более характерные признаки. Отличают рекомбинационные процессы, связанные или не связанные с репликацией ДНК. Так, интеграция профага – это консервативный процесс, в котором формирование рекомбинантных структур происходит при участии только заранее образовавшихся молекул ДНК. С другой стороны, считается, что для осуществления большинства транспозиционных событий требуется репликация ДНК.

Интеграция и эксцизия профага λ

Процессы интеграции и эксцизии профага λ являются собой наиболее изученные примеры сайт-специфической рекомбинации. Интеграция направляется белком интегразой, продуктом фагового гена *int*, при участии клеточного белка, роль которого в этом процессе до конца не изучена (см. рис. 7.8). При рекомбинации между фаговым *attP*-сайтом POP' и хозяйским хромосомным *attB*-сайтом BOB' образуются два рекомбинантных сайта VOB' и POV' слева и справа от встроенной ДНК профага. Индуцируемая эксцизия (вырезание) профага осуществляется посредством рекомбинации между сайтами POV' и VOB' с восстановлением исходных сайтов POP' и BOB' . Процесс эксцизии не является простым обращением интегративной рекомбинации. Он затрагивает иные ДНК-субстраты и протекает при участии как интегразы, так и другого фагового белка (эксцизионазы), продукта гена *xis*.

В фаговом геноме сайт POP' и гены *int* и *xis* примыкают друг к другу, образуя своего рода обособленную функциональную единицу, ответственную за сайт-специфическую рекомбинацию. Транскрипция генов *int* и *xis* находится под контролем двух различных промоторов. Один из них расположен вне вышеупомянутой структурно-функциональной единицы, что обеспечивает согласование инициации рекомбинационных процессов с определенными этапами в жизненном цикле фага. На начальной стадии инфекции фагом λ транскрипция гена *int* активируется регуляторным белком *cII*. При его участии РНК-полимераза может считывать *int* с промотора p_I , локализованного внутри гена *xis*. Благодаря этому экспрессируется только ген *int* и образуется интеграза, обеспечивающая встраивание инфицирующего фага в сайт BOB' на хромосоме клетки-хозяина (рис. 14.13). С другой стороны, когда в лизогенной

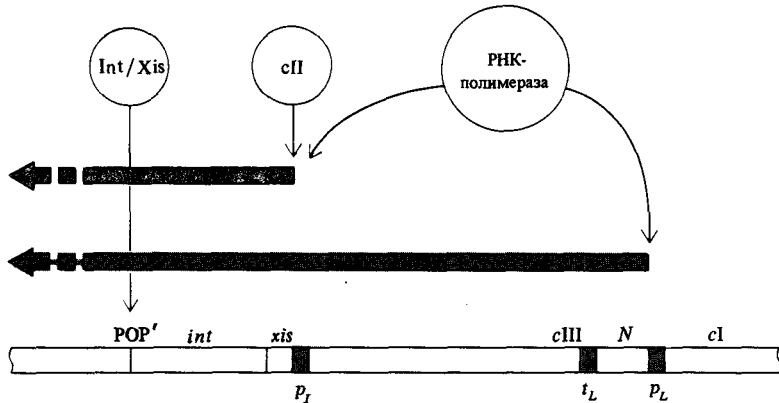


Рис. 14.13. Транскрипция области *int-xis* генома фага λ контролируется двумя различными промоторами. При лизогенизации образуется только интеграза, необходимая для встраивания фаговой ДНК в хромосому *E. coli*. При этом белок *cII* активирует транскрипцию гена *int* с

промотора p_I , расположенного внутри гена *xis*. В ходе индукции профага транскрипция обоих генов *int* и *xis* иницируется с промотора p_L . Синтезируются одновременно и интеграза, и эксцизионаза, необходимые для вырезания фага из хромосомы.

клетке происходит индукция профага, транскрипция генов *int* и *xis* происходит с общего промотора p_L . Нарбатываются белки, продукты генов *int* и *xis*, которые направляют рекомбинационную эксцизию профага из хозяйской хромосомы. (Вся совокупность этих и других явлений, составляющих основу жизненного цикла фага λ , будет специально разобрана в гл. 15.)

Пониманию деталей молекулярного механизма *int*-зависимой рекомбинации способствовало изучение этого процесса *in vitro*, а также установление первичной структуры участков POP' и VOB' и рекомбинантных участков ROP' и ROV' . Все эти участки характеризуются наличием общего центрального фрагмента (кора, от англ. core – сердцевина) протяженностью 15 п.н., на котором и разыгрываются основные рекомбинационные события (рис. 14.14).

Каждое из плеч (P, P', B и B') характеризуется особой, отличной от других плеч нуклеотидной последовательностью. Функциональное значение этих участков последовательности исследовали в рекомбинационной системе *in vitro*, содержащей очищенную интегразу и необходимые клеточные белки. В этой системе можно наблюдать рекомбинацию участков POP' и VOB' , встроенных в сверхскрученную ДНК плазмиды rBR322, с помощью методов, обсуждавшихся в гл. 9. С использованием клонированных фрагментов, содержащих делеции разной величины в том или ином из плеч P, P', B и B', удается определить необходимый для рекомбинации минимальный размер функциональных участков, окружающих общую кор-последовательность. Было установлено, что функциональный участок POP' содержит по 240 п.н. с каждой стороны от кора. В то же время функционально необходимый участок VOB' по размеру не намного превышает саму 15-нуклеотидную кор-последовательность. Участки нуклеотидной последовательности, с которыми специфически связывается интеграса фага λ , были идентифицированы с помощью так называемого «футпринтинга» (от англ. *footprint* – след ноги; см. Дополнение 14.2). В связывании участвуют центральная область POP' протяженностью 34 п.н., включающая кор, а также два участка последовательности в плече P и один, более протяженный, в плече P'. С другой стороны, единственный участок узнавания на хромосоме представляет собой последовательность из 20 п.н., включающую область кора VOB' . Вследствие различий в структуре плечевых участков фагового и хозяйского *att*-сайтов рекомбинантные сайты ROV' и ROP' в функциональном отношении отличаются от POP' и VOB' . Это отличие несомненно и проявляется в том, что интеграса, направляющая процесс встраивания профага, сама по себе оказывается неспособной катализировать обратную реакцию, для осуществления которой необходимо участие дополнительного белка – продукта гена *xis*.

Механизмы встраивания и вырезания профага пока в точности не известны. Установлено, что очищенная интеграса обладает топоизомеразной активностью. Она делает одноцепочечный разрыв в суперскрученной ДНК, благодаря чему осуществляются свободное вращение и удаление супервитков. Вслед за этим интеграса направляет замыкание фосфодиэфирной связи без использования каких-либо дополнительных источников энергии. Считают, что энергия первоначально расщепленной связи сохраняется благодаря ковалентному связыванию высвободившейся 5'-фосфатной группы с самой интегразой. Известно, что при рекомбинации между POP' и VOB' образуется очень короткий участок ге-

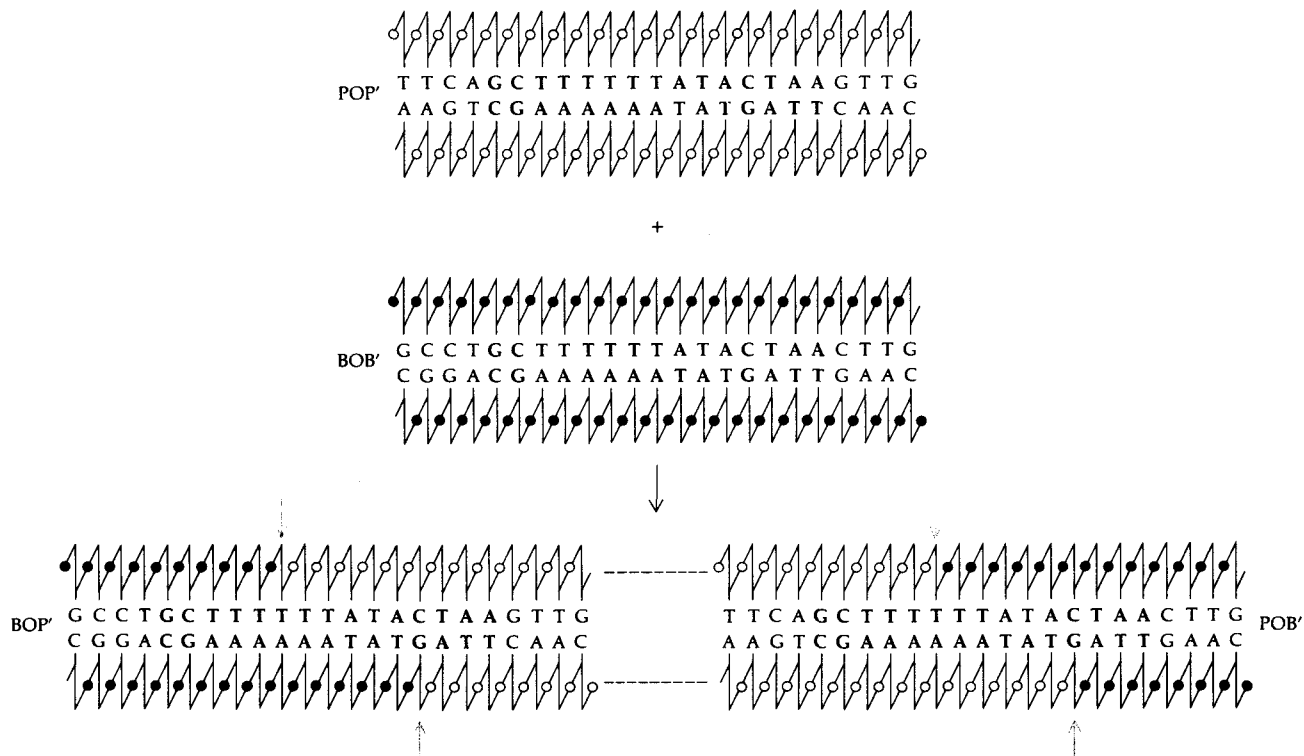


Рис. 14.14. Нуклеотидные последовательности внутри и вокруг общего 15-нуклеотидного кора (выделены жирным шрифтом) участков POP' и BOB', а также рекомбинантных участков BOB' и POB'. Отмечены гетеродуплексные области ДНК на участках BOB' и POB', образующиеся в результате *int*-зависимой рекомбинации. (По Mizuuchi K. et al., 1981. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45, 429–437.)

теродуплексной ДНК, а два одноцепочечных разрыва возникают в разных точках внутри общей кор-последовательности. Как показано на рис. 14.14, расстояние между точками разрыва составляет 7 п.н. На основании данных электронной микроскопии можно предположить, что мономерные молекулы интегразы при взаимодействии с ДНК олигомеризуются, что способствует образованию контактов между участками *ROP'* и *VOV'*. Разрезание и воссоединение цепей, приводящее к рекомбинации, может протекать с образованием промежуточной формы, подобной структуре Холлидея с очень коротким гетеродуплексным участком. При *int*-зависимой рекомбинации в редких случаях удается наблюдать образование гетеродуплексных участков, заметно выходящих за пределы области *ROP'*. Таким образом, возникновение промежуточной крестообразной структуры характерно как для сайт-специфической, так и для общей рекомбинации.

Как уже упоминалось, для осуществления сайт-специфической рекомбинации фага λ необходимо присутствие некоторых хозяйских белков. Штаммы *E. coli*, мутантные по одному из генов *himA*, *himB* или *hip*, неспособны обеспечивать интеграцию профага λ . Мутации в этих генах носят плеiotропный характер и блокируют также интеграцию других типов профагов на других соответствующих участках ДНК. Более того, эти мутации препятствуют развитию в клетках транспозоноподобного фага μ , а также точному вырезанию транспозонов, определяющих устойчивость к антибиотикам (см. следующий раздел). Плеiotропность этих мутаций, сказывающихся как на сайт-специфической, так и на неспецифической рекомбинации, свидетельствует о том, что соответствующие клеточные белки играют скорее некоторую неспецифическую роль, например способствуют реализации взаимодействий ДНК-ДНК или ДНК-белок.

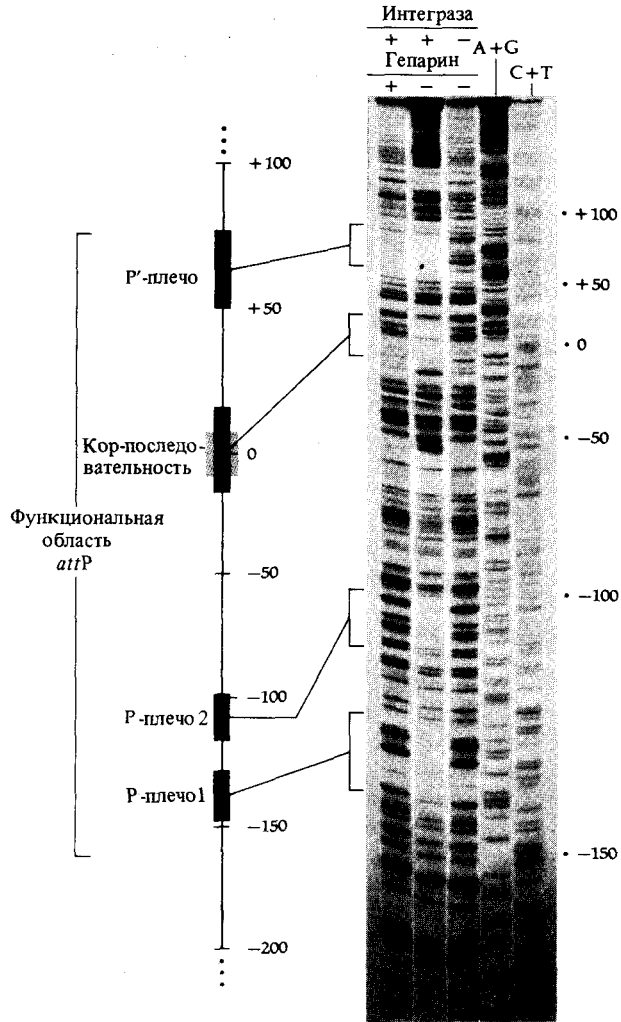
Дополнение 14.2. Футпринтинг – метод изучения ДНК-белковых взаимодействий

Взаимодействие белков с определенными нуклеотидными последовательностями ДНК играет важнейшую роль в функционировании генетического материала. Для изучения взаимодействий между белками и участками нуклеотидной последовательности удается использовать те же экспериментальные подходы, что и для определения нуклеотидной последовательности.

В гл. 9 мы рассмотрели, как при электрофоретическом анализе одной из цепей рестрикционного фрагмента ДНК, содержащей радиоактивную метку на одном конце и случайно расщепленной тем

или иным способом, удается выявить полный набор фрагментов, отличающихся последовательным изменением длины с шагом в один нуклеотид. В примере, приведенном на рис. 9.8, случайное расщепление в каждом случае происходит по одному из четырех нуклеотидов. Все возможные фрагменты таким образом распределяются по четырем дорожкам, в каждой из которых разделяются фрагменты, заканчивающиеся на А, Т, G или С. При этом нуклеотидную последовательность искомого фрагмента ДНК можно считать непосредственно по радиоавтографу, полученному с геля после электрофореза.

Рис. 14.15. Локализация сайтов связывания интегразы фага λ с участком POP' с помощью метода «футпринтинга». Аликвоты, содержащие рестрикционный фрагмент, 5'-конец одной из цепей которого помечен ^{32}P , подвергали частичному расщеплению неокарциностагином (расщепляет по А и Т) в присутствии и в отсутствие интегразы или гепарина. Набор образующихся фрагментов анализировали с помощью гель-электрофореза (три левые дорожки). В двух правых дорожках — фрагменты, образующиеся при расщеплении того же меченого фрагмента по пуриновым или по пиримидиновым нуклеотидам методом Максама — Гилберта, для идентификации участков последовательности, защищаемых интегразой. (По Hsu P. L., Ross W., Landy A., 1980. Nature, 285, 85–91.) Reprinted by permission. Copyright © 1980—Macmillan Journals Limited.



В том случае, когда нуклеотидная последовательность уже известна, можно установить, какие участки последовательности связываются с определенным белком. Для этого достаточно определить участки, защищаемые этим белком от расщепления. Защищенные участки идентифицируются на основании данных электрофореза, по исчезновению полос, соответствующих продуктам статистического расщепления, концевые нуклеотиды которых попадают в область связывания с белком. Именно этот подход был использован для локализации сайтов связывания

интегразы с участком POP' ДНК фага λ .

Рестрикционный фрагмент, содержащий участок POP' и меченый ^{32}P по одному из 5'-концов, случайно расщепляли ДНКазой I (или любым другим способом, приводящим к образованию одноцепочечных разрывов) в присутствии и в отсутствие интегразы. После этого оба образца нагревали для расхождения цепей, только одна из которых содержала метку, и анализировали с помощью электрофореза. Результаты такого эксперимента представлены на рис. 14.15. При электрофорезе

образца, расщепленного в отсутствие интегразы, наблюдается полный набор фрагментов расщепления. В случае образца, полученного в присутствии интегразы, выявляются характерные пропуски (или «следы» — *footprints*), соответствующие участкам последовательности, защищенным от расщепления, благодаря связыванию с интегразой. Сравнивая положения пропусков с расположением фрагментов, образующихся при использовании специфических методов расщепления (также показано на рис. 14.15), удается точно идентифицировать защищенные нуклеотиды в известной последовательности области POP'. Как показано на рисун-

ке, интегразы защищает общую кор-последовательность (рис. 14.14), а также один участок в плече P' и два участка в плече P. В эксперименте, отраженном на рис. 14.15, для изучения относительной прочности связывания интегразы с различными участками POP' используется конкурентное связывание с ДНК полианиона гепарина. Можно видеть, что гепарин вытесняет интегразу из всех участков связывания, за исключением сайта, расположенного в плече P'. Вероятно, с этим сайтом интегразы связывается значительно прочнее, чем с другими сайтами узнавания белка в области POP'.

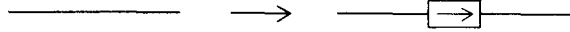
Подвижные генетические элементы

В гл. 8 мы рассмотрели основные особенности внедряющихся последовательностей (или IS-элементов) и транспозонов. Подвижные элементы представляют собой автономные единицы, в нуклеотидной последовательности которых заключена информация о структуре специализированных белков, обеспечивающих их перемещение. Такое перемещение (или транспозиция) достигается за счет специфического взаимодействия соответствующего белка с концевыми последовательностями перемещающегося элемента. Процесс транспозиции можно разделить на два этапа. На первом — нуклеотидная последовательность концевых участков подвижного элемента соединяется с ДНК-мишенью, специфически расщепленной на участке встраивания. На втором этапе происходит репликация подвижного элемента, не сопровождающаяся репликацией ДНК, в которую происходит встраивание. Таким образом, одна копия подвижного элемента оказывается включенной в ДНК-мишень, а другая сохраняет свою прежнюю локализацию. При этом обычно происходит дупликация небольших участков последовательности ДНК-мишени (по 5–9 п.н.), примыкающих к каждому из концов встроившегося элемента. Для подвижных элементов различного типа порядок реализации этих этапов может быть различным. Был предложен целый ряд возможных механизмов транспозиции. Следует отметить, что в рамках такого механизма удовлетворительное объяснение должны найти самые разнообразные явления, так или иначе связанные с транспозицией (рис. 14.16).

На сегодняшний день наиболее полно изучены подвижные элементы Tn3 и родственный ему $\gamma\delta$. Транспозон Tn3 имеет размер 4957 п.н. и содержит ген, кодирующий фермент β -лактамазу (Bla, рис. 14.17), определяющий устойчивость к ампициллину. На обоих концах Tn3 находятся инвертированные повторы протяженностью 38 п.н. При анализе мутантов Tn3³ было установлено, что для проявления транспозиционной активности последовательности обоих повторов должны оставаться неповрежденными. Мутационные изменения в этих последовательностях не

Межмолекулярные процессы:

Транспозиция

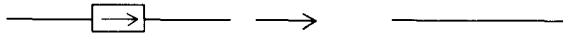


Коинтеграция – слияние репликонов

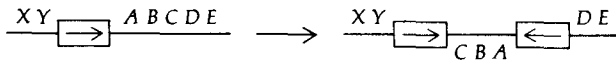


Внутримолекулярные процессы:

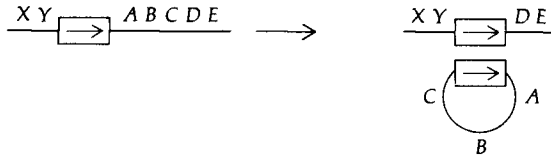
Точное вырезание



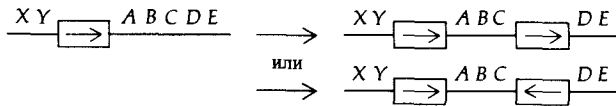
Двойная инверсия



Делетирование



Встраивание по соседству



Смешанные процессы:

Кооперативная транспозиция

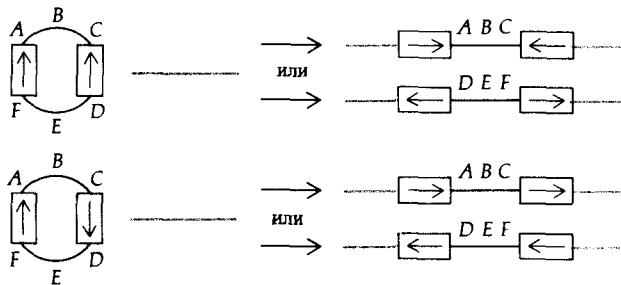


Рис. 14.16. Виды хромосомных перестроек, связанных с перемещением внедряющихся IS-элементов и транспозонов. Считается, что процесс точного вырезания не связан непосредственно с транспозицией, однако для полноты картины он включен в общий список.

удается скомпенсировать с помощью комплементации, что свидетельствует о непосредственном участии концевых повторов в механизме транспозиции. Tn3 несет еще две функции, потеря которых может быть скомпенсирована за счет комплементации, что позволяет отнести эти функции к действию определенных белков, кодируемых Tn3. Один из этих белков, продукт гена *tnpA*, необходим для осуществления всех транспозиционных процессов. Другой, кодируемый геном *tnpR*, дей-

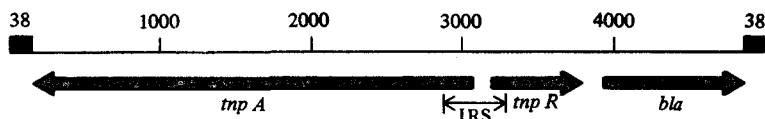


Рис. 14.17. Генетическая организация транспозона Tn3. На концах помечены инвертированные повторы протяженностью по 38 п.н. Tn3 кодирует три белка; показано направление транскрипции соответствующих генов. Белок, продукт гена *tnpR*, связывается с областью IRS

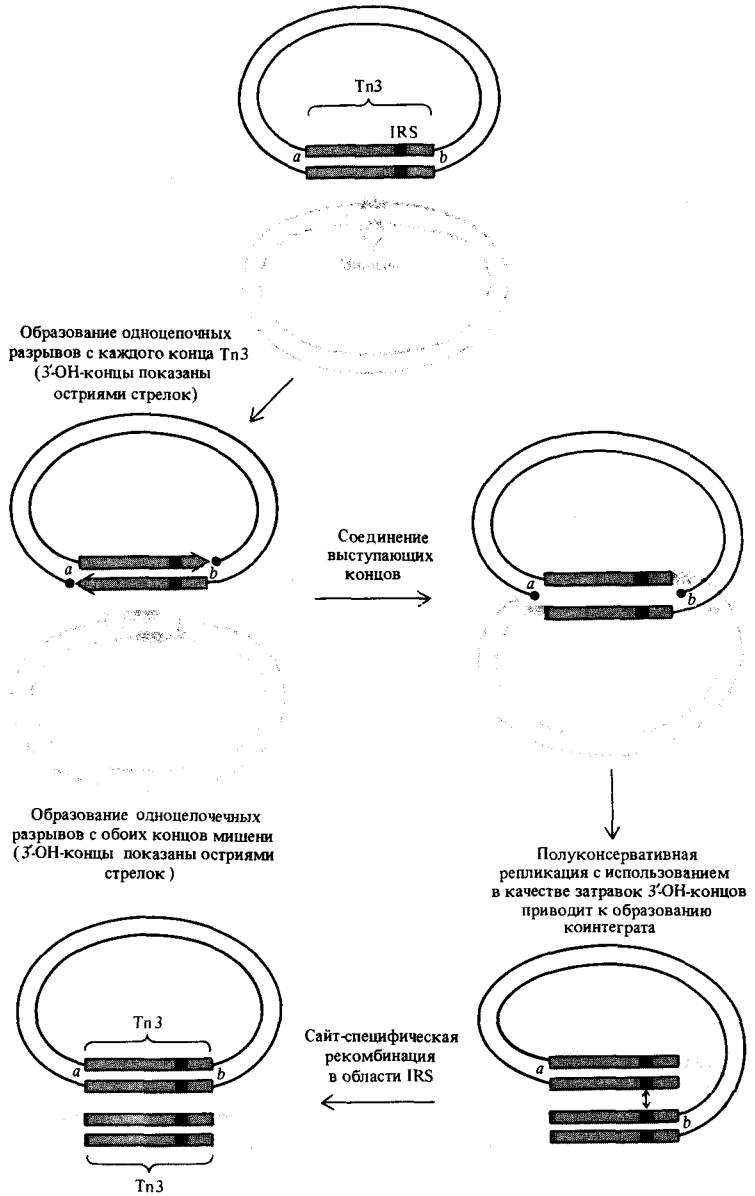
(400 п.н.), что сопровождается репрессией транскрипции генов *tnpA* и *tnpR*, а также может участвовать в сайт-специфической рекомбинации между двумя областями IRS. Нумерация – в нуклеотидных парах, начинающая с левого конца транспозона.

стует как репрессор гена *tnpA* и своего собственного гена и играет соответственно важную роль в регуляции транспозиции. Регуляторная роль белка *tnpR* подтверждается тем, что мутации в соответствующем гене приводят к повышению частоты транспозиции (приблизительно в 1000 раз) благодаря дерепрессии гена *tnpA*. Ферментативная функция белка *tnpR* заключается в разрешении промежуточных структур, возникающих в ходе транспозиции. Возникновение коинтегратов является необходимым промежуточным этапом во всех транспозиционных процессах, характерных для Tn3 и $\gamma\delta$ (см. рис. 14.16). Продукт гена *tnpR*, или резолваза (от англ. *to resolve* – разрешать), как у Tn3, так и у $\gamma\delta$ направляет сайт-специфическую рекомбинацию между двумя копиями транспозона по «внутреннему центру разрешения» (IRS – *internal resolution site*), расположенному между генами *tnpA* и *tnpR* (рис. 14.17). В области IRS содержатся также сайты связывания резолвазы, как репрессор подавляющего транскрипцию генов *tnpA* и *tnpR*.

Перемещающийся элемент $\gamma\delta$ по структурно-функциональной организации очень схож с Tn3 и несет точно такой же ген *tnpR*, что указывает на близкое родство этих элементов.

Предполагаемый механизм транспозиции Tn3, учитывающий роль промежуточного коинтеграта, представлен на рис. 14.18. Предполагается, что одноцепочечные разрывы возникают в комплементарных цепях ДНК на обоих концах транспозона. В комплементарных цепях ДНК мишени также образуются разрывы, отделенные друг от друга определенным числом нуклеотидных пар, которые по окончании транспозиции окажутся дублированными и расположенными по обе стороны от встроившегося транспозона (см. табл. 8.1 и 8.2). В области разрыва концы транспозона соединяются с выступающими концами разрывов ДНК-мишени. При этом образуются две «вилки» со свободными 3'-ОН группами, которые могут выступать в роли затравок для репликации. Образовавшиеся структуры очень напоминают обычные репликативные вилки, участвующие в полуконсервативной репликации бактериальной хромосомы. В обеих вилках начинается репликация транспозона, простирающаяся вплоть до момента встречи двух вилок и завершения репликации ДНК встраиваемого элемента. При этом, как уже упоминалось, образуются две копии транспозона: одна – в исходном положении, другая – встроившаяся в структуру ДНК-мишени. Эта репликация сопровождается дублированием небольшого участка ДНК-мишени, копии которого в результате оказываются расположенными по обе стороны от встроившегося транспозона. Транспозиция проходит через стадии

Рис. 14.18. Модель транспозиции Tn3 и других подвижных элементов, обладающих системой сайт-специфической рекомбинации. Транспозиция с одного репликона на другой происходит через образование коинтеграта и слияние репликонов. Заметьте, что происходит дупликация участка ДНК-мишени, две копии которого оказываются расположенными по обе стороны от встроившегося транспозона. (По Shapiro J., 1979. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 1933.)



образования коинтеграта. Если точка начала репликации и сайт интеграции находятся на различных репликонах, то образование коинтеграта приводит к слиянию двух репликонов, содержащих по одной копии перемещающегося элемента на каждом из стыков. В дальнейшем происходит разрешение коинтеграта за счет сайт-специфической рекомбинации между двумя копиями транспозона по области IRS.

Процесс сайт-специфического внесения одноцепочечного разрыва и соединения одного из концов этого разрыва с другой нуклеотидной цепью, постулируемый в рамках модели на рис. 14.18, удалось действительно наблюдать на примере репликации одноцепочечного фага ϕX174 . Показано, что белок *cisA*, ковалентно связанный с 5'-фосфатной группой специфически надрезанного участка *ori*, направляет реакцию взаимодействия этой группы с 3'-концом соответствующего участка новообразованной цепи. Таким образом, возникает ковалентно замкнуто одноцепочечное кольцо (см. гл. 13). В рамках рассмотренной модели удается удовлетворительно интерпретировать структурные изменения связанные с транспозицией Tn3, $\gamma\delta$ и других перемещающихся элементов, вызывающих образование 5-нуклеотидных повторов в ДНК-мишени и обладающих IRS-рекомбинационной системой разрешения коинтегратов. В то же время реальный механизм транспозиции, в частности порядок осуществления этапов, показанных на рис. 14.18, еще не установлен. Подвижные элементы другого типа, и в первую очередь элементы, транспозиция которых сопровождается возникновением 9-нуклеотидных повторов в ДНК-мишени, аналогичной системой рекомбинации IRS-последовательностей не обладают и могут перемещаться без образования коинтегратов.

Еще одно характерное свойство перемещающихся генетических элементов заключается в их способности к точному вырезанию и удалению из хромосомы, с восстановлением в ней исходной нуклеотидной последовательности. Считают, что точное вырезание происходит независимо от каких бы то ни было функций, связанных с механизмом транспозиции. Этот процесс также не зависит от гена *recA* *E. coli*, однако, безусловно, связан с определенными генетическими функциями хостной клетки. Мутации в генах *recC*, *mutH*, *mutL* и *mutS* *E. coli* (см. гл. 13) увеличивают частоту вырезания, а мутации в гене *himA* препятствуют вырезанию. Процесс точного вырезания, вероятно, связан с обменом между последовательностями прямых или инвертированных повторов, расположенных на концах перемещающихся генетических элементов.

Общая картина метаболизма ДНК

Первоначальные взгляды на структуру ДНК были главным образом основаны на представлении о достаточно жесткой двойной спирали, в которой система водородных связей между комплементарными основаниями прочно связывает между собой спирализованные сахарофосфатные остовы обеих цепей. Дополнительную прочность молекула ДНК придает взаимодействия гидрофобной природы, так называемые

стэкинг-взаимодействия, между соседними парами оснований. Жесткость структуры ДНК гарантирует надежность хранения наследственной информации, закодированной в последовательности оснований.

Однако открытие Z-формы ДНК, а также установление способности определенных участков ДНК легко переходить из В-формы в Z-форму продемонстрировали ограниченность представлений о совершенно монотонной жесткой структуре ДНК. Следует признать, что ДНК скорее присуща мобильность структуры, способность к спонтанному изменению конформации в довольно широких пределах.

Изучение метаболизма ДНК, поначалу направленное в основном на уточнение деталей механизма полуконсервативной репликации, позволило обнаружить необычайное множество ферментов и других белков, придающих молекулам ДНК *in vivo* еще большую структурно-функциональную мобильность. На сегодняшний день ясно, что сохранность закодированной в ДНК информации, предназначенной для передачи последующим поколениям, обеспечивается скорее за счет активного метаболизма, нежели просто за счет стабильности, присущей самой структуре ДНК.

В этом метаболизме активную роль играют комплементарные взаимодействия между основаниями. Феномен комплементарности обеспечивает такие процессы, как полуконсервативная репликация, контроль точности считывания, исправление ошибок и репарация повреждений структуры, возникающих под действием различных факторов окружающей среды. Комплементарные взаимодействия играют также важнейшую роль в процессах общей и сайт-специфической рекомбинации. И в то же время их влияние на различные аспекты метаболизма ДНК не является абсолютным. Так, в случае особенно сильных повреждений ДНК действие репарационной SOS-системы может направляться по пути поддержания общей целостности хромосомы, даже в ущерб требованиям принципа комплементарности, и таким образом приводить к закреплению некоторых мутационных изменений. Участие белка RecA *E. coli* как в общей рекомбинации, так и в активации репарационного действия SOS-системы является поистине удивительным примером эволюционного «нововведения», связующего воедино два различных аспекта метаболизма ДНК.

С другой стороны, подвижные генетические элементы, ретровирусы и другие молекулярные системы, функционирование которых основано на незаконной рекомбинации, располагают ферментативным аппаратом, который позволяет им действовать как бы независимо от принципа комплементарности, обычно играющего ключевую роль в процессах метаболизма ДНК. Функциональные особенности этих элементов дают им возможность направлять рекомбинацию между негомологичными последовательностями. Подвижные элементы широко распространены как у прокариот, так и у эукариот, что указывает на определенные эволюционные преимущества, вероятно связанные именно со способностью к такого рода рекомбинационным процессам, которую эти элементы придают содержащим их последовательностям ДНК. Не вызывает сомнений, что, несмотря на необходимое постоянство структуры, обусловленное самим информационным значением ДНК, она в то же время обладает существенной метаболической активностью, связанной с потребностями структурной эволюции.

Литература

- DasGupta C. et al.* (1981). Concerted strand exchange and formation of Holliday structures by *E. coli recA* protein, *Cell*, **25**, 507–516.
- Dunn K., Chrysoygelos S., Griffith J.* (1982). Electron microscope visualization of *recA*-DNA filaments: evidence for a cyclic extension of duplex DNA, *Cell*, **28**, 757–765.
- Fogel S., Mortimer R.* (1969). Informational transfer in meiotic gene conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **62**, 96–103.
- Fogel S. et al.* (1971). Gene conversion in unselected tetrads from multipoint crosses, *Stadler Symp.*, **1–2**, 89–110.
- Galas D.J., Chandler M.* (1981). On the molecular mechanisms of transposition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4858–4862.
- Heffron F., So M., McCarthy B.J.* (1978). *In vitro* mutagenesis of a circular DNA molecule [carrying Tn3] by using synthetic restriction sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6012–6016.
- Hoess R.H., Foeller C., Bidwell K., Landy A.* (1980). Site-specific recombination functions of bacteriophage λ : DNA sequence of regulatory regions and overlapping structural genes for *int* and *xis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2482–2486.
- Hsu P.-L., Ross W., Landy A.* (1980). The λ phage *att* site: functional limits and interaction with protein, *Nature*, **285**, 85–91.
- Hurst D. et al.* (1972). Conversion-associated recombination in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 101–105.
- Landy A., Ross W.* (1977). Viral integration and excision: structure of the lambda *att* site, *Science*, **197**, 1147–1160.
- Meselson M.S., Radding C.M.* (1975). A general model for genetic recombination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 358–361.
- Mizuuchi K., Kemper B., Hays J., Weisberg R.* (1982). T4 endonuclease VII cleaves Holliday structures, *Cell*, **29**, 357–365.
- Shapiro J.A.* (1979). Molecular model for transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1933–1937.
- Stahl F.W.* 1979. *Genetic Recombination: Thinking about It in Phage and F*, W. H. Freeman, San Francisco.
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.L., Rothstein R., Stahl F.W.* (1983). The double-strand-break repair model for recombination, *Cell*, **33**, 25–

Ключевые слова и понятия

- | | |
|--|--|
| Белок RecA | Модель «двухцепочный разрыв – репарация» |
| Высокая отрицательная интерференция | Модель Мезелсона – Рэддинга |
| Генная конверсия | Модель Холлидея |
| Гены <i>rec</i> | Незаконная рекомбинация |
| Гетеродуплексная ДНК | Общая рекомбинация |
| ДНК-мишень | Перемещение области перекреста |
| Интеграза и эксцизионаза фага λ | Подвижные генетические элементы |
| <i>Int</i> -зависимая рекомбинация | Резолваза |
| Коэффициент совпадения (коинциденция) (<i>c</i>) | Сайт-специфическая рекомбинация |

Задачи

14.1. Изобразите восьмиспоровые аски, образования которых можно ожидать, исходя из структуры тетрад, изображенных на рис. 14.9, А и Б, I–IV.

14.2. Взяв за основу материальную часть рис. 14.9, покажите, каким образом мог возникнуть абберрантный аски с распределением аллелей 5 : 3.

14.3. Дрожжевые аски содержат только по четыре споры. Как можно было бы обнаружить наличие гетеродуплексной ДНК после мейоза у дрожжей?

14.4. Обнаружены две мутантные формы подвижного элемента. Мутант А характеризуется значительным снижением частоты транспозиции. Мутант В проявляет повышенную частоту транспозиции. Какие генетические функции могут быть затронуты у этих мутантов? Какого фенотипа следует ожидать в случае двойного мутанта АВ?

14.5. Молекулы плазмидной ДНК, содержащие перекресты (рис. 14.5), были выделены из клеток *E. coli* в виде «восьмерок», состоящих из двух сцепленных колец, и подвергнуты расщеплению рестрик-

тазой *EcoRI* непосредственно перед подготовкой образца к электронной микроскопии. Такие расщепленные молекулы при комнатной температуре нестабильны и, не будучи немедленно зафиксированы, быстро превращаются в линейные двуцепочечные структуры единичной длины. В то же время нерасщепленные «восьмерки» достаточно стабильны. Дайте объяснение.

14.6. Фаги Т4, содержащие температурочувствительную мутацию в гене лигазы, характеризуются повышенной частотой рекомбинации различных маркеров в ходе скрещивания при перmissive температурах. Ультрафиолетовое облучение родительского фагового штамма также повышает частоту рекомби-

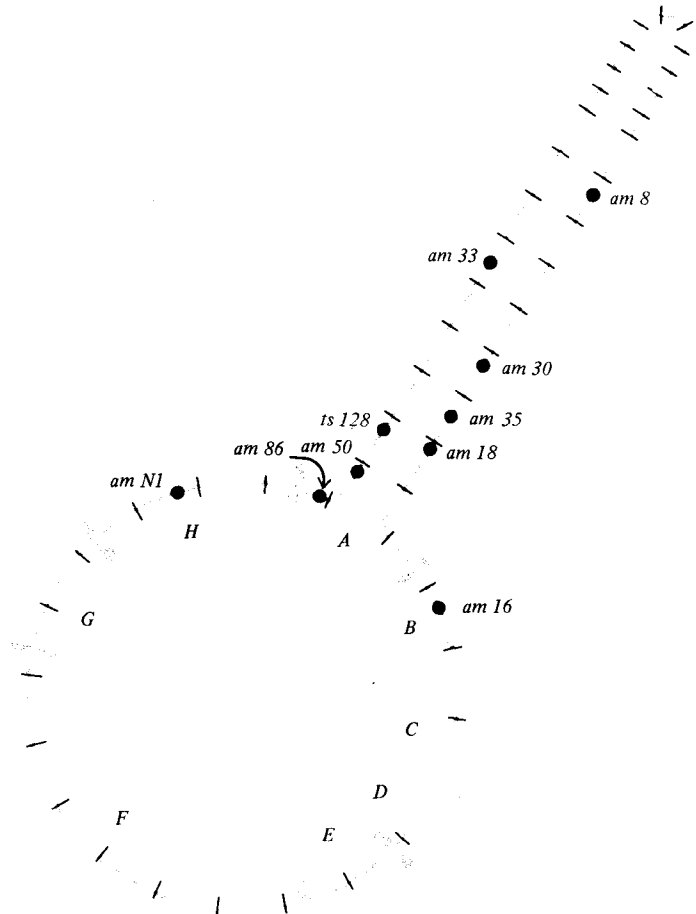


Рис. 14.19. Генетическая карта фага фХ174, построенная на основании частот рекомбинации между соседними маркерами. Обратите внимание на искажение карты в области цистрона А: сравните с картой, представленной на рис. 7.5. (По Benbow R. M. et al., 1971. J. Virol., 7, 549.)

нации между различными маркерами. Объясните эти явления.

14.7. Изобразите стадии процесса, ведущего к образованию рекомбинантных дочерних фагов в результате рекомбинации генетических маркеров между двумя кольцевыми родительскими геномами фага λ .

14.8. Мутации, инактивирующие ген *tnpR* транспозона Tn3, вызывают повышение частоты транспозиции. Какой еще эффект можно ожидать от этих мутаций?

14.9. Предложите объяснение искажения, наблюдаемого на генетической карте фага ϕ X174, представленной на рис. 14.19, в области цистрона *A*.

14.10. Совместная инфекция *E. coli* двумя фагами, несущими различные летальные температурочувствительные мутации, при перmissive температуре приводит к возникновению рекомбинантов дикого типа. Предложите эксперимент, который позволил бы выяснить, имеют ли эти фаги свою собственную систему рекомбинации.

14.11. Для некоторых грибов характерно образование aberrantных асков пре-

имущественно с распределением 6:2 при практически полном отсутствии в потоке асков с распределением 5:3. Какая рекомбинация может лучше всего объяснить эту закономерность? Какие допущения следует сделать для того, чтобы эта модель полностью удовлетворяла вышеупомянутым фактам?

14.12. Предложите генотипы д. штаммов P^- и Hfr *E. coli*, с помощью которых можно было бы отобрать мутантные штаммы $F^- rec^-$.

14.13. Представьте схематически последовательность событий, в результате которых транспозиция Tn3 может привести к делеции части хромосомы *E. coli*, как отмечено на рис. 14.16.

14.14. Обратите внимание на то, что в экспериментах, отраженных на рис. 14 коэффициент I всегда значительно превышает 1 даже для достаточно далеких друг от друга маркеров фага λ . Объясните это явление, исходя из обсуждения динамики фагового скрещивания, приведенного в гл. 7.

Регуляция экспрессии генов у прокариот

Среда обитания любых организмов подвержена постоянным изменениям. Поэтому можно полагать, что в результате естественного отбора значительные преимущества получили организмы, которые оказались способны регулировать свою генетическую активность для того, чтобы приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды. Регуляция генетической экспрессии придает организмам необходимую гибкость в выборе способов утилизации доступных в данной ситуации ресурсов, что позволяет поддерживать максимальную скорость репродукции и обеспечивать устойчивость по отношению к действию неблагоприятных факторов окружения. Так, бактерии, растущие на богатой среде, содержащей удобный источник углерода, например глюкозу, а также все 20 аминокислот, могут размножаться быстрее, если они не расходуют своих ресурсов на синтез многочисленных ферментов, необходимых для утилизации менее удобных источников углерода или для биосинтеза самих аминокислот. Использовать эти метаболические функции клетке необходимо только тогда, когда вышеназванные компоненты отсутствуют в окружающей среде. Наиболее простой и эффективный контроль генетической активности у прокариот осуществляется на уровне транскрипции. Многочисленные примеры использования регуляции этого типа были обнаружены и изучены для *E. coli* и других бактерий.

Очень полезным оказалось и изучение механизмов регуляции на бактериофагах. И в этом случае важнейшим уровнем регуляции генетической экспрессии оказывается регуляция транскрипции. Важным фактором, способствовавшим успешному изучению генетики регуляторных механизмов, является небольшой по сравнению с бактериальной хромо-

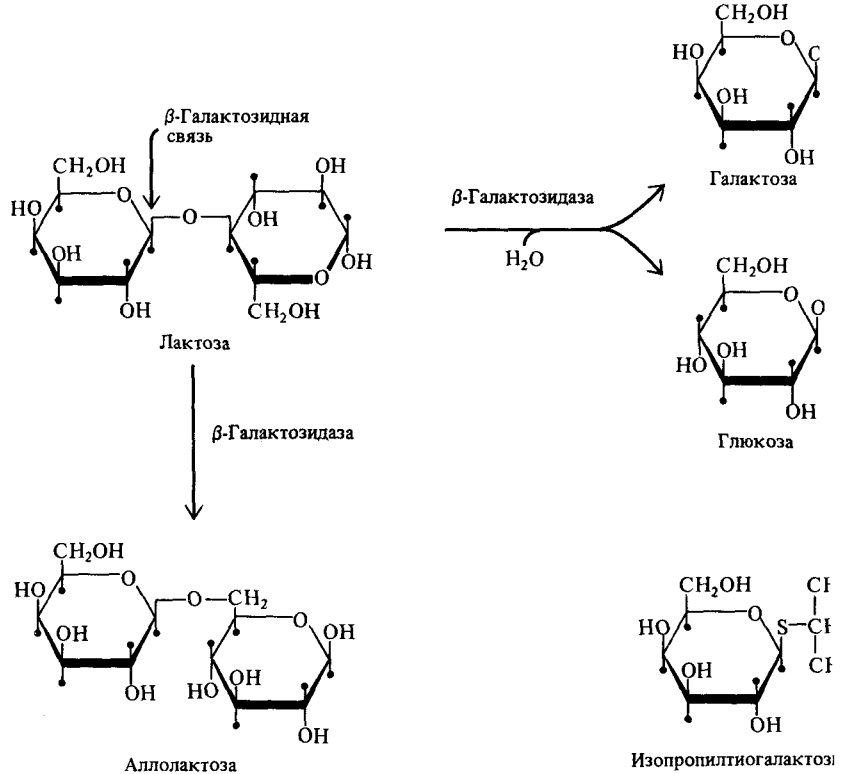


Рис. 15.1. Химические реакции, катализируемые β -галактозидазой: гидролиз лактозы и изомеризация лактозы в аллолактозу. Аллолактоза является естественным индуктором синтеза β -галактозидазы. В опытах по индук-

ции β -галактозидазы часто используется показанный на рисунке неметаболизируемый синтетический индуктор IPTG (ИПТГ) поскольку он не гидролизуется β -галактозидазой.

смой размер фагового генома, позволяющий идентифицировать все или по крайней мере большую часть фаговых генов. Сегодня уже ясно, что контроль экспрессии генов и у фагов, и у бактерий осуществляется с использованием однотипных регуляторных элементов. Наличие подобных регуляторных элементов характерно для всех прокариот.

Классическим примером, иллюстрирующим явление транскрипционного контроля генетической активности, служит система регуляции синтеза β -галактозидазы — фермента, расщепляющего дисахаридлактозу на галактозу и глюкозу (рис. 15.1). Синтез этого фермента индуцируется, когда в питательной среде присутствует лактоза, а оптимальный источник углерода — глюкоза — отсутствует. При индукции гена β -галактозидазы появляется в клетке соответствующая ферментативная активность: предшествует появлению мРНК, считываемой с гена *lacZ* (рис. 15.2). После индукции скорость синтеза β -галактозидазы возрастает примерно в 1000 раз и поддерживается на таком уровне до тех пор, пока в среде присутствует индуктор.

В качестве индукторов синтеза β -галактозидазы могут выступать как лактоза, так и ряд ее структурных аналогов. Аллолактоза, один из про-

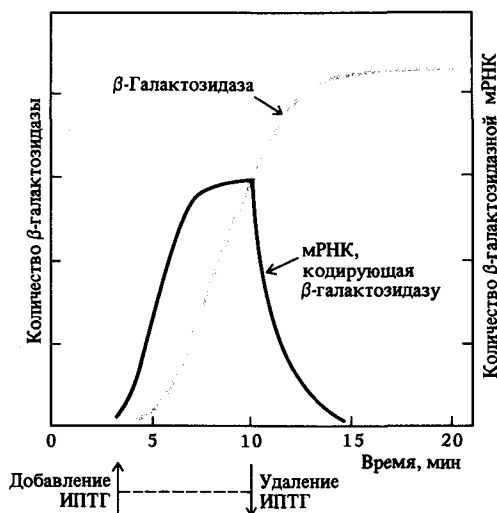


Рис. 15.2. Повышение продукции мРНК, кодирующей β-галактозидазу, предшествует повышению уровня синтеза самой β-галактозидазы. Постоянное присутствие индуктора необходимо для поддержания повышенного уровня мРНК, которая в отличие от сравнительно стабильного фермента подвержена быстрой

деградации. Обычный уровень ферментативной активности, характерный для клеток в отсутствие индуктора и необходимый для синтеза аллолактозы (естественного индуктора), обеспечивается единичной копией мРНК, синтез которой инициируется при прохождении репликативной вилки через область гена.

межучточных продуктов метаболизма лактозы (рис. 15.1), является собственно активным индуцирующим агентом. Низкий конститутивный уровень β-галактозидазы, характерный для неиндуцированных клеток, достаточен для превращения лактозы в индуктор — аллолактозу.

После удаления индуктора из среды уровень соответствующей мРНК резко снижается в результате ее деградации до нуклеотидов под действием рибонуклеазы. Время полужизни мРНК составляет всего лишь несколько минут. Поэтому для поддержания уровня мРНК необходима постоянная индукция ее синтеза, уравнивающего процесс быстрой деградации. Практически все прокариотические мРНК метаболически нестабильны. Эта нестабильность молекул мРНК в сочетании с аппаратом регуляции транскрипции обеспечивает клетке возможность избирательно синтезировать только необходимые белки.

Специфические механизмы регуляции экспрессии генов удалось установить благодаря сочетанию генетического и биохимического анализа ряда генетических функций, таких, как способность утилизировать альтернативные источники углерода, синтезировать определенные аминокислоты и другие метаболиты. Как отмечалось в гл. 7 и 8, генетическое картирование мутаций, влияющих на определенную метаболическую цепь, свидетельствует о том, что вовлеченные в нее гены часто располагаются в геноме в виде кластеров. Группировка функционально связанных между собой генов в кластеры, транскрипция каждого из которых инициируется на общем промоторе, позволяет осуществлять координированный контроль экспрессии этих генов. Транскрипция кла-

стера генов с образованием полицистронной мРНК обеспечивает одностороннее временное появление после индукции сразу всех белков, необходимы для реализации соответствующей функции.

Генетический анализ механизмов регуляции экспрессии на примерах, которые рассматриваются в этой главе, позволяет выявить существование трех различных типов регуляторных элементов.

1. *Регуляторные белки* – белки, влияющие на активность РНК-полимеразы в инициации или терминации транскрипции.

Эти белки могут оказывать как позитивное, так и негативное влияние на процессы инициации или терминации. Их активность часто контролируется с помощью специфического связывания низкомолекулярных эффекторов.

2. *Эффекторы* – небольшие небелковые молекулы, концентрация которых в клетке отражает особенности её состояния. В качестве эффекторов могут выступать сАМР, триптофан, аллолактоза и др.

3. *Регуляторные последовательности* – участки нуклеотидной последовательности, действуя на которые регуляторные белки влияют на уровень синтеза соответствующих мРНК (промоторы, терминаторы и др.)

Участки ДНК, контролирующие транскрипцию

Синтез РНК направляется РНК-полимеразой, которая связывается с промоторным участком ДНК и начинает транскрипцию матричной цепи ДНК, которая продолжается вплоть до достижения терминаторного участка. Таким образом, контроль уровня данной мРНК в клетке осуществляется через взаимодействие с промотором. Однако в контроле транскрипции может участвовать и терминатор, если он расположен на участке между промотором и самим регулируемым геном. В следующих разделах будут обсуждаться оба названных типа регуляции.

Участки нуклеотидной последовательности, узнаваемые холоферментом РНК-полимеразы и существенные для инициации транскрипции были локализованы с помощью определения последовательности фрагментов ДНК, которые при связывании фермента оказываются защищенными от действия нуклеаз. Сравнение большого набора таких последовательностей показывает, что не существует единой промоторной последовательности. Многие различающиеся по структуре последовательности ДНК могут с различной эффективностью узнаваться РНК-полимеразой, что отражает известные различия в характеристических значениях максимального уровня транскрипции различных транскрипционных единиц. В то же время такое сравнение позволяет выявить некоторые структурные особенности, общие для большинства известных промоторов (обобщенные последовательности), необходимые для взаимодействия с РНК-полимеразой. На рис. 15.3 показаны обобщенные последовательности промоторных участков, узнаваемых холоферментом РНК-полимеразы *E. coli*. Транскрипция начинается с нуклеотида, обозначенного +1. Последовательности, необходимые для взаимодействия с РНК-полимеразой, находятся в этом положении в области – 10

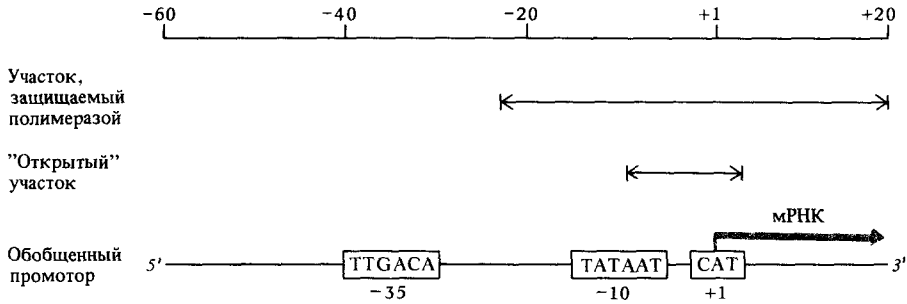


Рис. 15.3. Общая структура промоторов *E. coli*. Отмечены общие последовательности, содержащие высококонсервативные нуклеотиды. Показаны последовательности, входя-

щие в состав некодирующей цепи, комплементарной той, которая используется РНК-полимеразой в качестве матрицы. Подробности – в тексте.

(TATAAT – так называемый Прибнов-бокс) и – 35 (TTGACA). Мутации, влияющие на промоторную активность, почти всегда либо локализованы в этих участках, либо изменяют расстояние между ними. Считается, что области – 10 и – 35 промоторов узнаются белком σ , необходимым для точной инициации транскрипции. После узнавания промотора в нативной «закрытой» спирали ДНК холофермент РНК-полимеразы образует «открытый комплекс», в котором произошло плавление небольшого участка спирали из 16–18 п.н. Этот район помечен на рис. 15.3. В него входит нуклеотид +1 матричной цепи и часть Прибнов-бокса.

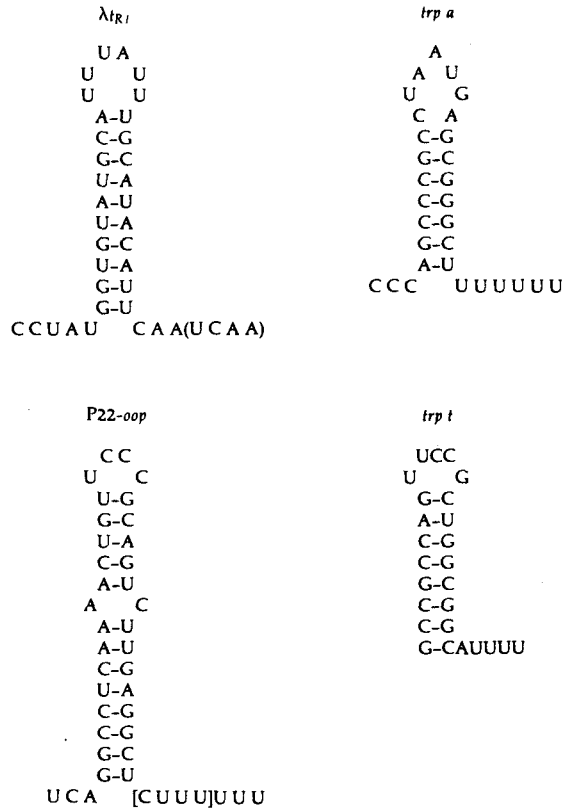
Терминация синтеза РНК осуществляется на специальных последовательностях ДНК (терминаторах). Анализ последовательностей, расположенных на 3'-конце РНК-транскриптов, позволяет выявить общие структурные особенности, дающие основания полагать, что прежде, чем быть узнаваемыми, терминаторные последовательности считываются РНК-полимеразой. Часто эти транскрипты заканчиваются цепочкой уридиновых нуклеотидов, которой предшествует участок, содержащий внутренние взаимно комплементарные последовательности в противоположных ориентациях. Как известно, такие последовательности способны образовывать шпильчатые структуры. Область «шпильки» обычно обогащена GC-парами, придающими этой структуре большую стабильность. Примеры строения 3'-концов некоторых транскриптов представлены на рис. 15.4.

Движение РНК-полимеразы вдоль ДНК в ходе транскрипции сопровождается перемещением участка расплавленной ДНК, в котором 3'-концевая область синтезируемой РНК связана водородными связями с матричной комплементарной цепью ДНК (рис. 15.5, А). После считывания терминаторного участка в области комплементарных взаимодействий между матричной цепью ДНК и образовавшимся РНК-транскриптом может произойти резкая перестройка, связанная с образованием новой системы водородных связей («шпильки»), как показано на рис. 15.5, Б. Эта перестройка может приводить к терминации транскрипции. Как это происходит в деталях, пока неизвестно. Считают, что непосредственно перед терминацией возникшая шпильчатая структура узнается белком NusA – одним из компонентов РНК-полимеразы. Образование РНК-шпильки может вызывать сужение области плавления ДНК

Рис. 15.4. 3'-Концевые последовательности четырех мРНК, образующихся при транскрипции генов фага λ , фага P22, а также *trp*-оперона *E. coli*.

Круглые скобки отмечают вариабельность концевой последовательности транскрипта. В квадратных скобках — неточно идентифицированные остатки.

(По Rosenberg M., Court D., 1979. Ann. Rev. Gen. 13, 319.)



за счет смыкания участков матричной и комплементарной ей цепей ДНК. Кроме того, концевая последовательность РНК-транскрипта, состоящая в основном из остатков рибουридина, и комплементарный полидезоксиаденозиновый участок матричной цепи ДНК образуют, как известно, не слишком прочную систему водородных связей. Это также может способствовать диссоциации РНК-транскрипта от матричной цепи ДНК.

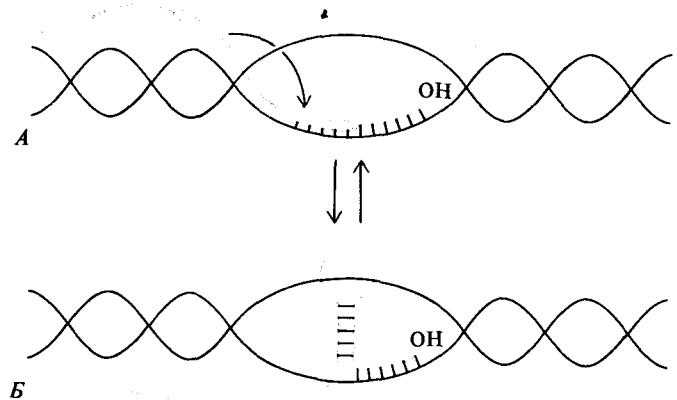


Рис. 15.5. Возможный механизм терминции транскрипции, связанной с образованием шпильчатой структуры в новосинтезированном РНК-транскрипте. Подробности — в тексте. (По Platt T, 1980. Cell, 24, 10.)

Lac-оперон

Генетический анализ системы утилизации лактозы клетками *E. coli*, осуществленный Франсуа Жакобом и Жаком Моно, можно назвать важнейшим шагом на пути к пониманию механизмов регуляции бактериальных генов. На базе этого исследования была впервые сформулирована модель структурно-функциональной организации *оперона*. Для утилизации лактозы клетке необходимы продукты двух тесно сцепленных цистронов. Это ген *lacZ*⁺, кодирующий β-галактозидазу (рис. 15.1), и ген *lacY*⁺, кодирующий пермеазу, которая обеспечивает активный транспорт лактозы в клетку. Третий ген *lacA*⁺, кодирующий фермент тиогалактозидтрансацилазу, регулируется координированно с генами *lacZ*⁺ и *lacY*⁺, но не имеет непосредственного отношения к утилизации лактозы. Эти гены картируются в последовательности Z–Y–A.

Синхронная индукция всех трех белков реализуется через синтез одной общей полицистронной мРНК. Обычно в отсутствие индуктора уровень транскрипции генов *lac* очень невелик и в клетке имеются лишь очень малые количества β-галактозидазы и пермеазы. В то же время удается легко отобрать мутанты (так называемые конститутивные мутанты), которые и в отсутствие индуктора продуцируют большие количества этих белков, такие же, как нормальные клетки в условиях индукции. Все эти конститутивные мутанты содержат мутации вблизи гена Z и на достаточном удалении от генов Y и A. Как показал комплементационный анализ, такие мутанты можно разбить на два класса: *I*[−] (неиндуцибельные) и *O*^c (операторно-конститутивные). С использованием элементов *F'lac* или конъюгативных мерозигот (см. гл. 8) можно получить частичные диплоиды, включающие такие мутации. Фенотипические проявления частичных диплоидов этого типа свидетельствуют, что мутации *I*[−] и *O*^c оказывают принципиально различное влияние на синтез β-галактозидазы. Из перечисленных в таблице 15.1 частичных диплоидов два первых характеризуются нормальным индуцибельным фенотипом, что указывает на рецессивный характер мутации *I*[−]. Ген *I*⁺ осуществляет нормальный контроль экспрессии гена *Z*⁺ в случае обоих частично диплоидных генотипов независимо от того, находится ли ген *Z*⁺ на той же хромосоме, что и *I*⁺, или на другой. В случае двух по-

Таблица 15.1. Фенотипическое проявление гетерозиготных конститутивных мутаций в частичных диплоидах, характеризующихся также гетерозиготностью по мутации в гене β-галактозидазы

Генотип	Фенотип
$\frac{I^- O^+ Z^-}{I^+ O^+ Z^+}$	Индуцибельный контроль синтеза β-галактозидазы
$\frac{I^- O^+ Z^+}{I^+ O^+ Z^-}$	Индуцибельный контроль синтеза β-галактозидазы
$\frac{I^+ O^c Z^-}{I^+ O^+ Z^+}$	Индуцибельный контроль синтеза β-галактозидазы
$\frac{I^+ O^c Z^+}{I^+ O^+ Z^-}$	Конститутивный синтез β-галактозидазы

следних частичных диплоидов (табл. 15.1), напротив, как мутантный O^c так и нормальный O^+ гены оказывают влияние только на ген Z^+ , расположенный на той же самой хромосоме. (В этом случае говорят, что гены действуют только в *цис*-положении, а мутации в таких генах часто называют *цис*-доминантными.) Если на хромосоме, несущей ген Z^+ присутствует ген O^+ , то наблюдается индуцибельный синтез β -галактозидазы, однако, если вместо него присутствует ген O^c , синтез фермента оказывается конститутивным.

Для объяснения этих наблюдений Жакоб и Моно в 1961 г. выдвинули предположение о том, что транскрипция генов Z , Y и A находится под контролем регуляторного участка, названного *оператором* (ген O^+). Они также предположили, что регуляция транскрипции на операторном участке осуществляется *репрессором*, продуктом гена I^+ . Для репрессора были постулированы две функции. Одна из них — это связывание с оператором, подавляющее транскрипцию. Другая — связывание с индуктором. Авторы гипотезы предположили, что связывание репрессора

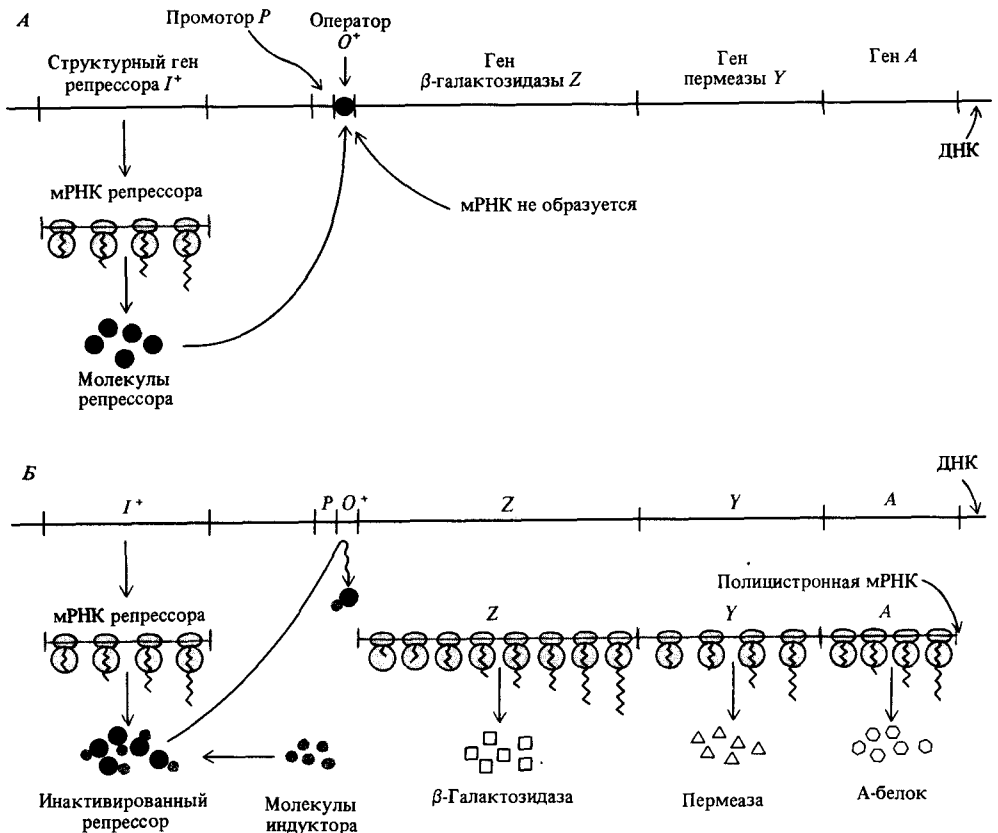


Рис. 15.6. Взаимодействие репрессора, индуктора и оператора при регуляции транскрипции генов лактозного оперона *E. coli*. А. В отсутствие индуктора репрессор связывается с оператором, тем самым препятствуя связыванию РНК-полимеразы с промотором,

прилегающим к операторной области. Б. Индуктор связывается с репрессором, инактивируя его, что дает возможность РНК-полимеразе связаться с промотором и начать транскрипцию.

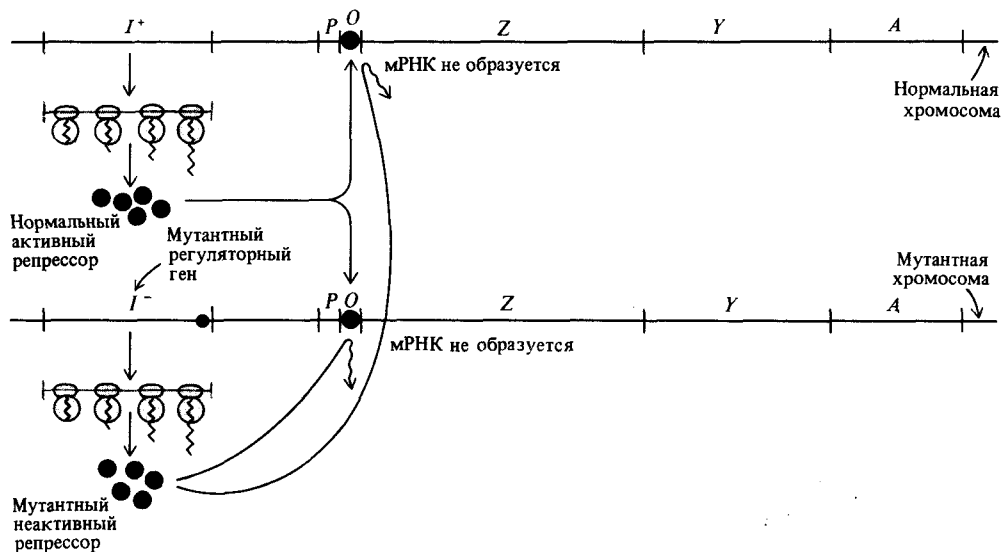


Рис. 15.7. Доминантность гена I^+ . В частично диплоидных клетках I^-/I^+ ген I^+ обеспечивает достаточно высокую продукцию активного репрессора для связывания с операторами на обеих хромосомах, тем самым

предотвращая транскрипцию обоих лактозных оперонов. Поэтому в таких частичных диплоидах синтез β -галактозидазы скорее индуцибельный, чем конститутивный.

с молекулой индуктора вызывает диссоциацию комплекса репрессор–оператор и тем самым делает возможной транскрипцию (рис. 15.6). Таким образом, гены Z , Y и A вместе с промоторным и операторным участками, контролирующими их транскрипцию, образуют так называемый *оперон*. Под этим понятием подразумевают набор примыкающих друг к другу генов, находящихся под контролем общего репрессора, действие которого регулируется с помощью связывания с молекулами индуктора или эффектора. Эта гипотеза объясняет как рецессивный характер мутаций I^- , так и *цис*-действие гена O (см. рис. 15.7 и 15.8).

Рецессивное проявление мутации I^- в частичном диплоиде, содержащем ген I^+ , объясняется просто тем, что ген I^+ поставляет достаточное количество молекул репрессора для связывания с обоими операторными участками и обеспечения индуцибельности синтеза β -галактозидазы. С другой стороны, присутствие аллелей O^c и O^+ в частичном диплоиде отражается на контроле транскрипции гена β -галактозидазы, расположенного только на той же самой хромосоме. В отличие от гена I функционирование гена O не связано с образованием каких-либо свободно перемещающихся внутри клетки продуктов.

Дополнительные свидетельства в пользу оперонной теории были получены благодаря открытию «полярных» мутаций. Было обнаружено, что *nonsense* (*amber*)-мутации в гене Z , приводящие, естественно, к утрате β -галактозидазной активности, часто проявляются и в исчезновении пермеазной и трансацетилазной активности в клетках с генотипом Y^+A^+ . *Nonsense*-мутации в гене Y , лишаящие клетку пермеазной активности, тоже часто приводят к подавлению трансацетилазной активности в клетках с генотипом A^+ . И в то же время эти мутации никак не

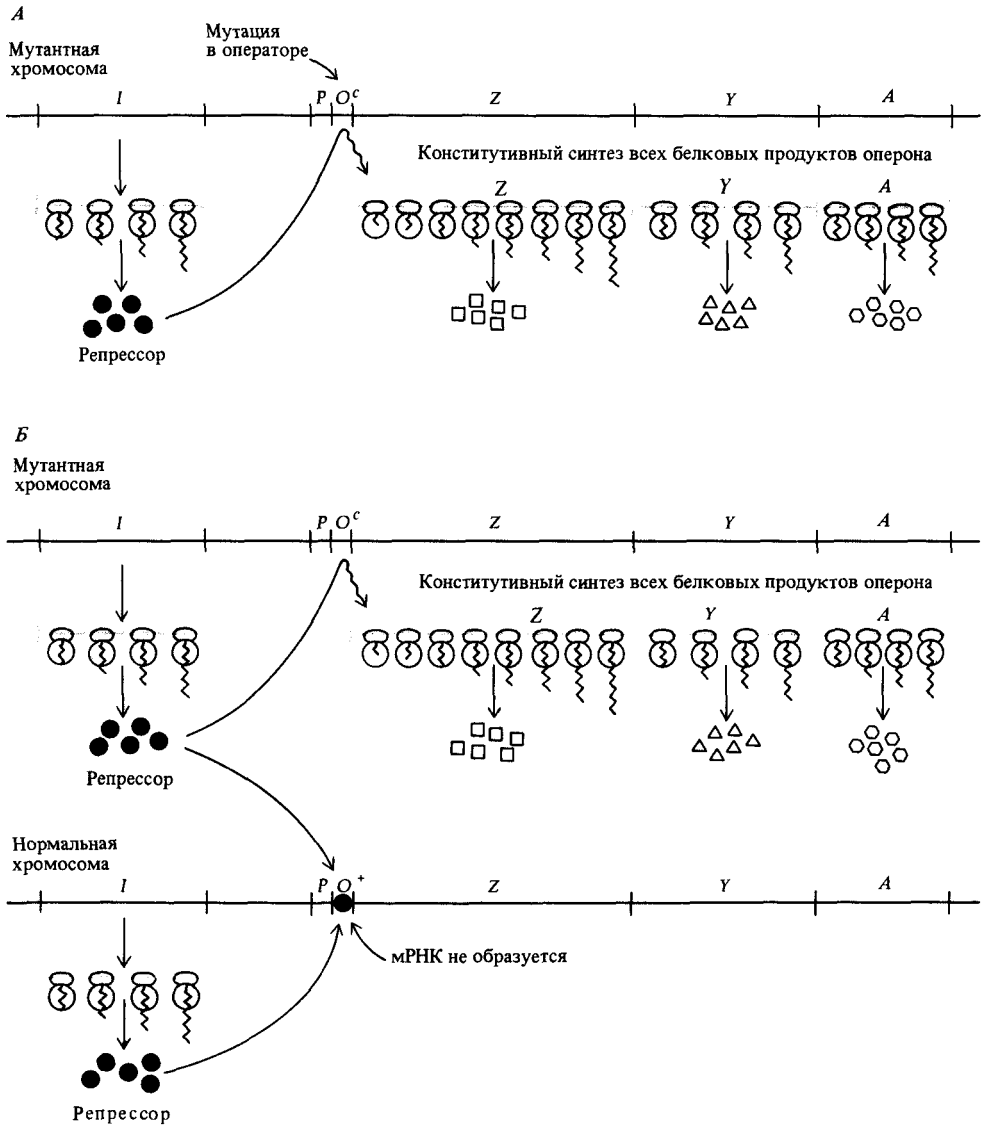


Рис. 15.8. Цис-действие аллелей гена O объясняется влиянием только на собственную хромосому. Ген O в отличие от гена I не кодирует никакого продукта, который мог бы свободно перемещаться внутри клетки и взаимодействовать с другой хромосомой. А. В гаплоидных клетках, содержащих мутантный оператор O^c , не происходит связывания репрессора, вследствие чего происходит свободная транскрипция с приле-

гающего к оператору O^c промотора. Б. В гетерозиготном частичном диплоиде (O^+/O^c) ген O^c проявляется как доминантный. В отсутствие индуктора транскрипция происходит на хромосоме, содержащей O^c , но не на хромосоме, содержащей O^+ . Фенотипическим проявлением как гаплоидных, так и частично диплоидных клеток, несущих мутантный ген O^c , является конститутивный синтез фермента.

сказываются на β -галактозидазной активности. Такой *полярный эффект nonsense*-мутаций, согласно представлениям Жакоба и Моно, указывает на то, что транскрипция и трансляция полицистронной мРНК происходят в направлении $Z-Y-A$, а единственный промоторный участок находится слева от гена Z . Полярное влияние *nonsense*-мутаций часто наблюдается для оперонов, транскрибируемых с образованием полицистронных мРНК. Механизм реализации полярного влияния *nonsense*-мутаций в одном гене на экспрессию примыкающих к нему генов дикого типа будет рассмотрен нами несколько позже.

На сегодняшний день оперонная теория получила весьма детальное экспериментальное подтверждение. Удалось выделить репрессор в чистом виде и показать, таким образом, что он действительно имеет белковую природу. Была определена аминокислотная последовательность белка-репрессора, которая, как оказалось, полностью совпадает с последовательностью, предсказанной на основании определения нуклеотидной последовательности гена I . Была также установлена нуклеотидная последовательность регуляторных участков *lac*-оперона, промоторного и операторного (рис. 15.9), локализованы мутации в этих участках. Показано, что очищенный репрессор в отсутствие индуктора действительно связывается с изолированным операторным фрагментом ДНК. Репрессор также связывается с индуктором, при этом происходит аллостерическое изменение его пространственной структуры, приводящее к значительному ослаблению связи репрессора с операторной областью ДНК.

На примере *lac*-репрессора, как на модели, было изучено такое важное явление, как специфическое связывание регуляторного белка с регуляторной областью ДНК. Этот феномен лежит в основе практически всех систем контроля экспрессии генов. Из всей ДНК *E. coli*, состоящей из $3,2 \cdot 10^6$ п.н., *lac*-репрессор узнает и прочно связывается только с одной операторной последовательностью, имеющей длину лишь 24 п.н. (рис. 15.10). Операторная последовательность включает симметричный палиндромный участок протяженностью 16 п.н. Палиндромными называют последовательности, которые по каждой из цепей (с наблюдением полярности) считываются одинаково как слева направо, так и справа налево.

Активный *lac*-репрессор представляет собой тетрамер, построенный из четырех идентичных полипептидных цепей, кодируемых геном *lac I*. Каждая цепь содержит 360 аминокислотных остатков. Реализация двух аспектов функционирования репрессора – связывание с ДНК и связывание с индуктором – определяется двумя различными участками структуры цепи. В связывании тетрамерного репрессора с ДНК основную роль играет N-концевая последовательность, содержащая около 50 аминокислотных остатков.

Каждая из двух частей операторного палиндрома связывается с одной из четырех субъединиц тетрамерного репрессора. Взаимодействие с репрессором является кооперативным – связывание одной субъединицы усиливает связывание другой. Расположение обеих пар, образуемых четырьмя субъединицами репрессора, характеризуется симметрией второго порядка. Таким образом, каждая пара может кооперативно связываться с палиндромным участком (рис. 15.10).

Генетические свидетельства в пользу кооперативного характера связывания репрессора были получены при изучении некоторых мута-

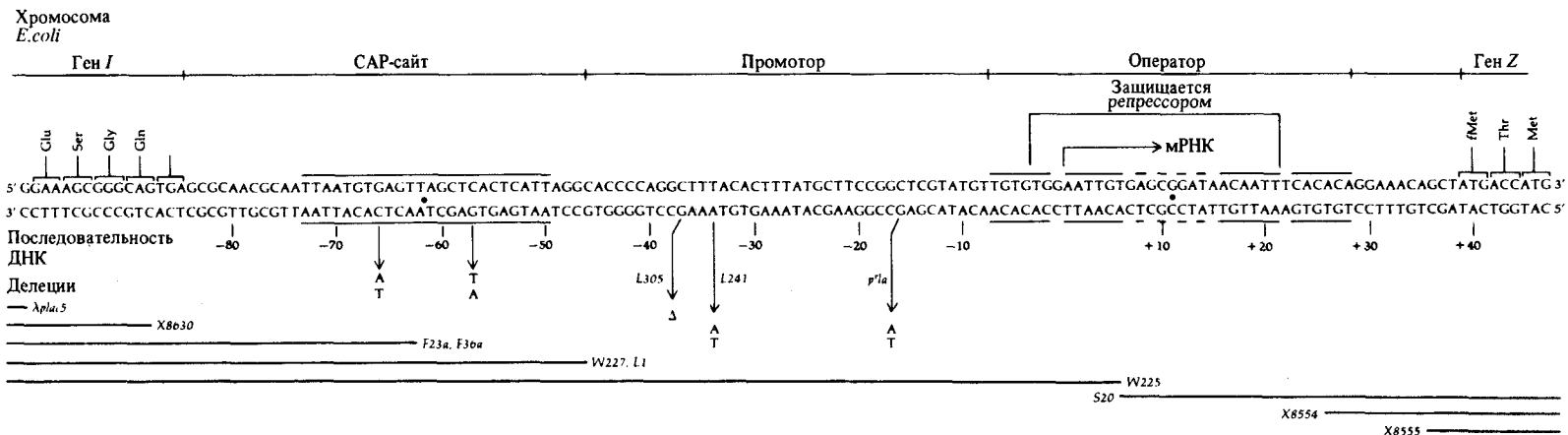


Рис. 15.9. Нуклеотидная последовательность регуляторной области *lac*-оперона *E. coli*. По известной аминокислотной последовательности репрессора и β -галактозидазы можно идентифицировать кодирующие участки генов *I* и *Z*. Идентификация операторного и промоторного участков основана на локализации последовательностей, которые защищаются от ферментативной деградации при связывании с репрессором и РНК-полимеразой соответственно. Делеции или точечные мутации, изменяющие ту или иную функцию, локализуются в определенных участках последовательности, что позволяет провести дальнейшее соотнесение структуры и функций. Точечные замены в положениях -57 и -66 в области CAP-сайта проявляются в фенотипе *lac*⁻, вероятно препятствуя кооперативному связыванию пары димеров CAP-белка с соответствующей симметричной последовательностью (подчеркнута с обеих сторон). (По Reznikoff W.S., Abelson I.N., 1978. In *The Operon*, ed. by J.H. Miller, W. S. Reznikoff, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y. и O'Neill M.C. et al., 1981. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78, 2213.)

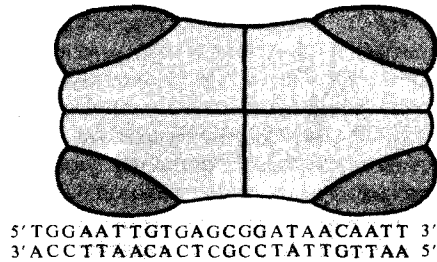


Рис. 15.10. Нуклеотидная последовательность ДНК, связывающаяся с *lac*-репрессором. Оттенены палиндромные последовательности, расположенные симметрично вокруг оси вращения (цветная точка). С этими симметричными последовательностями связываются две субъединицы тетрамерного репрессора.

ций I^- , обозначаемых I^{-D} . Конститутивные мутации I^{-D} подавляют способность репрессора связываться с операторной ДНК. В частичных диплоидах они ведут себя как доминантные – генотипу I^{-D}/I^+ соответствует конститутивный фенотип. Доминантность этих мутаций реализуется за счет образования смешанных тетрамеров. Смешанная пара, состоящая из мутантной и нормальной субъединицы, утрачивает способность к кооперативному связыванию с ДНК и соответственно к подавлению транскрипции.

Все мутации I^+ картируются на участке гена *I*, кодирующем N-концевую область полипептида, т.е. ту область, которая непосредственно связывается с ДНК. С другой стороны, репрессор, продуцируемый мутантными клетками I^- , способен нормально связываться с индуктором. Это означает, что участок связывания с индуктором локализуется вне N-концевой области репрессора. Такое представление подтверждается при рассмотрении мутаций *I* другого типа I^S , которые проявляются в фенотипе *суперрепрессии*. В клетках I^S репрессор связывается с оператором независимо от присутствия индуктора. Все мутации этого типа картируются в гене *I* вне области, кодирующей 50 N-концевых аминокислотных остатков репрессора. Таким образом, можно полагать, что *lac*-репрессор содержит два функционально различных домена.

Представления о доменной организации молекулы репрессора были подтверждены с помощью биохимических методов. При обработке очищенного нативного репрессора протеолитическим ферментом трипсином N-концевые полипептиды отщепляются от тетрамерного «кора». Оставшийся после этого кор-белок может связывать индуктор, но не способен связываться с ДНК. Таким образом, N-концевые участки полипептидных цепей (протяженностью около 50 аминокислотных остатков), вероятно, выступают за пределы относительно компактного тетрамерного кора и могут «внедряться» в бороздки двойной спирали ДНК, узнавать и прочно связываться с операторной последовательностью. Как мы убедимся в дальнейшем, такой способ структурно-функциональной организации характерен для многих белков, специфически узнающих определенные последовательности ДНК.

Взаимодействие очищенного *lac*-репрессора с ДНК подробно изучено *in vitro*. Для оценки прочности связывания белка как с операторной, так и с любой другой ДНК можно пользоваться значением кон-

станты диссоциации, определяемой по закону действующих масс как

$$K = \frac{[O][R]}{[OR]},$$

где $[O]$, $[R]$, $[OR]$ —это молярные концентрации операторной ДНК, репрессора и комплекса оператор—репрессор соответственно. Для оператор-репрессорного комплекса значение K составляет величину порядка 10^{-13} М, что свидетельствует о высокой прочности этого комплекса. Исходя из этих данных становится ясно, почему присутствие всего лишь десяти молекул репрессора в клетке оказывается достаточным для полной репрессии *lac*-оперона.

Репрессор обладает также достаточно высоким сродством и к неоператорной ДНК. Так, с *poly-d(AT)* он связывается с константой диссоциации около 10^{-8} М. На прочности связывания с неоператорной ДНК присутствие индуктора никак не сказывается. Эти данные указывают на то, что в клетке новосинтезированные молекулы репрессора, а также комплексы репрессор—индуктор всегда связаны с ДНК. Тетрамеры репрессора, судя по всему, отыскивают операторную последовательность скорее с помощью линейной диффузии, или «скольжения», по хромосоме, чем посредством обычной пространственной диффузии в цитозоле. Ясно, что первый способ поиска должен быть намного оперативнее второго (рис. 15.11). Именно потребности быстрого поиска, по-видимому, объясняют особую выгоду палиндромного строения операторной последовательности, которая в этом случае может быть идентифицирована репрессором при продвижении по хромосоме с любой стороны. Модель поиска оператора *lac*-репрессором, основанная на представлении

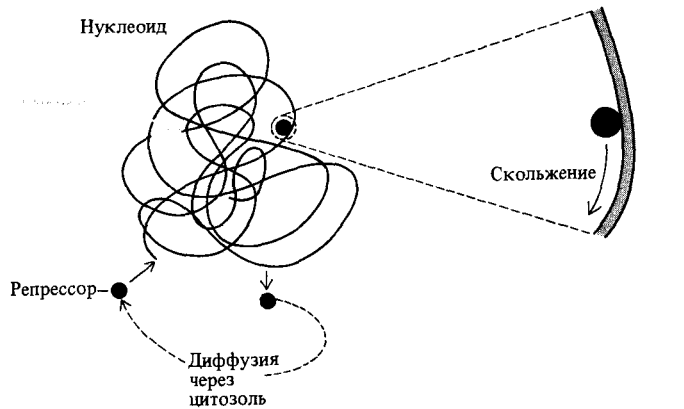
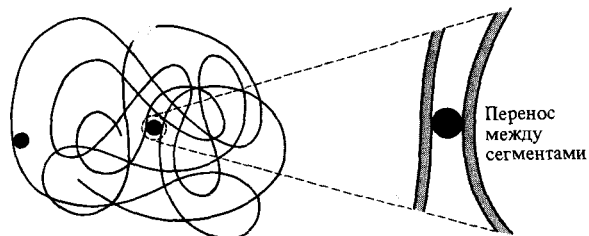


Рис. 15.11. Схематическое изображение процесса поиска *lac*-репрессором области *lac*-оператора на хромосоме *E. coli*, организованной в тесно сплетенный клубок—нуклеоид. Подробности—в тексте.



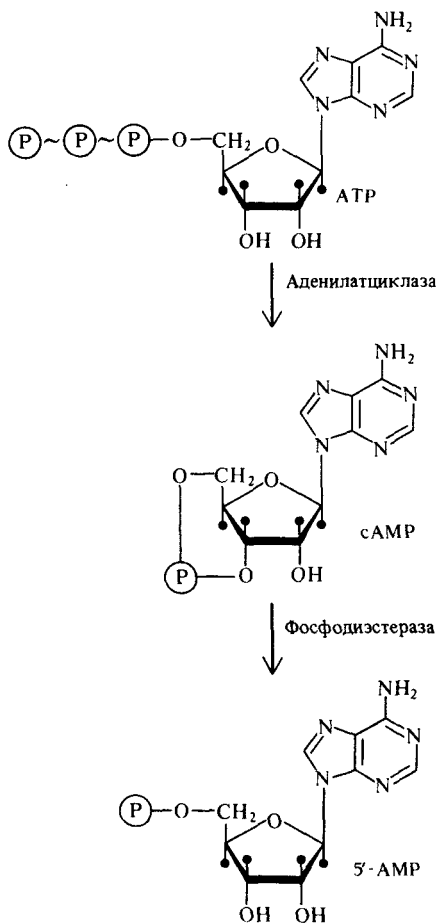
о скольжении по хромосоме, помогает понять также выгоду тетрамерной структуры, которая характерна для репрессора, несмотря на то, что собственно с ДНК связываются только две из четырех субъединиц белка. Как известно, хромосома *E. coli*, имеющая колоссальный линейный размер, в действительности очень сплетена в очень компактный клубок-нуклеоид. Кроме того, с ДНК связано множество различных белков, которые также могут препятствовать свободному скольжению *lac*-репрессора. Наличие у связанного с ДНК репрессора «лишней» пары свободных субъединиц может способствовать его перемещению от одного сегмента ДНК к другому и таким образом облегчать доступ к искомой операторной области (рис. 15.11).

Катаболитная репрессия

Lac-репрессор служит типичным примером белка-негативного регулятора, при действии которого подавляется экспрессия контролируемых им генов. Действие репрессора в свою очередь контролируется низкомолекулярными эффекторами-в данном случае аллолактозой. В действительности *lac*-оперон находится также под контролем белка-позитивного регулятора, вовлеченного одновременно в регуляцию целого ряда различных катаболитных систем *E. coli*. Действие этого позитивного регулятора опосредованно контролируется оптимальным источником углерода-глюкозой. Глюкоза ингибирует транскрипцию генов *lac*-оперона даже в присутствии лактозы, причем в штаммах I^- и O^c в той же степени, что и в диких штаммах. Это означает, что действие глюкозы не влияет непосредственно на взаимодействие репрессора и оператора. Действие глюкозы реализуется через посредника, в роли которого выступает *циклический АМР (сАМР)*. Содержание сАМР внутри клетки контролируется с помощью двух уравнивающих друг друга процессов-синтеза при участии аденилатциклазы и деградации под действием фосфодиэстеразы (рис. 15.12). В отсутствие глюкозы наблюдается высокий, а в ее присутствии-низкий уровень сАМР в клетке. Механизм, благодаря которому содержание глюкозы в клетке контролирует уровень сАМР, неизвестен. Тем не менее не вызывает сомнений, что сАМР служит в качестве эффектора, отражающего этот аспект клеточного метаболизма.

Изучение мутантов, неспособных к активации катаболитных функций, позволило выявить механизм влияния сАМР на транскрипцию генов *lac*-оперона. Обнаружены два типа такого рода мутаций. Мутации первого типа приводят к инактивации аденилатциклазы (рис. 15.12). Мутации второго типа инактивируют белок-активатор катаболитных генов (или сАР-белок от англ. *catabolite activator protein*), связывающий сАМР. Мутанты этого типа можно отобрать благодаря тому, что они неспособны утилизировать одновременно два различных типа сахаров (в частности, лактозу и глюкозу) в качестве источников углерода. Оказалось, что мутации, подавляющие обе функции одновременно, картируются в генах, отличных от тех, которые входят в состав какого-либо из соответствующих оперонов, но необходимых для экспрессии обоих оперонов и утилизации как лактозы, так и галактозы.

Рис. 15.12. Регуляция содержания циклического АМР (сАМР) в клетке может осуществляться как на уровне синтеза из АТР, так и на уровне деградации до 5'-АМР. На каком из этих этапов осуществляется регуляция сАМР, связанная с содержанием глюкозы, неизвестно.



Изучение транскрипции генов *lac* *in vitro* с использованием *lac*-оперона, встроенного в ДНК трансдуцирующего фага λ , очищенной РНК-полимеразы и очищенного CAP-белка, показало, что CAP-белок стимулирует транскрипцию только в виде комплекса с сАМР. Участок связывания комплекса CAP—сАМР примыкает к промотору *lac*, о чем свидетельствует отсутствие влияния сАМР на транскрипцию мутантного *lac*-оперона, содержащего делецию *L1* на участке от гена *I* до промотора, которая в то же время не сказывается на связывании с промотором РНК-полимеразы. Участок связывания CAP-белка содержит последовательность, характеризующуюся симметрией второго порядка. Точечные мутации в этой последовательности подавляют способность комплекса CAP—сАМР активировать промотор (рис. 15.9). CAP-белок представляет собой димер и состоит из двух идентичных субъединиц, содержащих по 209 аминокислотных остатков. Считают, что активация РНК-полимеразы происходит в результате кооперативного связывания двух димеров CAP—сАМР с инвертированными участками последовательности в вышеупомянутой области симметрии. В то же время некоторые другие опероны содержат лишь один центр связывания CAP-бел-

ка и не содержат симметричных последовательностей. Поэтому для их активации необходимо участие только одного димера CAP—сAMP.

Для интерпретации активирующего действия комплекса CAP—сAMP были предложены две модели. В одной из них предполагается, что CAP—сAMP, связанный с ДНК, взаимодействует непосредственно с РНК-полимеразой, что облегчает образование так называемого открытого комплекса фермента с промоторной областью ДНК. При этом исходят из того, что РНК-полимераза сама по себе эффективно образовывать такой комплекс не может. Другая модель построена на представлении о том, что CAP—сAMP при связывании изменяет структуру самого промотора, который после этого оказывается способным взаимодействовать с РНК-полимеразой. Имеется ряд аргументов в пользу каждой из этих моделей, и не исключено, что активация транскрипции CAP-белком в различных оперонах может осуществляться разными способами.

Подводя итоги, можно отметить, что для регуляции экспрессии *lac*-операона используются два типа контролирующих факторов, каждый из которых в свою очередь находится под влиянием условий среды. Взаимодействие репрессор—оператор можно назвать регуляцией по принципу «все или ничего». В клетке присутствует всего лишь около 10 молекул репрессора, которые быстро инактивируются даже при низких концентрациях индуктора—производного лактозы. Система взаимодействия комплекса CAP—сAMP с соответствующим центром связывания дает возможность более плавно регулировать частоту инициации транскрипции. При низкой концентрации сAMP эта частота невелика, поскольку большинство молекул белка-активатора CAP неактивны. При повышенном уровне сAMP значительная доля белка существует в форме комплекса CAP—сAMP, заметно повышающего частоту инициации транскрипции генов операона.

Бактериофаг λ

Бактериофаг λ оказался настоящей сокровищницей систем генетической регуляции, изучение которых позволило заметно расширить и углубить наши представления о механизмах генетической регуляции у прокариот. В процессе литического развития гены фага λ (см. гл. 7) регулируются таким образом, чтобы обеспечивать контролируемую репликацию ДНК, рекомбинацию, синтез структурных белков и сборку частиц потомства фага. В то же время лизогенам по фагу λ присущ иной способ экспрессии генов. В лизогенных бактериях репрессированы все гены профага, используемые при литическом развитии, и экспрессируется только один ген, обозначаемый *cI*, который контролирует репрессию генов профага. Экспрессия гена *cI* в лизогенах обеспечивает также иммунитет клетки к повторной инфекции другим фагом λ .

Ключевой вопрос регуляции развития фага λ состоит в том, каким образом принимается решение о выборе между лизогенным и литическим путем развития после инфекции чувствительных клеток. Изучение механизма такого выбора привело генетиков к открытию многих важных особенностей физиологии бактерий и организации систем генетической регуляции. Развитие представлений о регуляции генов фага λ происходило параллельно с изучением регуляции экспрессии генов

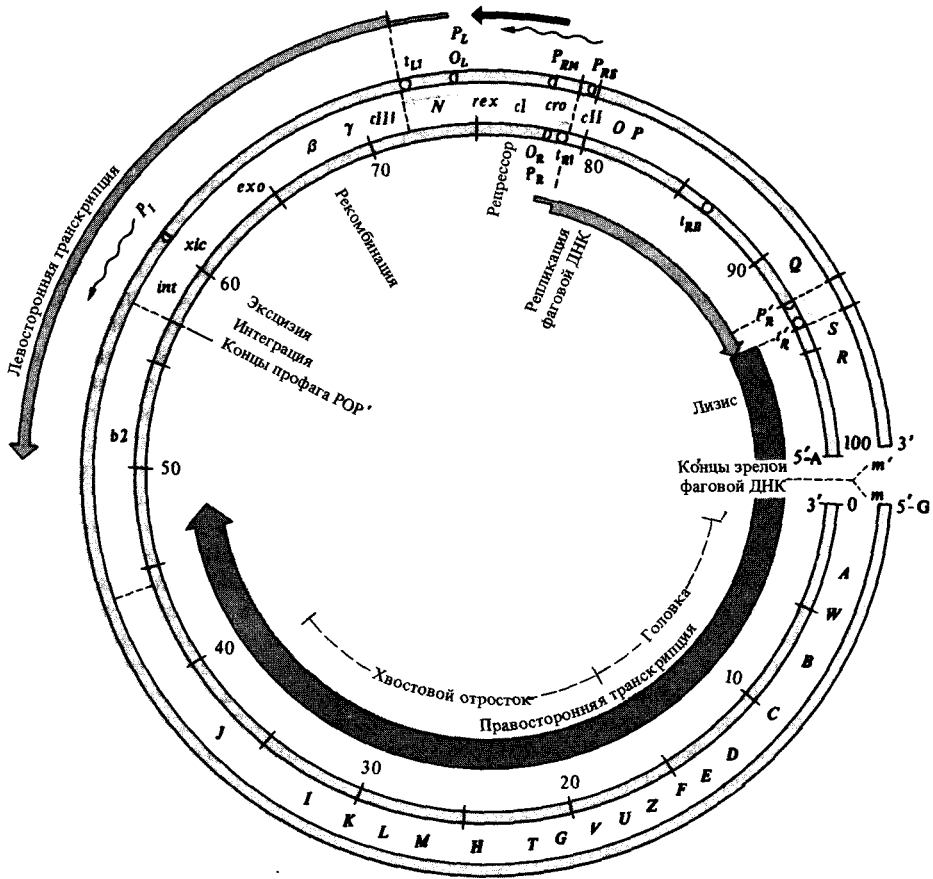


Рис. 15.13. Карта ДНК фага λ ; показано положение регуляторных участков и транскрибируемых зон. Три цветные стрелки указывают на стадию транскрипции, которая начинается с промоторов P_R , P_L , P'_R и заканчивается на терминаторах t_{LI} , t_{RI} и t'_R . Светло-серыми стрелками отмечена стадия транскрипции, протекающая в присутствии

антитерминаторного белка N, а темно-серыми стрелками – III стадия, протекающая в присутствии антитерминаторного белка Q. Волнистыми стрелками обозначена транскрипция под контролем белка cII, черной стрелкой – транскрипция гена cI с промотора P_{RM} .

утилизации лактозы. В обоих случаях было найдено, что структурные гены организуются в опероны, экспрессия которых контролируется репрессорами. Большая сложность фага λ позволила гораздо глубже понять механизмы генетической регуляции.

Рассмотрим вначале порядок экспрессии генов фага λ после попадания ДНК инфицирующего фага в чувствительную клетку. В экспрессии фаговых генов можно выделить три стадии, причем каждая последующая стадия зависит от предшествующей. На стадии I, которая начинается сразу после инфекции, РНК-полимераза инициирует транскрипцию с трех промоторов: P_L и P_R , с каждой стороны от гена cI , а также с P'_R , расположенного между генами Q и S (см. рис. 15.13, желтые стрелки). Это короткие транскрипты, которые терминируются

на ρ -зависимых терминаторах t_{LI} , t_{RI} и t'_R . In vitro, в отсутствие фактора ρ , очищенная РНК-полимераза инициирует синтез тех же самых транскриптов на очищенной ДНК фага λ , причем поток транскрипции преодолевает терминаторы. Это наблюдение привело к представлению о существовании специфических факторов терминации. В результате был очищен так называемый ρ -белок, индуцирующий терминацию транскрипции in vitro на упомянутых терминаторах (не все терминаторы *E. coli* являются ρ -зависимыми).

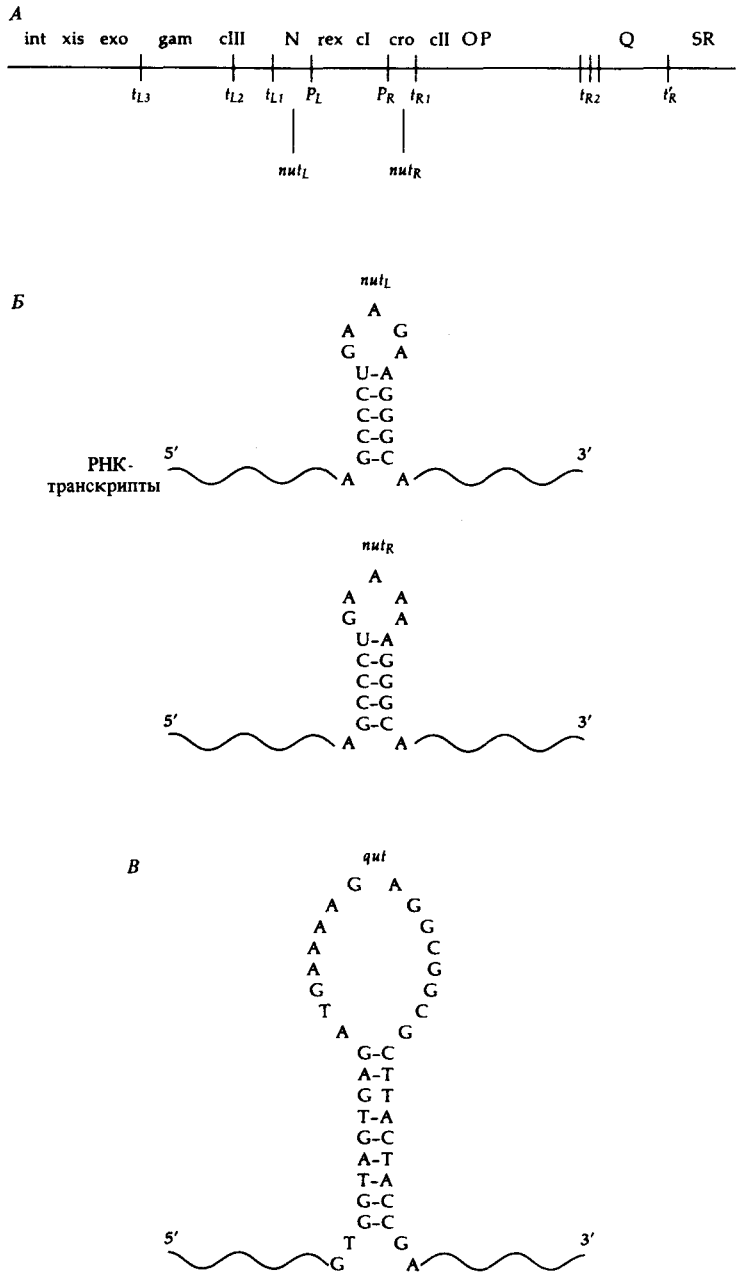
Транскрипция на стадии I приводит к появлению мРНК для двух белков N и Sgo (названия белков набраны прямым шрифтом, а названия генов – курсивом). Функционируя как фактор антитерминации, белок N создает возможность экспрессии генов второй стадии. В присутствии белка N поток транскрипции, инициированный на P_L и P_R , преодолевает ρ -зависимые терминаторы t_{LI} и t_{RI} . В результате появляется мРНК от гена *cIII* до гена *int* в левом опероне и от гена *cII* до *Q* в правом опероне. Транскрипция правого оперона прекращается на терминаторе t'_R , а транскрипция левого оперона прекращается в области b_2 (рис. 15.13, светло-серые стрелки). Мутанты, дефектные по функции гена *N*, гибнут из-за очень сильного снижения уровня транскрипции на стадии II, в результате которого гены, существенные как для лизиса, так и для лизогенезиса, не экспрессируются.

Белок N служит позитивным белком-регулятором, поскольку благодаря его действию происходит активация второй стадии экспрессии фага λ . В то же время принцип его действия совершенно не похож на принцип действия рассмотренного в предыдущем разделе другого позитивного регулятора – CAP-белка. Белок N, по сути дела, не активировывает транскрипцию, а способствует ее продолжению, подавляя влияние терминирующих последовательностей. При этом белок N специфически узнает не промотор и не сам терминатор, а определенный участок последовательности, расположенный между этими регуляторными элементами. При изучении мутантов, неспособных к экспрессии генов левого оперона, расположенных за терминаторным участком t_{LI} , и в то же время способных нормально расти и образовывать биопленки на чувствительном бактериальном газоне, был обнаружен сайт, расположенный между P_L и *N* и необходимый для действия белка N. Этот участок (рис. 15.14, А) обозначают символом nut_L (от англ. *N utilization*). Определение первичной структуры этого участка показало, что в него входит последовательность из 15 п.н., которой свойственна симметрия второго порядка. Анализ последовательности ДНК между P_R и t_{RI} показал, что между геном *cro* и t_{RI} находится практически идентичный участок, обозначенный nut_R [рис. 15.14, Б]. Принято считать, что белок N узнает участки nut_L и nut_R ; однако, происходит ли это узнавание при взаимодействии с ДНК или с петлей, образующейся в соответствующем участке РНК-транскрипта, пока остается неизвестным.

В соответствии с современными представлениями о механизмах терминации и антитерминации транскрипции определенное предпочтение можно отдать модели, согласно которой происходит узнавание петли в структуре РНК-транскрипта прежде, чем РНК-полимераза достигает терминаторного участка.

Независимо от конкретных деталей механизма действия N-белка ясно, что он влияет на РНК-полимеразу таким образом, что та после про-

Рис. 15.14. А. Положение известных участков действия белка N-*nut*_L и *nut*_R-и терминаторов на генетической карте фага λ. Б. Вторичная структура РНК, образующаяся при транскрипции участков *nut*_L и *nut*_R. В. Вторичная структура РНК, образующаяся при транскрипции участка *quit*.



хождения через сайт *nut* перестает «обращать внимание» на все последующие терминаторные участки. Другими словами, благодаря действию N-белка возникает своего рода «безостановочная» (*juggernaught*) полимеразы, которая, как было показано, осуществляет транскрипцию, минуя как р-зависимые, так и р-независимые терминаторы и в ДНК фага λ, и в хромосоме *E. coli*. Единственный известный терминатор, спо-

собный остановить транскрипцию, направляемую такой «безостановочной» РНК-полимеразой, это терминатор t'_R , предшествующий области локализации поздних генов фага λ , транскрибируемых на III стадии процесса фагового развития (рис. 15.13). Особые свойства этого терминатора имеют очевидное физиологическое значение.

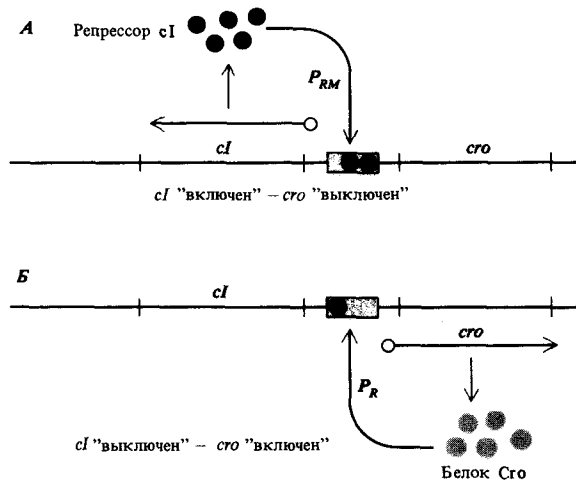
Транскрипционные процессы, протекающие на второй стадии развития фага, приводят к экспрессии гена Q . Продукт этого гена необходим для начала транскрипции на III стадии. В нее вовлечены все поздние гены, которые требуются для сборки фаговых частиц и лизиса клетки. Белок Q , подобно белку N , активирует экспрессию генов, выступая в роли антитерминатора, благодаря действию которого транскрипция, инициируемая с промотора P'_R , может продолжиться за терминаторный участок t'_R (рис. 15.13, *темно-серая стрелка*). Считают, что белок Q действует на участке *qut*, локализованном между P'_R и t'_R , и модифицирует РНК-полимеразу таким образом, что она не прекращает транскрипцию при встрече с t'_R и другими терминаторами. Так же как и в случае белка N , под влиянием белка Q образуется «безостановочная» РНК-полимераза. Предполагаемая последовательность *qut* содержит 34 п. н. и характеризуется симметрией второго порядка, благодаря которой соответствующий участок РНК-транскрипта может иметь форму петли, изображенной на рис. 15.14, *B*. Однако мутаций, подтверждающих предполагаемую функцию *qut*, пока обнаружено не было.

Разбиение транскрипционных процессов у фага λ на стадии используется для того, чтобы разграничить во времени события, определяющие выбор пути фагового развития – лизогенный путь, связанный с включением репрессированного профага в хромосому клетки-хозяина, или литический путь, приводящий к появлению дочерних фаговых частиц и их высвобождению из клетки при ее лизисе. Выбор пути определяется транскрипционными событиями, разыгрывающимися на II стадии, и если выбирается лизогенизация, то III стадия так и не начинается.

Процессы, необходимые для выбора лизогенного пути развития, контролируются динамикой N -зависимой транскрипции генов *cII* в правом опероне и *cIII* в левом опероне. Мутации, инактивирующие какой-либо из этих генов, предотвращают лизогению и, подобно мутациям *cI*, проявляются в том, что соответствующие мутантные фаги образуют не мутные, а прозрачные бляшки. Белок *cII* является еще одним позитивным регулятором, избирательно активирующим транскрипцию генов, необходимых для развития по пути образования профага и подавления транскрипции левого и правого фаговых оперонов. Этот белок активирует транскрипцию с двух промоторов – P_{RE} (промотор установления репрессии) и P_I (промотор интегразы, см. гл. 14). Транскрипт, образующийся с первого из них, обеспечивает высокий уровень синтеза основного репрессора фага λ , белка *cI*. Второй транскрипт направляет синтез интегразы, необходимой для встраивания ДНК фага в бактериальную хромосому. Эти транскрипты отмечены на рис. 15.13 волнистыми стрелками. Белок *cIII* необходим только для защиты белка *cII* от клеточных протеиназ, которые в отсутствие *cIII* быстро инактивируют *cII*.

Белок *cII* непосредственно активирует промоторы P_{RE} и P_I . Определение нуклеотидной последовательности этих промоторов показало, что они очень похожи между собой и заметно отличаются от других из-

Рис. 15.15. Два взаимно исключаящих варианта транскрипции генов, контролируемой участком O_R . В зависимости от соотношения активностей (концентраций) репрессора cI и белка cro будет устанавливаться и достаточно стабильно поддерживаться один из двух вариантов транскрипции. А. Путь, ведущий к лизогении. Б. Путь, ведущий к образованию фагового потомства и лизису клетки.



вестных промоторов. Они абсолютно лишены сходства с другими промоторами на (-35) -участке связывания с РНК-полимеразой (рис. 15.3). Анализ с помощью «футпринтинга» (см. Дополнение 14.2) показал, что белок cI связывается с (-35) -участком этих промоторов и таким образом, вероятно, восполняет систему контактов, необходимую для образования открытого комплекса РНК-полимеразы с промотором.

Ключевым аспектом выбора пути развития фага является конкуренция белков cI и Cro , синтезируемых на II стадии. «Молчание» профага в лизогенной клетке обеспечивается связыванием белка cI с двумя операторными участками O_L и O_R , перекрывающимися с промоторами P_L и P_R соответственно. Связанный белок cI подавляет транскрипцию с P_L и P_R , препятствуя связыванию РНК-полимеразы с этими промоторами. Более того, при связывании с O_R белок cI одновременно активирует другой промотор P_{RM} (промотор поддержания репрессии), с которого идет транскрипция самого гена cI (рис. 15.13, черная стрелка). При транскрипции с P_{RM} белок cI нарабатывается в количествах, достаточных для поддержания профага в неактивном состоянии неограниченно долго в ходе роста и деления клетки. Интересно, что белок cI таким образом, выступает одновременно в роли как негативного, так и позитивного регулятора.

Белок Cro в свою очередь также способен связываться с операторами O_L и O_R . При этом с O_R он связывается таким образом, что подавляет транскрипцию гена cI с P_{RM} , но в то же время допускает транскрипцию правого оперона с P_R . Таким образом, белки Cro и cI обладают реципрокными свойствами, которые, как показано на рис. 15.15, проявляются в виде двух взаимно исключаящих вариантов транскрипции. В варианте «включения» cI и «выключения» cro происходит рекомбинация фаговой ДНК с хромосомой хозяина, и клетка становится лизогенной. В обратном варианте: « cI выключен, cro включен» происходит интенсивная репликация фаговой ДНК, начинается III стадия транскрипции поздних генов и клетка лизирует. Детали взаимодействия белков cI и Cro с областью O_R обсуждаются в Дополнении 15.1.

Единожды установившись, лизогенное состояние может поддержи-

ваться во множестве последующих генераций. Профаг λ реплицируется вместе с хозяйской хромосомой и передается дочерним клеткам как часть родительского генома. Однако если клетка в течение некоторого времени подвергается воздействию агентов, повреждающих ДНК, то происходит индукция профага. Активация протеолитического действия белка RecA приводит наряду с расщеплением репрессоров, контролирующих гены системы SOS-репарации (см. гл. 14), и к расщеплению репрессора cI . После этого начинается транскрипция с промоторов P_L и P_R , которая приводит к наработке белков N и Cro, а затем интегразы и эксцизназы, направляющих рекомбинационное вырезание профага из хромосомы. Белок Cro подавляет транскрипцию с промотора P_{RM} и последующий синтез белка cI . Вслед за этим происходит репликация фаговой ДНК, начинается III стадия транскрипции, которая завершается лизисом клетки и высвобождением фагового потомства. При попадании образовавшегося дочернего фага в чувствительную клетку для него начинается очередной цикл фагового развития.

Дополнение 15.1. Регуляторные белки фага λ - cI и Cro

Изучение молекулярных деталей организации системы «переключения» генетических путей за счет взаимодействия белков cI и Cro с областью O_R значительно расширило наши представления как о механизмах регуляции генов, так и о ДНК-белковых взаимодействиях. В последовательности ДНК между генами cI и cro расположены два противоположно направленных промотора P_{RM} и P_R , а также три структурно близких, но не идентичных палиндромных участка O_{R1} , O_{R2} и O_{R3} (рис. 15.16). С этими тремя участками, образующими вместе операторную область O_R , могут связываться как белок cI , так и белок Cro. Противоположная направленность регуляторных эффектов связывания этих белков с областью O_R является следствием как различий в структуре белков cI и Cro, так и характерных различий в специфичности связывания каждого из них с участками O_{R1} , O_{R2} и O_{R3} . Важнейшие свойства обоих регуляторных белков перечислены в таблице 15.2.

Полипептидная цепь одной субъединицы белка cI содержит 236 аминокислотных остатков. В ее пространственной структуре можно выделить два домена:

N-концевой (остатки 1–92), взаимодействующий с ДНК, и C-концевой домен (остатки 132–236), ответственный за контакт с C-концевым доменом второй субъединицы белка. Участок цепи с 93 по 131 остаток образует перемычку между двумя функциональными доменами, на которой расположен участок атаки протеиназы RecA. В активной форме белок cI представляет собой димер, структура которого поддерживается нековалентными взаимодействиями между C-концевыми доменами двух субъединиц. Оба N-концевых домена связываются кооперативно с палиндромными последовательностями каждого из трех участков O_{R1} , O_{R2} и O_{R3} . При индукции протеиназы RecA расщепляет полипептидную цепь на участке между доменами. В результате этого нарушается кооперативность связывания, что проявляется в значительном снижении сродства индивидуальных N-концевых доменов к центрам связывания в операторной области.

Связывание очищенного димера cI с изолированной ДНК O_R изучали с помощью метода «футпринтинга». Таким образом удалось оценить относительные

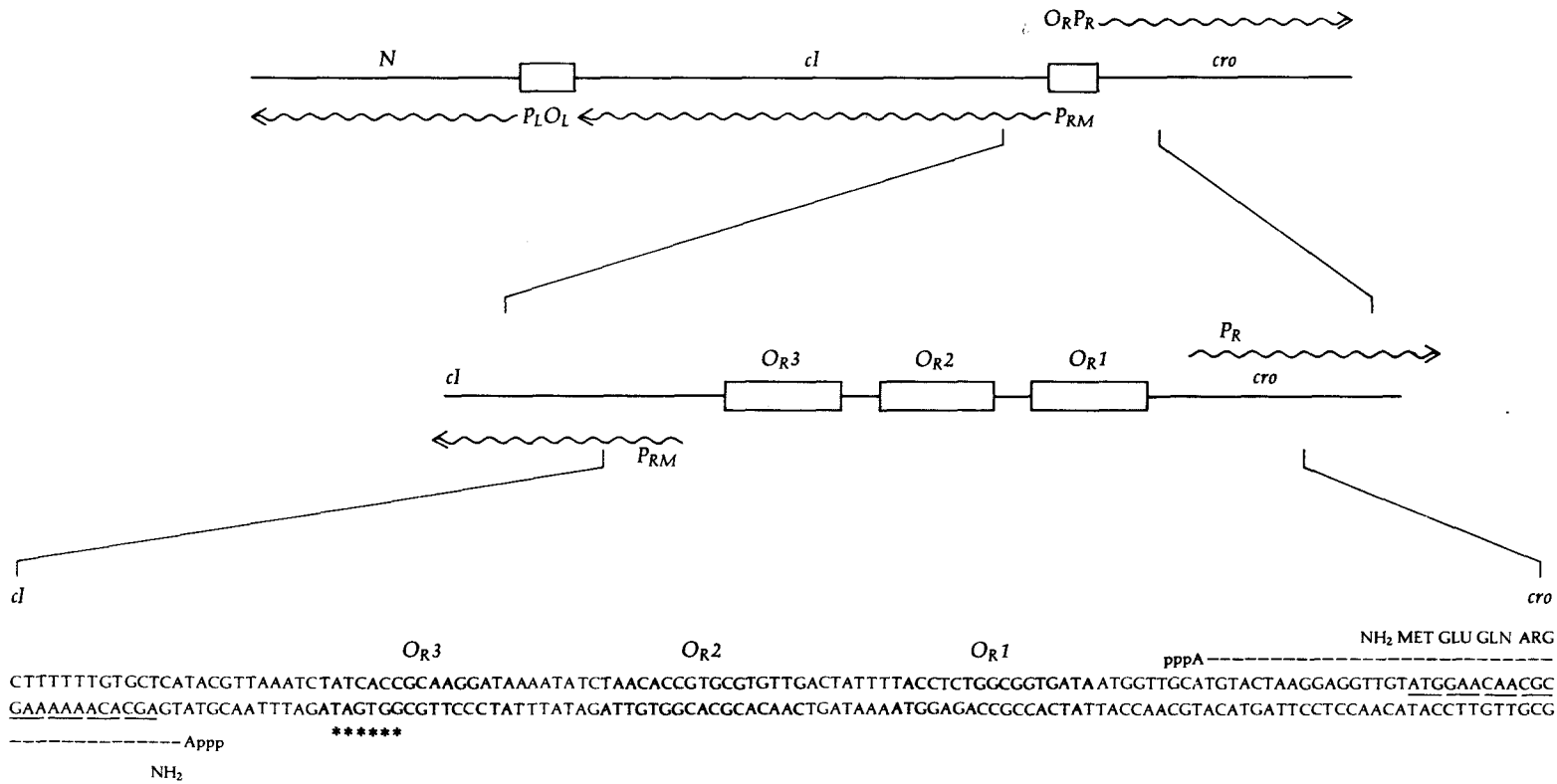
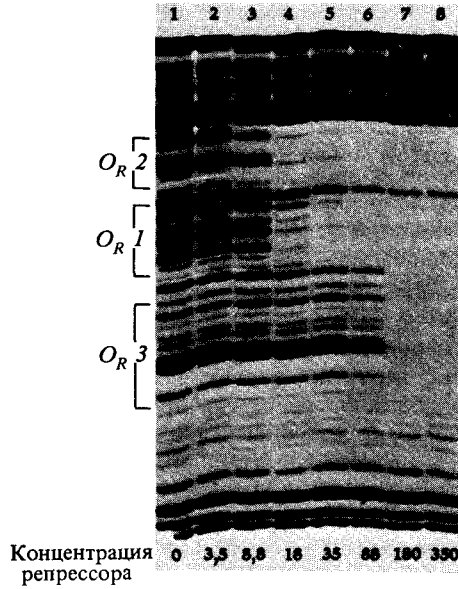


Рис. 15.16. Последовательности ДНК, РНК и белков внутри и вокруг операторной области O_R фага λ . Отмечены три участка связывания репрессора. Показаны точки инициации транскрипции генов *cro* и *cl*. Звездочками помечены шесть оснований на участке O_{R3} , которые в структуре транскрипта гена *cl*, вероятно, используются для прочного связывания с рибосомой. (По Ptashne M. et al., 1980. Cell. 19, 1.)

Рис. 15.17. Специфичность связывания репрессора cI фага λ с последовательностями O_R1 , O_R2 и O_R3 , оцениваемая с помощью «футпринтинга» (см. Дополнение 14.2). Расщепление ДНКазой I рестриционных фрагментов, содержащих область O_R и меченых ^{32}P . Расщепление проводили в присутствии возрастающих концентраций репрессора. Концентрация репрессора дана в единицах молярности (нМ) в расчете на 1 субъединицу репрессора. (Courtesy of A. D. Johnson, B. J. Meyer, M. Ptashne, Biological Laboratories, Harvard University.)



значения концентрации cI , при которых каждый из трех центров связывания белка защищается от действия ДНКазы I. Как показано на рис. 15.17, при низких концентрациях cI приблизительно в равной степени защищаются участки O_R1 и O_R2 . Для защиты участка O_R3 необходима значительно более высокая концентрация белка cI . В таблице 15.3 приведены относительные значения концентрации cI , при которых для каждого из участков связывания наблюдается защита половины операторов от действия ДНКазы.

Аналогичные опыты были поставлены с очищенным N-концевым доменом cI , полученным с помощью ограниченного протеолиза. Обратите внимание на данные, представленные в таблице 15.3, которые свидетельствуют о том, что для изолированного N-концевого домена в отличие от нативного белка наблюдается сильное сродство к участку O_R1 и приблизительно одинаковое, более слабое сродство к обоим участкам O_R2 и O_R3 . Наблюдаемые различия в поведении белка по отношению к участку O_R2 указывают на возмож-

Таблица 15.2. Свойства белков, продуктов генов cI и cro фага λ

Белок	cI	Cro
Величина субъединицы	236 аминокислот	66 аминокислот
Активная форма	Димер	Димер
Относительное сродство к центрам связывания	$O_R1 \approx O_R2 > O_R3$	$O_R3 > O_R2 \approx O_R1$
Кооперативное связывание димеров	Есть	Нет
Негативная регуляция на:	P_R и P_{RM}	P_{RM}
Позитивная регуляция на:	P_{RM}	

Таблица 15.3. Относительные концентрации белков, необходимые для защиты различных участков области O_R от расщепления ДНКазой I

Белок	O_{R3}	O_{R2}	O_{R1}
cI (нативный димер)	25	2	1
cI (N-концевой домен)	82 500	82 500	3 300
Cro	1	8	8

По Johnson A. D., Meyer B., Ptashne M. (1979). Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 5061.

ное участие С-концевых доменов нативного белка cI в обеспечении кооперативного связывания димеров с O_{R1} и O_{R2} . Такая кооперативность, вероятно, играет важную роль в поддержании репрессии профага. Как известно, связывание белка cI с оператором O_R предотвращает инициацию транскрипции с промотора P_R , но не мешает транскрипции с P_{RM} , благодаря которой поддерживается необходимый уровень синтеза самого белка cI. Моделирование процессов связывания дает основания предполагать, что в результате связывания димеров cI с участками O_{R1} и O_{R2} один из N-концевых доменов белка на участке O_{R2} может контактировать с РНК-полимеразой, связанной с P_{RM} (рис. 15.18). Не исключено, что такой контакт может оказаться необходимым для образования открытого комплекса между полимеразой и P_{RM} . В этом случае белок cI будет выступать в роли позитивного регулятора транскрипции с P_{RM} . Обнаружены мутации, изменяющие отдельные аминокислотные остатки в N-концевом домене белка cI, которые не сказывались на способности белка связываться с ДНК,

но подавляли его способность к активации транскрипции с P_{RM} . Структурные исследования белка cI показали, что эти аминокислотные остатки действительно расположены в области возможных контактов с РНК-полимеразой (рис. 15.18). Таким образом, при связывании с O_{R1} и O_{R2} белок cI стимулирует дальнейшую работу этого белка. В то же время при высоких концентрациях cI он может связываться также и с участком O_{R3} (см. табл. 15.3), что приводит к подавлению транскрипции с P_{RM} . Следовательно, белок cI, изначально получивший название λ -репрессора, в действительности может играть как позитивную, так и негативную роль в регуляции своего собственного синтеза и в то же время служить негативным регулятором транскрипции с промотора P_R .

Эксперименты по защите от расщепления ДНК в присутствии белка Cro показали, что этот димерный белок при низких концентрациях связывается преимущественно с O_{R3} , а при высоких концентрациях может связываться также с O_{R2} и

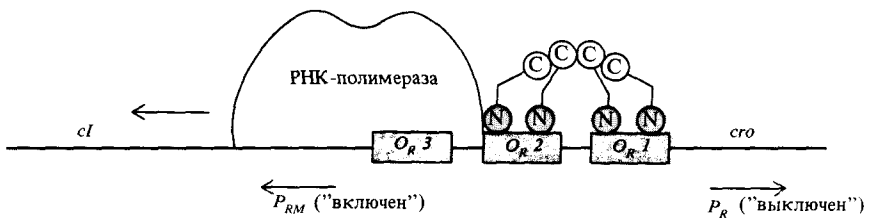


Рис. 15.18. Схема, иллюстрирующая связывание двух димеров репрессора фага λ с участками O_{R1} и O_{R2} . N-концевой домен субъединицы репрессора, расположенной с левого края, контактирует с РНК-полимеразой и облегчает инициацию транскрипции с P_{RM} . (Courtesy of Leonard Guarente, Jeffrey S. Nye, Ann Hochschild, and Mark Ptashne, Biochemistry Department, Harvard University)

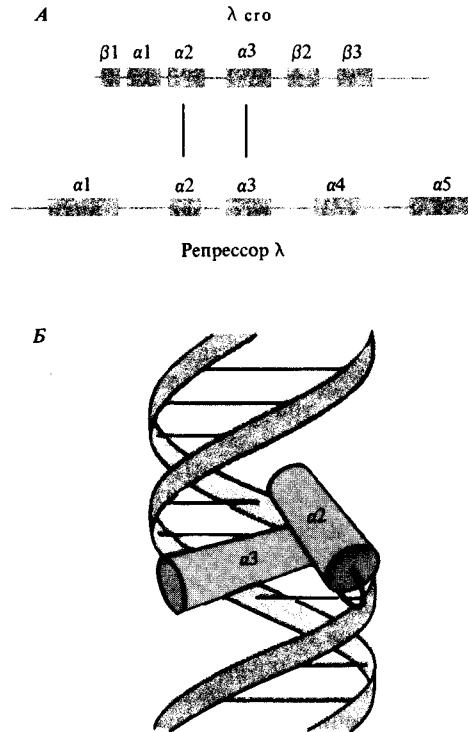
O_R1 , не проявляя кооперативности в связывании димеров с соседними центрами связывания (см. табл. 15.3). Это позволяет считать, что в физиологических условиях *in vivo* белок Cro связывается только с O_R3 , блокируя транскрипцию с P_{RM} , но не препятствуя инициации транскрипции с промотора P_R . Таким образом, альтернативная транскрипция с промоторов P_R или P_{RM} контролируется относительным содержанием белков Cro и cI и особенностями их специфического взаимодействия с центрами связывания в области O_R .

Молекулярные основы узнавания регуляторными белками определенных участков ДНК удалось во многом прояснить благодаря кристаллизации и рентгеноструктурному анализу трех важнейших белков-регуляторов: белка Cro, ДНК-связывающего домена белка cI и CAP-

белка *E. coli*. Несмотря на совершенно различные аминокислотные последовательности, эти белки обладают очень схожей вторичной и третичной структурой на участках, ответственных за связывание с ДНК. В каждом из этих белков имеются два соседних α -спиральных участка, расположенные в пространстве один над другим и образующие область структуры, непосредственно связывающуюся с ДНК. Часть этой структурной области точно входит в большую бороздку В-формы ДНК.

Относительное расположение аминокислотных остатков, образующих вышеупомянутые α -спирали в белках Cro и cI, показано на рис. 15.19, А. Положение этих α -спиралей в общей пространственной структуре белков показано на рис. 15.19, Б. Аминокислотные остатки вблизи N-концов обеих α -спиралей образуют кон-

Рис. 15.19. Регуляторные белки, связывающиеся с ДНК, обладают общими структурными особенностями. А. Вторичная структура белка cro и субъединицы репрессора cI характеризуются наличием пары одинаково расположенных α -спиральных участков ($\alpha 2$ и $\alpha 3$). Б. Ориентация пары α -спиралей обеспечивает точное структурное соответствие размерам и форме большой бороздки двойной спирали ДНК, где происходит специфическое взаимодействие определенных оснований и аминокислотных остатков. Таким образом, достигается специфичность связывания белка с определенной последовательностью ДНК. (По Sauer R. T. et al., 1982. Nature 298, 447.)



такты с основаниями узнаваемой последовательности ДНК, расположенными внутри большой бороздки двойной спирали. В структуре α -спиралей боковые группы аминокислот ориентированы наружу, что дает основания считать, что специфичность взаимодействия обусловлена контактами аминокислотных остатков различных белков с разными нуклеотидами соответствующих участков ДНК. Таким образом, на основе общей структурной основы ДНК-белкового узнавания различные аминокислотные последовательности могут специфически взаимодей-

ствовать с различными нуклеотидными последовательностями.

Сравнение аминокислотных последовательностей ряда других регуляторных белков, таких, как *lac*-репрессор, белок *cII* фага λ , а также аналоги белков *Sto* и *cI* фагов 434 и P22, показало, что все они обладают такой же α -спиральной организацией соответствующих участков структуры. Таким образом, использование пары α -спиралей для специфического связывания с ДНК является, вероятно, общей особенностью механизмов ДНК-белкового узнавания.

Опероны биосинтеза аминокислот

При обсуждении регуляции фага λ мы видели, что контроль транскрипции некоторых генов может осуществляться с помощью позитивной регуляции, основанной на антитерминации. Белки N и Q действуют на РНК-полимеразу таким образом, что она оказывается способной продолжать транскрипцию, минуя определенные терминаторные последовательности, которые в отсутствие этих белков останавливают транскрипцию. Регуляция экспрессии генов с помощью антитерминации также является характерной особенностью функционирования бактериального генома. Наиболее интенсивно антитерминация была изучена на примере организации ряда оперонов биосинтеза аминокислот в нескольких видах бактерий. Эти исследования также значительно расширили наши представления о природе самого процесса терминации. Оказалось, что в этих оперонах антитерминация происходит при участии рибосом. Это открытие выявило тесную связь между процессами транскрипции и трансляции. Оно позволило объяснить, каким образом *nonsense*-мутации в полицистронных оперонах типа *lac*-оперона могут привести к проявлению полярных эффектов, а также предложить механизм антитерминационного действия белков N и Q. Триптофановый оперон (*trp*) *E. coli* включает пять генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза триптофана (рис. 15.20). Эти гены транскрибируются в виде полицистронной мРНК, синтез которой инициируется на промоторе, находящемся под контролем прилегающего операторного участка, подобно тому как это организовано в случае *lac*-оперона. Транскрипция контролируется взаимодействием оператора и белка-репрессора, эффектом которого служит триптофан — конечный продукт пути биосинтеза, направляемого продуктами генов *trp*-оперона. При избытке триптофана он связывается со свободным репрессором и оказывает аллостерическое влияние на его структуру, в результате чего репрессор начинает прочно связываться с оператором. С другой стороны, при недостатке триптофана происходит его диссоциация из комплекса с репрессором, после чего и сам репрессор отделяется от операторной последовательности; начинается транскрипция *trp*-оперона. В этом случае говорят, что триптофан выступает в роли *корепрессора* *trp*-оперона.

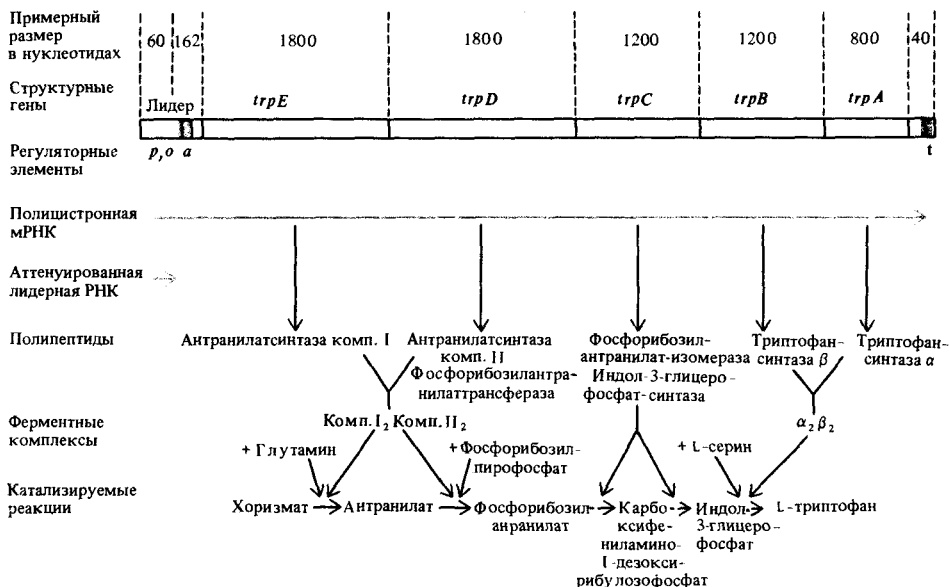


Рис. 15.20. Триптофановый оперон (*trp*) *E. coli*. Показаны два продукта транскрипции – полицистронная мРНК и аттенуированная РНК, считываемая с лидерного участка в ус-

ловиях терминации транскрипции. (По Platt T, 1978. In: The Operon, eds. I. H. Miller, W. S. Reznikoff, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.)

При изменении концентрации триптофана от предельно высокой до предельно низкой наблюдается примерно 600-кратное увеличение уровня экспрессии *trp*-оперона. В то же время сам комплекс (репрессор – триптофан) отвечает только за 70-кратное увеличение уровня транскрипции оперона. Более того, мутации, инактивирующие репрессор, не снимают полностью влияние триптофана на экспрессию *trp*-оперона. В отсутствие репрессора наблюдается 8–10-кратное различие в уровне транскрипции генов оперона в зависимости от содержания в среде триптофана. Эта разновидность контроля экспрессии называется *аттенуацией*. Она связана с регуляцией на участке, расположенном между промотором и первым геном триптофанового оперона *trpE*. Этот участок, называемый *аттенуатором* (*a*), был открыт, когда впервые выяснилось, что наличие небольших делеций справа от промотора *trp* повышает уровень экспрессии генов оперона не менее чем в восемь раз. Поскольку эти делеции не затрагивают ни операторной, ни промоторной области, можно было предположить, что аттенуатор по сути дела является терминатором. Анализ РНК-транскриптов, инициированных на промоторе *trp* в нормальных клетках *E. coli*, действительно показал, что большинство из них терминированы в области лидерной последовательности (рис. 15.20) в точке, отстоящей на 140 п.н. от промотора. При этом лишь в 10% случаев поток транскрипции достигает структурных генов оперона. Нуклеотидная последовательность лидерного транскрипта *trp*-оперона, терминируемого на аттенуаторном участке, показана на рис. 15.21. Она характеризуется двумя любопытными особенностями. Первая – это наличие сайта связывания с рибосомой. За этим сайтом следует открытая рамка считывания, кодирующая небольшой полипеп-

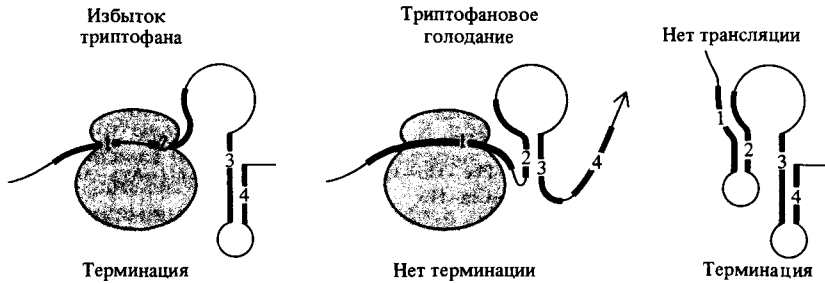


Рис. 15.22. Модель аттенуации *trp*-оперона *E. coli*, основанная на представлении об участии рибосомы, синтезирующей лидерный полипептид, в контроле терминации транскрипции. От положения рибосомы зави-

сит выбор альтернативного варианта вторичной структуры транскрипта. Терминация происходит при образовании шпильчатой структуры 3:4. (По Oxender D. L. et al., 1979. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 5524.)

тид из 14 аминокислот, в числе которых – два соседних остатка триптофана. Само по себе это достаточно примечательно, поскольку частота встречаемости триптофана в белках обычно составляет 1 на 100 аминокислотных остатков. Вторая особенность заключается в присутствии последовательностей, которые могут формировать три взаимоисключающих варианта вторичной структуры, показанные на рис. 15.21 и 15.22. Одна из шпильчатых структур очень напоминает структуру терминатора. Обе эти особенности были обнаружены также в структуре других оперонов биосинтеза аминокислот при анализе последовательности соответствующих лидерных транскриптов. Каждый из этих транскриптов кодирует небольшой полипептид, содержащий несколько аминокислотных остатков – продуктов биосинтеза, направляемого данным опероном (рис. 15.23). Последовательность каждого из них может формировать три взаимоисключающих варианта вторичной структуры, один из которых напоминает структуру терминатора. Эти наблюдения привели к формулировке модели аттенуации, основанной на представлении о том, что рибосома, транслирующая лидерный полипептид, оказывает влияние на выбор варианта вторичной структуры транскрипта и таким образом определяет, произойдет ли остановка транскрипции после того, как будет синтезирована терминаторная петля, или транскрипция будет продолжена на протяжении всего остального оперона. Эта модель была проверена экспериментально и на сегодняшний день считается в основном верной.

Согласно этой модели, имеет место тесное сопряжение процессов транскрипции и трансляции, за счет чего поведение РНК-полимеразы определяется влиянием первой рибосомы, которая связывается с синтезируемым РНК-транскриптом. Взаимодействие осуществляется благодаря формированию особой вторичной структуры на участке транскрипта, расположенном между рибосомой и РНК-полимеразой. Как уже упоминалось, лидерный транскрипт может образовать три варианта вторичной структуры – 1:2, 2:3 и 3:4 (терминатор). В лидерном *trp*-транскрипте находятся два триптофановых кодона, расположенных таким образом, что если рибосома ввиду недостатка в среде триптофанил-тРНК^{Trp} задерживается рядом с ними, то оказывается, что она тем самым препятствует образованию первой петли 1:2

<i>his</i> :	Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys- <u>HIS-HIS-HIS-HIS-HIS-HIS-HIS</u> -Pro-Asp
<i>pheA</i> :	Met-Lys-His-Ile-Pro- <u>PHE-PHE-PHE</u> -Ala- <u>PHE-PHE-PHE</u> -Thr- <u>PHE</u> -Pro
<i>thr</i> :	Met-Lys-Arg- <u>Ile-Ser-THR-THR-Ile-THR-THR-THR-Ile-THR-Ile-THR-THR</u> -Gly-Asn-Gly-Ala-Gly
<i>leu</i> :	Met-Ser-His-Ile-Val-Arg-Phe-Thr-Gly- <u>LEU-LEU-LEU-LEU</u> -Asn-Ala-Phe-Ile-Val-Arg-Gly-Arg-Pro-Val-Gly-Gly-Ile-Gln-His
<i>ilv</i> :	Met-Thr-Ala- <u>LEU-LEU</u> -Arg- <u>VAL-Ile</u> -Ser- <u>LEU-VAL-VAL-Ile</u> -Ser- <u>VAL-VAL-VAL-Ile-Ile-Ile</u> -Pro-Pro-Cys-Gly-Ala-Ala-Leu-Gly-Arg-Gly-Lys-Ala

Рис. 15.23. Аминокислотные последовательности лидерных полипептидов, предсказанные на основании нуклеотидных последовательностей пяти оперонов биосинтеза аминокислот *E. coli* и *S. typhimurium*.

(рис. 15.22). В этом случае может образоваться структура 2:3, предотвращающая возникновение альтернативной структуры 3:4. То есть «торможение» рибосомы препятствует формированию терминаторной структуры и позволяет РНК-полимеразе продолжить транскрипцию за лидерный участок ДНК и тем самым достигнуть области структурных генов оперона. С другой стороны, в присутствии значительных количеств триптофана и соответственно триптофанил-тРНК^{Trp} рибосома не задерживается в области соответствующих кодонов и тем самым не дает возможности образоваться петле 2:3. Это в свою очередь делает возможным формирование терминаторной петли (3:4) после того, как произойдет транскрипция соответствующего участка лидерной последовательности ДНК (рис. 15.22). Образование терминаторной петли вызывает обрыв транскрипции на участке, содержащем подряд несколько уридиновых остатков (отмечен на рис. 15.21).

Данная модель аттенуации применима и к другим оперонам биосинтеза аминокислот. В каждом случае определенные кодоны располагаются в лидерном транскрипте таким образом, что задержка рибосомы, связанная с нехваткой соответствующих аминокислот, так влияет на вторичную структуру образующегося транскрипта, что формирование терминаторной петли становится невозможным.

Эта модель подтверждается экспериментами по изучению *in vitro* транскрипции фрагментов ДНК, содержащих лидерную часть *trp*-оперона. Эти эксперименты показали, что РНК-полимераза на некоторое время задерживается около нуклеотида в положении 90 образующегося транскрипта (см. рис. 15.21), прежде чем продолжить транскрипцию оставшейся части лидерной последовательности. Такая задержка может быть связана с образованием шпильки 1:2 за ферментом. Вероятно, благодаря возникшей паузе первая рибосома успевает начать трансляцию и «догнать» РНК-полимеразу.

Тесное сопряжение процессов транскрипции и трансляции может объяснить полярные эффекты *nonsense*-мутаций. В норме рибосомы следуют непосредственно за РНК-полимеразой, направляя трансляцию образующихся участков мРНК «по мере поступления». При введении *nonsense*-мутаций на участке, где в норме трансляция должна продолжаться, возникает стоп-кодон, рибосомы отделяются от новообразованной мРНК и более не следуют за РНК-полимеразой. Имеются некоторые указания на то, что криптические терминаторные последователь-

ности содержатся во многих структурных генах. Считают, что, когда рибосомы перестают следовать за РНК-полимеразой, эти криптические последовательности могут формировать терминаторные шпильки в новообразованной мРНК, что вызывает остановку транскрипции до завершения считывания всего оперона. В норме продвижение рибосом по образующейся цепи мРНК предотвращает формирование этих терминаторных шпилек.

Антитерминационный белок N фага λ , вероятно, проявляет свою активность, оказывая влияние на взаимодействие рибосом с РНК-полимеразой. Вспомните, что белок N действует на участках *nut* (также формирующих шпильки в структуре образующихся мРНК), модифицируя РНК-полимеразу таким образом, что она после этого перестает «замечать» большинство терминаторных последовательностей. Отбор мутантов *E. coli*, в которых белок N оказывается нефункциональным, позволил выявить существование клеточного гена *nusA* (от англ. *N undersupplied*). Белок, продукт этого гена, входит в состав активного транскрипционного комплекса, образуемого РНК-полимеразой (см. гл. 11). Считают, что мутация *nusA* изменяет этот белок таким образом, что он становится нечувствительным к действию белка N. Это свидетельствует о том, что белок N на участке *nut* модифицирует РНК-полимеразу за счет непосредственного взаимодействия с белком *nusA*.

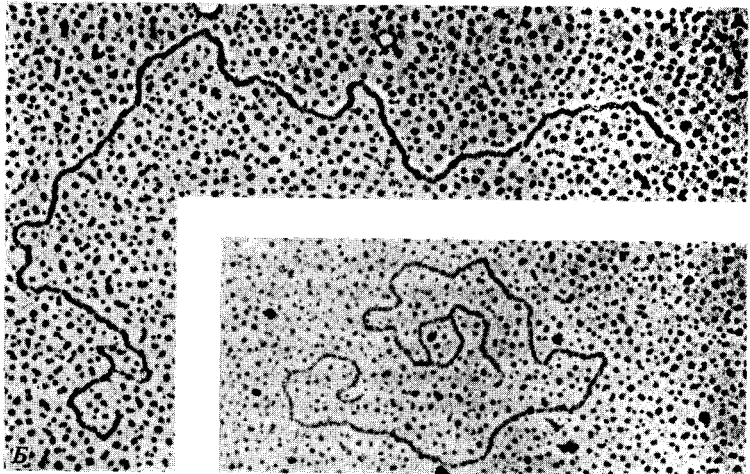
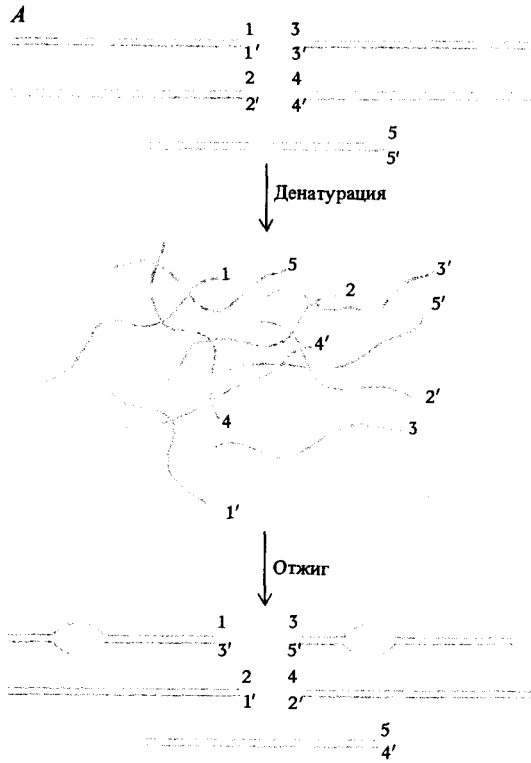
Очевидно, что процесс терминации транскрипции весьма сложен. Анализ влияния различных мутаций на протекание таких сложных процессов даст возможность определить круг ферментов, участвующих в них, сформулировать модели соответствующих механизмов. Этот и другие рассмотренные нами примеры иллюстрируют широкие возможности генетического анализа.

Регуляция экспрессии генов с помощью сайт-специфической рекомбинации

Рассмотренные примеры механизмов генетической регуляции основаны на использовании перечисленных в начале этой главы типов регуляторных элементов – белков-регуляторов, низкомолекулярных эффекторов и регуляторных центров. Однако следует отметить, что этим списком не исчерпываются регуляторные возможности прокариот.

Так, бактерии рода *Salmonella* обладают жгутиками, используемыми для передвижения. Эти жгутики содержат один основной структурный белок – флагеллин; однако бактерии обладают двумя структурными генами, которые кодируют два иммунологически различных типа флагеллинов. Два соответствующих белка обозначают H1 и H2. Структурные гены этих белков не являются тесно сцепленными. В клетках всегда экспрессируется только какой-либо один из них. Ген H2 тесно сцеплен и экспрессируется синхронно с геном *rH1*, продукт которого служит репрессором гена H1. Таким образом, при экспрессии пары H2, *rH1* синтезируется только флагеллин H2, поскольку репрессор *rH1* предотвращает экспрессию гена H1. Напротив, при подавлении экспрессии H2 и *rH1* происходит синтез флагеллина H1. Явление альтернативной экспрессии

Рис. 15.24. Доказательство наличия спонтанно инвертируемой последовательности в регуляторной области оперона *H2-rH1*. А. Плазмиду, содержащую клонированную регуляторную область оперона, размножают для получения большой популяции плазмидных молекул, которые затем линейризуют обработкой рестриктазой *Eco* RI (плазмида содержит единственный сайт для *Eco* RI). Далее проводят денатурацию ДНК и отжиг. Б. Образовавшиеся гетеродуплексные молекулы ДНК анализируют с помощью электронного микроскопа. Образный участок негомологии, обнаруживаемый в составе некоторых гетеродуплексных молекул ДНК, свидетельствует о спонтанной инверсии, имеющей место в ходе роста плазмидной популяции. (По Zieg J. et al., 1977. Science 196, 170.) [Copyright 1977 by the American Association for the Advancement of Science.]



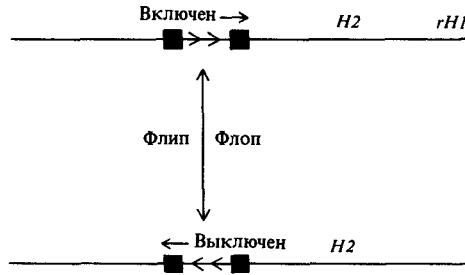


Рис. 15.25. Модель фазовой вариации, основанная на представлении об инверсии нуклеотидной последовательности, содержащей промоторную область оперона *H2-rH1*. (По Zieg J. et al., 1977. Science, 196, 170.)

генов *H1* и *H2* получило название *вариации фаз*. В культуре, выращенной из клетки, находившейся в какой-либо одной из двух фаз, всегда обнаруживаются клетки в обеих фазах. Частота перехода клеток из одной фазы в другую для различных штаммов *Salmonella* варьирует в пределах от 1 на 10^5 до 1 на 10^3 клеток за генерацию. Вариация фаз для бактерий *Salmonella*, вероятно, является одним из способов избежать иммунологического отторжения в ходе инфекции.

Контроль вариации фаз зависит от состояния промотора, направляющего транскрипцию генов *H2* и *rH1*. Это было показано с помощью клонирования соответствующей регуляторной области на плазмидном векторе с использованием методов, описанных в гл. 9. При выращивании клеток *E. coli*, содержащих плазмиду со встроенной регуляторной областью, можно получить огромную популяцию идентичных молекул. Плазмидную ДНК очищают и линеаризуют с помощью рестриктазы *EcoRI* (рис. 15.24). Денатурация и отжиг цепей ДНК приводит к образованию гетеродуплексов, содержащих цепи из различных исходных плазмидных молекул. Некоторые из этих гетеродуплексных молекул содержат негибридизующийся участок протяженностью около 800 п.н. (рис. 15.24). Появление этого участка, как оказалось, вызвано тем, что в некоторых плаزمиде произошла переориентация участка протяженностью 800 п.н. Это наблюдение позволило предложить модель механизма вариации фаз, согласно которой промотор генов *H2* и *rH1* может находиться в одной из двух ориентаций («флип» или «флоп»). В одной из них транскрипция с этого промотора приводит к образованию белков *H2* и *rH1*. При другой ориентации транскрипции этих генов не происходит (рис. 15.25).

Было показано, что инверсия промоторной области у *Salmonella* направляется системой сайт-специфической рекомбинации. По обе стороны от инвертируемого участка находятся идентичные противоположно ориентированные сегменты последовательности ДНК по 14 п.н. Наряду с промотором генов *H2* и *rH1* этот участок содержит также ген (*hin*), продукт которого направляет сайт-специфическую рекомбинацию между 14-членными повторами. В результате рекомбинации происходит инверсия всего этого участка ДНК. Фаги P1 и Mu также кодируют белки сайт-специфической рекомбинации, которые могут направлять инверсию сегментов ДНК в их собственных геномах. Оказалось, что эти белки могут заменить дефектный белок Hin в мутантах *Salmonella hin⁻*.

Это позволяет предположить, что подобные системы инверсии последовательностей, участвующих в регуляции экспрессии генов в различных геномах, произошли от общего предшественника.

Регуляция экспрессии генов посредством сайт-специфической инверсии, вероятно, не является широко распространенным способом генетической регуляции у прокариотических организмов. Судя по всему, эволюция большинства регуляторных механизмов прокариот была направлена на создание систем быстрого изменения уровня экспрессии тех или иных генов в ответ на быстрые изменения в окружающей среде. В то же время система вариации фаз организована таким образом, что соответствующие изменения происходят с очень низкой вероятностью и не могут служить целям быстрого реагирования на изменения окружения. Система сайт-специфической инверсии скорее предназначена не для оперативной подстройки к изменяющимся условиям среды, а для подготовки целой популяции клеток к встрече с новыми условиями окружения посредством расширения возможностей генетической вариабельности в популяции.

Литература

- Dickson R. C. et al. (1975). Genetic regulation: the *lac* control region, *Science*, **187**, 27–35.
- Farabaugh P. J. (1978). Sequence of the *lac* I gene, *Nature*, **274**, 765–769.
- Friedman D. I. et al. (1981). Evidence that ribosomal protein S10 participates in control of transcription termination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1115–1118.
- Gilbert W., Maxam A. (1973). The nucleotide sequence of the *lac* operator, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3581–3584.
- Guarente L. et al. (1982). Mutant λ phage repressor with a specific defect in its positive control function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2236–2239.
- Herskowitz I. (1973). Control of gene expression in bacteriophage lambda, *Annu. Rev. Genet.*, **7**, 289–324.
- Herskowitz I., Hagen D. (1980). The lysis-lysogeny decision of phage λ : explicit programming and responsiveness, *Annu. Rev. Genet.*, **14**, 399–445.
- Johnson A. et al. (1978). Mechanism of action of the *cro* protein of bacteriophage lambda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1783–1787.
- Johnson A. D. et al. (1981). λ repressor and *cro*-components of an efficient molecular switch, *Nature*, **294**, 217–223.
- Matthews B. W. et al. (1982). Structure of the DNA-binding region of *lac* repressor inferred from its homology with *cro* repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1428–1432.
- Ogata R., Gilbert W. (1978). An amino-terminal fragment of *lac* repressor binds specifically to *lac* operator, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5851–5854.
- Olson E. R., Flamm E. L., Friedman D. I. (1982). Analysis of *nutR*: a region of phage lambda required for antitermination of transcription, *Cell*, **31**, 61–70.
- O'Neill M. C., Amass K., de Crombrugge B. (1981). Molecular model of the DNA interaction site for the cyclic AMP receptor protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2213–2217.
- Pabo C. O. et al. (1979). The lambda repressor contains two domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1608–1612.
- Ptashne M. et al. (1980). How the λ repressor and *cro* work, *Cell*, **19**, 1–11.
- Shimatake H., Rosenberg M. (1981). Purified λ regulatory protein cII positively activates promoters for lysogenic development, *Nature*, **292**, 128–132.
- Siebenlist U. et al. (1980). *E. coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters, *Cell*, **20**, 269–281.
- Ward D. F., Gottesman M. E. (1982). Suppression of transcription termination by phage lambda, *Science*, **216**, 946–951.
- Yanofsky C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons, *Nature*, **289**, 751–758.
- Zieg J. et al. (1978). Regulation of gene expression by site-specific inversion, *Cell*, **15**, 237–244.

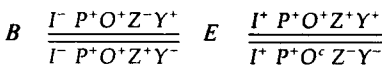
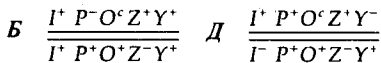
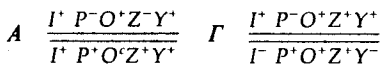
Ключевые слова и понятия

Активатор	Лизис или лизогения
Аллостерический переход	Обобщенная последовательность
Аттенуатор	Оператор
Аттенуация	Оперон
Белок активатор катаболитных генов (CAP-белок)	Палиндром
Белок – негативный регулятор	Полярный эффект
Белок – позитивный регулятор	Прибнов-бокс
Вариация фаз	Промотор
Гены	Регуляторный белок
Индукция фермента	Регуляторный центр
Индуктор	Репрессор
Катаболитная репрессия	Терминатор
Конститутивный мутант	Сопряженная транскрипция – трансляция
Корепрессор	Шпилька
	Эффектор

Задачи

15.1. Прокариотические организмы располагают следующими типами регуляторных элементов: репрессоры, активаторы, корепрессоры, промоторы, операторы, аттенуаторы и терминаторы. Какие из этих элементов по-вашему могут быть вовлечены в регуляцию всех транскрипционных единиц? всех оперонов? всех аттенуируемых оперонов?

15.2. Опишите фенотипические проявления следующих частичных диплоидов *E. coli* в терминах наличия или отсутствия ферментативных активностей:



15.3. Проведите классификацию следующих регуляторных элементов на негативные и позитивные (по отношению к контролю транскрипции):

- продукт гена *N* фага λ
- продукт гена *cro* фага λ
- триптофанил-тРНК-синтетаза
- триптофан
- продукт гена *cII* фага λ
- продукт гена *lacI*
- фенилаланил-тРНК^{Phe}
- тРНК^{Phe}
- ρ -фактор
- σ -фактор
- продукт гена *recA*
- β -галактозидаза
- cAMP
- продукт гена *Q* фага λ
- продукт гена *cI* фага λ
- ген *lacO*
- ген *O_R* фага λ
- лидерная последовательность *trp*-оперона

15.4. Продукция фермента S у *E. coli* регулируется генами A, B и C. Гены A и B действуют в *цис*-положении, а ген C – как в *цис*-, так и в *транс*-положении.

- Что можно сказать о природе генов A, B и C?
- Удастся выделить мутанты по генам B и C, характеризующиеся конститутивным синтезом фермента S. В то же вре-

мя любые мутации гена *A* сказываются только на снижении продукции *S*-фермента независимо от условий культивирования. Что еще можно сказать о генах *A*, *B* и *C*?

(в) Что можно сказать о природе регуляции фермента *S*, если введение делеции в ген *C* приводит к полному прекращению синтеза фермента *S*?

15.5. Определите фенотип штаммов фага λ , несущих мутации в следующих генах:

<i>int</i>	P_{RE}
<i>cI</i>	<i>cro</i>
<i>cII</i>	O_R
<i>cIII</i>	<i>N</i>

15.6. Известно, что ген *A* кодирует диффундирующий продукт, регулирующий синтез фермента *X*, а гены *P* и *S* — соответственно промотор и регулятор, контролирующие ген *X*. Заполните таблицу и предскажите характер продукции фермента *X* — индуцибельный, неиндуцибельный или конститутивный.

Генотип	Если продукт гена <i>A</i> — репрессор	Если продукт гена <i>A</i> — активатор
Гаплоидный генотип		
<i>A</i> ⁺		
Мутация в гене <i>A</i> , приводящая к необратимому связыванию с <i>S</i>		
<i>P</i> ⁻		
<i>S</i> ⁻		
Частично диплоидный генотип		
<i>A</i> ⁺ <i>P</i> ⁺ <i>S</i> ⁺ <i>X</i> ⁻ /		
<i>A</i> ⁺ <i>P</i> ⁺ <i>S</i> ⁻ <i>X</i> ⁺		
<i>A</i> ⁺ <i>P</i> ⁺ <i>S</i> ⁺ <i>X</i> ⁺ /		
<i>A</i> ⁻ <i>P</i> ⁻ <i>S</i> ⁻ <i>X</i> ⁻		
<i>A</i> ⁻ <i>P</i> ⁺ <i>S</i> ⁺ <i>X</i> ⁻ /		
<i>A</i> ⁻ <i>P</i> ⁺ <i>S</i> ⁺ <i>X</i> ⁺		
<i>A</i> ⁺ <i>P</i> ⁻ <i>S</i> ⁺ <i>X</i> ⁺ /		
<i>A</i> ⁻ <i>P</i> ⁺ <i>S</i> ⁺ <i>X</i> ⁻		

15.7. Клетки *E. coli*, несущие профага λ с температурочувствительной мутацией в гене *cI* [*E. coli* (λcI^{ts})], жизнеспособны в форме лизогенов при 30°, а при 42° лизируются и высвобождают фаговые ча-

стицы. Штамм *E. coli* ($\lambda cI^{ts} N^- O^-$) при 30° развивается как нормальный лизоген, иммунный к суперинфекции фагом λ . При выращивании этого штамма на протяжении нескольких генераций при 42° и последующем тестировании на иммунитет при 30° оказывается, что почти все клетки в популяции (99,9%) чувствительны к инфекции фагом λ , лизируются и высвобождают потомство инфицирующего фага. В то же время клетки штамма *E. coli* ($\lambda cI^{ts} N^- O^-$), вначале инкубируемые при 42°, а затем при 30°, вновь приобретают иммунитет к инфекции фагом λ при 30° с частотой около 1% на генерацию. Основываясь на ваших знаниях о регуляции фага λ , предложите гипотезу, удовлетворяющую этим наблюдениям. Как проверить вашу гипотезу?

15.8. Какой из механизмов регуляции транскрипции, рассмотренных в этой главе, может быть, с вашей точки зрения, характерен только для прокариот?

15.9. Некоторые мутации, картируемые в гене *lacI* *E. coli*, лишают клетки способности использовать лактозу в качестве источника углерода. В частичных диплоидах, содержащих аллель *lacI*⁺, эти мутации, обозначенные *lacI*^s (признак — суперрепрессия), проявляются как доминантные (то есть придающие диплоиду скорее мутантный, чем нормальный фенотип). Предложите гипотезу, учитывающую свойства мутаций *lacI*^s. Ваша гипотеза должна иметь предсказательную силу. Каковы предсказания, которые можно сделать на основании вашей гипотезы? Как их проверить экспериментально?

15.10. Первые данные, полученные Жакобом и Моно о рецессивном характере мутаций *lacI*⁻, вполне согласуются с предположением о том, что ген *lacI*⁺ кодирует репрессорную молекулу РНК, которая предотвращает транскрипцию, взаимодействуя с операторной ДНК с образованием R-петли или связываясь с операторной мРНК и тем самым блокируя дальнейшую транскрипцию оперона. Предложите генетические (не биохимические!) эксперименты, с помощью которых можно было бы установить, является ли *lac*-репрессор белком или РНК.

15.11. Фаг λ , несущий мутацию R^- , не способен лизировать инфицируемые клетки, несмотря на то что в них нарабатывается нормальное количество дочерних фаговых частиц. Однако при инфекции фагом λR^- клеток, лизогенных по гетероиммунному лямбдоидному фагу 434 (см. гл. 7), наблюдаются лизис и высвобождение потомства λR^- (фаги 434 не обра-

зуются). Предложите гипотезу, объясняющую это явление, и опыты по ее проверке.

15.12. Если бы Жакоб и Моно начали работу не с мутантами I^- , обсуждавшимися в этой главе, а с мутантами I^{-D} , можно ли полагать, что их выводы о природе регуляции β -галактозидазы оказались бы точно такими же? Если нет, то чем они могли отличаться?

Регуляция экспрессии генов у эукариот

Различные типы клеток эукариотического организма синтезируют ряд одинаковых белков и в то же время отличаются друг от друга набором белков, специфичных для клеток данного типа. Кроме того, уровень продукции каждого белка варьирует в зависимости как от типа клеток, так и от стадии их развития. Таким образом, следует различать два вида эукариотических генов: одни из них связаны с поддержанием универсальных клеточных функций (гены «домашнего хозяйства»), другие детерминируют специализированные клеточные функции (гены «роскоши»). Функции первого типа проявляются во всех клетках. Для осуществления дифференцированных функций, специфичных для отдельных типов клеток, эти клетки должны в зависимости от их локализации в организме избирательно экспрессировать определенный набор генов.

Так, на различных стадиях развития человека кроветворные клетки синтезируют различные типы гемоглобинов. Белки кристаллины, образующие хрусталик глаза, синтезируются только теми эктодермальными клетками, которые соприкасаются с развивающейся сетчаткой. Очевидно, что эти примеры экспрессии характерных наборов мРНК и белков различными клетками отражают генетическую регуляцию. Более того, решения, принимаемые митотическими сестринскими клетками—стать кроветворными, ретинальными или клетками хрусталика в зависимости от их относительного расположения в развивающемся зародыше,—также связаны с процессами генетической регуляции.

Насколько сложными должны быть механизмы генетической регуляции, контролирующие эти процессы,—вопрос спорный. Определенную ясность в этот вопрос могут внести некоторые количественные выклад-

ки. Число белков, кодируемых ДНК какого-либо организма, может служить разумной оценкой числа генетических функций, необходимых для его развития и воспроизводства. Такой параметр, как *сложность* последовательности ДНК (N) данного организма, задает верхний предел числу кодируемых белков (см. гл. 9). В то же время известно, что лишь небольшая часть последовательности в эукариотических ДНК действительно кодирует те или иные белки. Многие участки ДНК транскрибируются в форме гяРНК, которые впоследствии не транспортируются в цитоплазму и не образуют мРНК, подлежащих трансляции. В ходе созревания некоторых гяРНК в мРНК происходит удаление избыточных 3'-концевых последовательностей и интронов (см. гл. 11). Только около 10% транскрибируемых последовательностей действительно превращаются в последовательности мРНК. Допустив, что в ходе развития организма в клетках различного типа в совокупности происходит транскрипция всех последовательностей, присутствующих в эукариотическом геноме в виде одной копии, можно оценить максимальное число белков, продуцируемых данным организмом. Геном человека состоит примерно из $2,9 \cdot 10^9$ п.н., 70% которых входит в состав однокопийных последовательностей ДНК. Это означает, что сложность популяции мРНК может достигать $2 \cdot 10^8$ нуклеотидов. Поскольку белок среднего размера кодируется мРНК длиной около 1800 нуклеотидов, максимальное число белков человеческого организма оценивается величиной 110 000. Сходные расчеты позволяют получить оценку максимального числа белков: 17 000—для морского ежа и 7250—для *Drosophila melanogaster*. Последняя величина достаточно хорошо согласуется с числом комплементационных групп, выявленных при исследовании различных мутантов, а также с числом дисков в политенных хромосомах (5 000—6 000).

Изучение механизмов регуляции генов у эукариот является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений современной генетики. Наши сегодняшние представления о молекулярных механизмах экспрессии генов у эукариотических организмов в значительной мере основаны на результатах, полученных с применением методов рекомбинантных ДНК. Поскольку эти новые методы стали доступны лишь сравнительно недавно, имеющиеся сегодня сведения о структуре и регуляции эукариотических генов весьма фрагментарны.

Как обсуждалось в гл. 15, регуляция прокариотических генов осуществляется за счет взаимодействия специализированных регуляторных белков с регуляторными участками последовательности ДНК. Теперь мы знаем, что это в равной мере относится и к регуляции эукариотических генов. Применение методов работы с рекомбинантными ДНК позволило выделить и изучить целый ряд индивидуальных генов и тесно сцепленных с ними регуляторных последовательностей из различных типов эукариотических клеток и их вирусов. В результате таких исследований удалось значительно расширить круг представлений о структуре кодирующих и некодирующих участков эукариотических ДНК и РНК-транскриптов.

Контроль образования мРНК может осуществляться внутри ядра на нескольких различных уровнях. Как уже отмечалось, многие эукариотические гены состоят из экзонов и интронов, причем созревание мРНК сопровождается вырезанием интронов из соответствующих первичных РНК-транскриптов, то есть сплайсингом. Контроль экспрессии генов

Таблица 16.1. Возможные уровни регуляции экспрессии генов

Уровни регуляции	Количество примеров
Ядерный	
Транскрипция	
Инициация	Множество, >100
Терминация (аттенуация)	1
Процессинг ядерной РНК	
Полиаденилирование	~ 3
Сплайсинг	2
Цитоплазматический	
Стабильность мРНК	~5 на уровне определенных генов; множество на общем уровне.
Эффективность трансляции мРНК	~10 на уровне определенных генов; множество на общем уровне.

Составлено по Darnell J. E., Jr. 1982. Nature, 297, 365.

может осуществляться как на уровне самой транскрипции, так и на уровне сплайсинга. Более того, ДНК в эукариотических клетках организована в нуклеосомы, которые в свою очередь формируют хроматиновые структуры более высокого порядка (см. гл. 4). В зависимости от локальной структуры хроматина данные участки ДНК могут находиться в состоянии, доступном или недоступном для действия РНК-полимеразы, то есть структура хроматина также может влиять на регуляцию транскрипции. В табл. 16.1 приведены возможные уровни регуляции эукариотических генов и сведения о количестве примеров, на которых удалось показать реализацию того или иного уровня регуляции. Кроме того, так как у эукариот транскрипция не сопряжена непосредственно с трансляцией, то возможен и фактически реализуется цитоплазматический контроль использования регуляторных мРНК. Все эти контролирующие и регуляторные механизмы, без сомнения, требуют участия специализированных белков (и, возможно, некоторых молекул РНК), действующих на соответствующие регуляторные участки ДНК или РНК. В настоящее время сведения о природе этих регуляторных молекул весьма ограничены. Однако есть основания полагать, что в ближайшие годы наши представления в этой области могут существенно расшириться.

Участки ДНК, контролирующие транскрипцию

По аналогии с прокариотами можно ожидать, что в инициации транскрипции эукариотических генов должны участвовать промоторные последовательности, расположенные в ДНК недалеко от точки инициации синтеза РНК (с 5'-конца данного гена). С использованием методов, описанных в гл. 9, удалось клонировать значительное количество структурных генов из различных эукариотических клеток и их вирусов. Сравнение 5'-фланкирующих последовательностей этих генов позволило выявить очень характерную А-Т-богатую последовательность, распо-



Рис. 16.1. Сравнение 5'-фланкирующих последовательностей для 41 эукариотического гена. Цифровые индексы соответствуют числу случаев, в которых данный нуклеотид занимает данное положение в некодирующей цепи ДНК (то есть в той, которая комплементарна цепи, служащей матрицей для синтеза РНК). Соотнесение последовательностей осуществлено по принципу получения

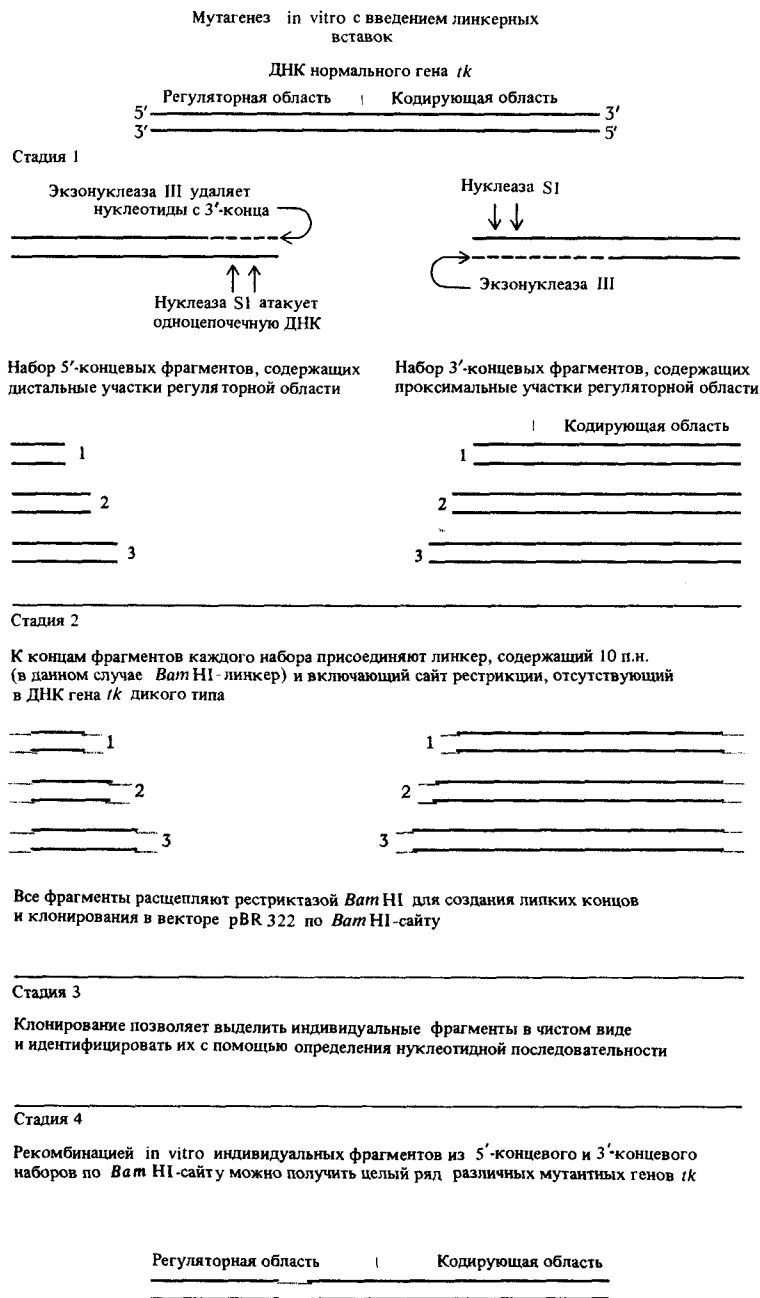
максимального сходства, поэтому, как отмечено в верхней строке, наблюдаются определенные различия в расстояниях между данным нуклеотидом и точкой начала транскрипции (первый транскрибируемый нуклеотид имеет номер +1). Внизу приведена обобщенная (consensus) или так называемая ТАТА-последовательность. (По *Corden I. et al.*, 1980. *Science* **209**, 1406.)

лагающуюся, как правило, за 20–30 нуклеотидов до точки начала транскрипции. Этот участок, названный Гольдберг–Хогнесс-боксом (по аналогии с Прибнов-боксом прокариот) или просто «ТАТА»-последовательностью, показан на рис. 16.1. Наличие такой последовательности характерно для транскрипционных единиц, в считывании которых участвует РНК-полимераза II.

Изучали способность клонированных генов, включающих 5'-фланкирующие последовательности, направлять транскрипцию *in vitro* и *in vivo* с использованием тест-систем, позволяющих оценивать точность инициации транскрипции в 5'-концевой области клонированных последовательностей. Таким образом, при работе с клонированными мутантными и нормальными ДНК удастся провести сравнение, позволяющее установить, какие из остатков 5'-фланкирующей последовательности действительно необходимы для нормального функционирования промотора. Эти исследования показали, что ТАТА-последовательность необходима для правильного выбора цепи ДНК и точки инициации транскрипции. Эта регуляторная последовательность наряду с другими участками последовательности контролирует также эффективность инициации транскрипции.

Для осуществления точной транскрипции *in vitro* недостаточно присутствия только очищенной РНК-полимеразы II и клонированной последовательности ДНК. Необходимо также присутствие неидентифицированных в настоящее время белков. Была разработана кроме того удобная система транскрипции *in vivo*, основанная на инъекции клонированной ДНК в очень крупные ядра ооцитов африканской шпорцевой лягушки *Xenopus*. Инъекционная ДНК связывается с гистонами

Рис. 16.2. Мутагенез *in vitro* используется для выявления 5'-фланкирующих последовательностей, участвующих в контроле транскрипции. На стадии 1 рестрикционный фрагмент ДНК, содержащий ген *tk*, подвергают расщеплению с обоих концов экзонуклеазой III и нуклеазой S1. Образующиеся продукты расщепления для большей наглядности изображены здесь в виде двух наборов дискретных 5'- и 3'-концевых фрагментов. В действительности, индивидуальные фрагменты как таковые идентифицируют только после клонирования и определения нуклеотидной последовательности, как показано на схеме (стадии 2 и 3). На стадии 2 к концам каждого из фрагментов в смеси присоединяют *Bam* HI-линкеры и проводят встраивание в вектор рBR322 по *Bam* HI-сайту. После этого индивидуальные фрагменты могут быть получены с помощью клонирования рекомбинантных плазмид в *E. coli*, как обсуждалось в гл. 9 (стадия 3).



и образует нуклеосому, имитирующую естественный субстрат для транскрипции в ядре.

Хорошим примером применения такого подхода является мутационное картирование регуляторных последовательностей, необходимых для транскрипции гена тимидинкиназы (*tk*) вируса герпеса. Этот ген может

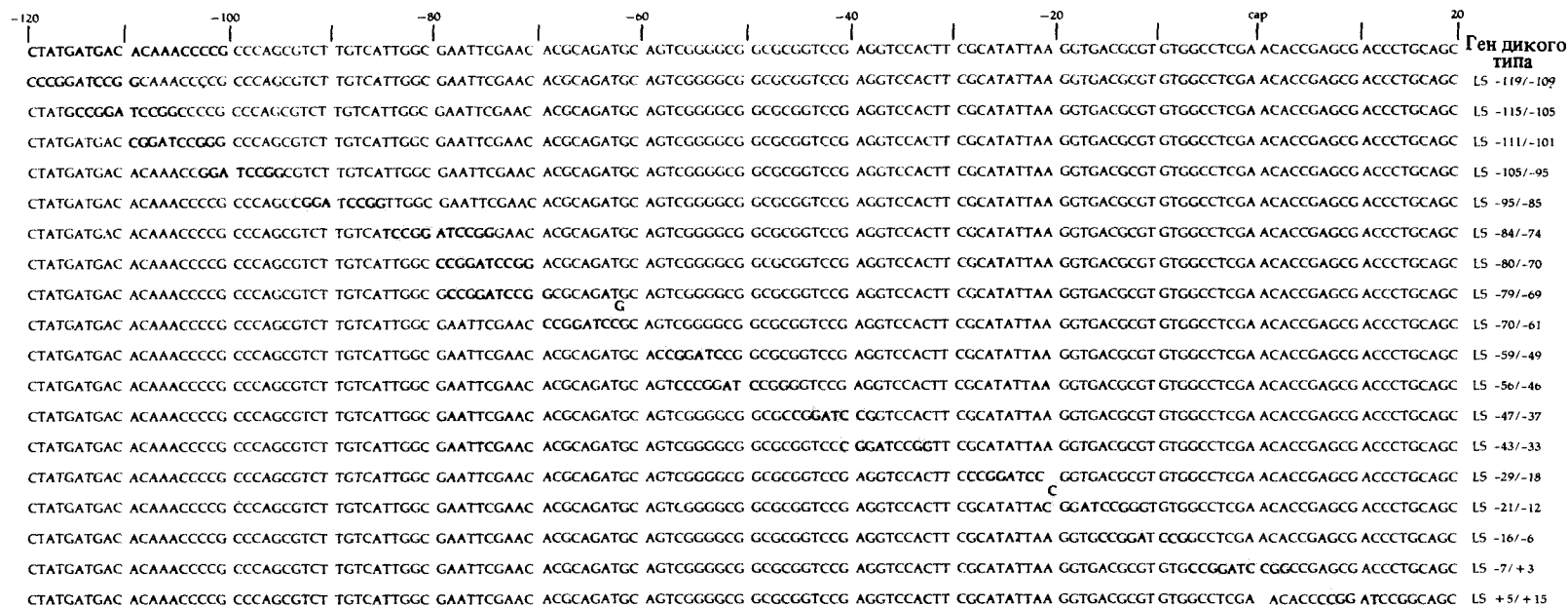


Рис. 16.3. Мутантные гены *tk*, полученные, как показано на рис. 16.2. Нормальная последовательность соответствующей области гена *tk* приведена в верхней строке (показана только последовательность некодирующей цепи). Встраивание в эту последовательность *Bam* HI-линка на различных участках приводит к возникновению нуклеотидных замен, выделенных цветом. Эффективность транскрипции для каждого из мутантных генов указана в табл. 16.2 (По McKnight S. L., Kingsbury R., 1982. Science 217, 316.)

экспрессироваться во многих типах эукариотических клеток, о чем свидетельствует инфекционная активность вируса по отношению к широкому спектру эукариотических организмов, а также способность воспроизводиться в соматических клетках многих типов тканей. Во всех случаях на 5'-конце РНК-транскрипта гена *tk* обнаруживается одна и та же последовательность, что указывает на способность промотора *tk* функционировать идентично в разных типах эукариотических клеток.

Для идентификации в 5'-фланкирующей последовательности нуклеотидов, вовлеченных в регуляцию транскрипции гена *tk*, можно было бы вводить мутации в каждое положение. Такой подход оказался бы чрезвычайно трудоемким. Более эффективный метод, названный *линкерным сканированием*, был использован в работе Мак-Найта и его коллег. Этот метод (рис. 16.2) включает создание в клонированном гене *tk* двух наборов делеций — с левого и с правого конца клонированной последовательности. Протяженность делеции в каждом делеционном варианте фиксировали с помощью определения нуклеотидной последовательности. Были получены 43 различные делеции с 5'-конца и 42 — с 3'-конца, вошедшие в состав мутагенизированных таким образом генов *tk* (рис. 16.2). С использованием подходящих делеционных мутантов из каждого набора можно было сконструировать гены, содержащие мутации замещения и отличающиеся от нормальной последовательности *tk* в десяти или менее положениях нуклеотидных пар. Некоторые из этих мутантных последовательностей показаны на рис. 16.3.

В каждом случае влияние замещения определенных участков последовательности на эффективность транскрипции определяли, инъецируя очередную конструкцию, состоящую из клонирующего вектора pBR322 со встроенным мутантным геном *tk*, в ядра ооцитов *Xenopus*. После 24 часов инкубации из ооцитов экстрагировали суммарную РНК и определяли в ней содержание и структуру транскрипта гена *tk*. Результаты, представленные в табл. 16.2, позволяют выявить три участка в 5'-фланкирующей последовательности, необходимые для эффективной транскрипции гена *tk* (отмечены на рис. 16.4). Более того, оказалось, что участок, расположенный ближе других к точке инициации и содержащий

Таблица 16.2. Эффективность транскрипции мутантных генов *tk*, показанных на рис. 16.3, в ооцитах *Xenopus*

Мутант	Эффективность экспрессии	Мутант	Эффективность экспрессии
LS-119/-109	1,20	LS-59/-49	0,08
LS-115/-105	1,36	LS-56/-46	0,11
LS-111/-101	0,04	LS-47/-37	1,27
LS-105/-95	0,03	LS-42/-32	0,68
LS-95/-85	0,12	LS-29/-18	0,06*
LS-84/-74	0,09	LS-21/-12	0,07
LS-80/-70	0,87	LS-16/-6	0,96
LS-79/-69	0,70	LS-7/+3	1,04*
LS-70/-61	0,94	LS+5/+15	1,18*

* Транскрипция начинается в точке, отличной от нормальной точки инициации транскрипции.

По McKnight S. L., Kingsbury R., 1982. Science, 217, 316.

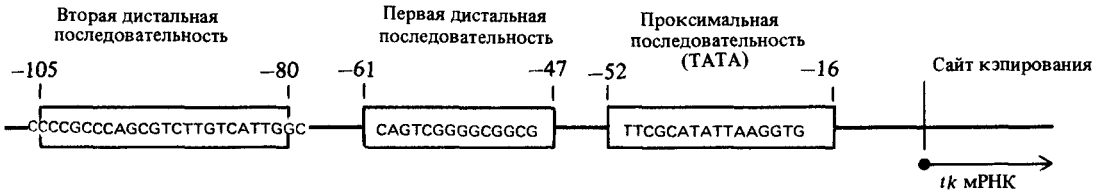


Рис. 16.4. Нуклеотидные последовательности, существенные для транскрипции гена *tk*. Идентификация этих последовательностей основана на данных по транскрипции клонированных мутантных генов, показанных на рис. 16.3, в ооцитах *Xenopus*. (По Knight S. L., 1982. Cell, 31, 355.)

ТАТА-последовательность, необходим для точного выбора начальной точки транскрипции. Изменения в этом участке приводят к тому, что транскрипция инициируется на других нуклеотидах и с гораздо более низкой частотой.

Рассмотренные эксперименты убедительно свидетельствуют о том, что район, содержащий ТАТА-последовательность, образует функционально важные контакты с РНК-полимеразой II, необходимые для ориентации фермента в положении, позволяющем ему начать транскрипцию с правильной точки. Точное функциональное значение более отдаленных участков, отмеченных на рис. 16.4, представляется не столь очевидным. Соблюдение фиксированного расстояния между дистальными участками и ТАТА-последовательностью не является необходимым условием эффективной транскрипции (вспомним, что расстояние между участками -10 и -35 в прокариотических промоторах, напротив, является критическим). Об этом свидетельствуют результаты экспериментов, отраженные на рис. 16.5. Транскрипционная активность некоторых мутантов указывает на то, что РНК-полимераза II не образует контактов с дистальными последовательностями и ТАТА-последовательностью одновременно и что другие компоненты, влияющие на транскрипцию, не имеют специфического сродства к дистальным участкам, а вступают во взаимодействие с РНК-полимеразой, зафиксированной в области ТАТА-последовательности. Если бы такие контакты были необходимы, то изменение расстояния между соответствующими участками (см. рис. 16.5) оказывало бы существенное влияние на эффективность транскрипции. Возможное функциональное значение дистальных последовательностей будет обсуждаться в дальнейшем.

Терминация транскрипции считываемых РНК-полимеразой II транскрипционных единиц происходит по-разному в зависимости от организма и от конкретной последовательности. Так, в дрожжах механизм терминации заметно отличается от соответствующего механизма у высших эукариот. За исключением гистоновых мРНК, все молекулы мРНК модифицированы с 3'-конца добавлением polyA-хвоста. Сравнение 3'-концевых участков ряда мРНК позволило выявить наличие универсальной последовательности AAUAAA или очень близкой к ней на расстоянии около 15 нуклеотидов от точки полиаденилирования (рис. 16.6). Эта последовательность отсутствует не только в гистоновых мРНК высших эукариот, но и во всех дрожжевых мРНК. С помощью мутагенеза *in vitro* было показано, что эта последовательность выступает в роли сигнала полиаденилирования новообразованных РНК-транскриптов. Делеция этой последовательности приводит к образованию аномально

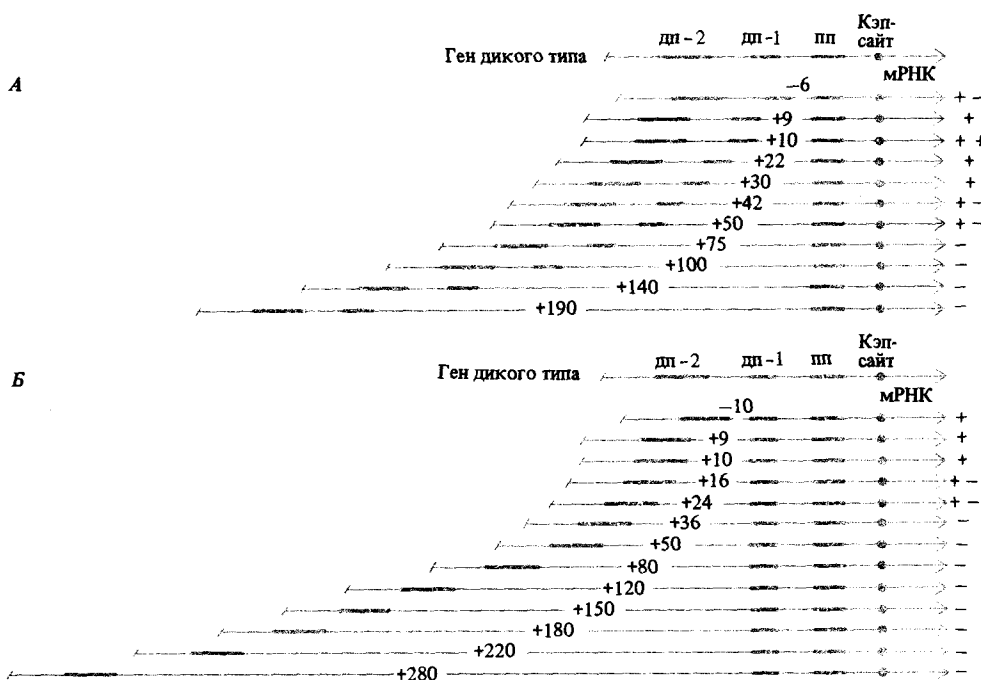


Рис. 16.5. Мутантные гены *tk* с систематически изменяющимися расстояниями между первой и второй дистальной последовательностями и последовательностью ТАТА, полученные с помощью введения делеций или вставок чужеродных фрагментов в ДНК гена дикого типа. Для каждого мутанта указан размер удаленного (-) или встроенного (+) фрагмента ДНК в нуклеотидных парах. Справа приведены данные по оценке эффективности транскрипции мутантных генов

в ооцитах *Xenopus* по сравнению с эффективностью для гена *tk* дикого типа: (+ +) — означает уровень транскрипции, сопоставимый с нормальным; (+ -) — 10–20% от нормального уровня транскрипции; (- -) — менее 10% от нормального; (+ + +) — транскрипционная активность в пять раз выше нормальной. дп — дистальная последовательность, пп — проксимальная последовательность (По McKnight S. L., 1982. Cell, 31, 355.)

длинного транскрипта, полиаденилирование которого происходит после следующего аналогичного сигнала, входящего в состав следующего считываемого сегмента ДНК. Сигнал AAUAAA может находиться на значительном расстоянии от истинной точки терминирования транскрипции. В случае β -глобинового гена млекопитающих сигнал полиаденилирования расположен на расстоянии 1400 нуклеотидов от 3'-конца транскрипта, а истинная природа собственно терминаторного сигнала неизвестна. Очевидно, что расщепление первичного транскрипта РНКазами до сайта полиаденилирования является частью созревания мРНК. С другой стороны, в клетках дрожжей процесс полиаденилирования является частью процесса истинной терминирования транскрипции на терминаторной последовательности, структура которой еще не установлена.

Истинные терминаторные последовательности были идентифицированы в транскрипционных единицах гистоновых генов. Сравнение 3'-концов гистоновых мРНК ряда высших эукариот позволило выявить весьма характерную последовательность, содержащую инвертиро-

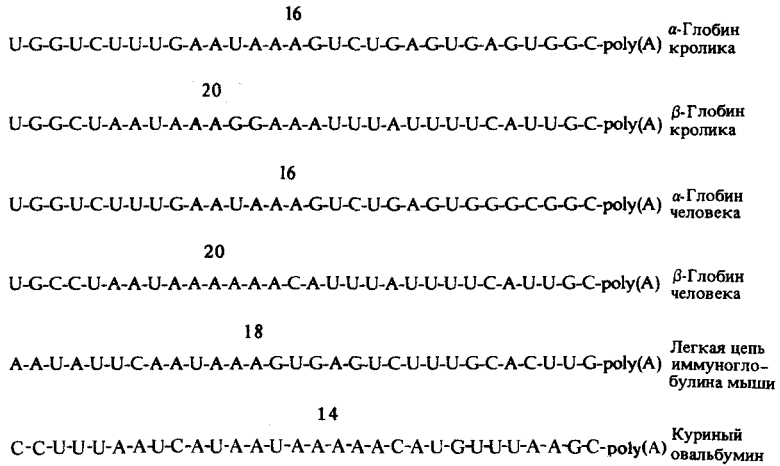
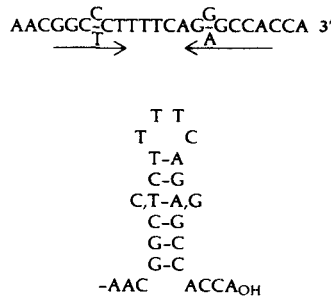


Рис. 16.6. Участки последовательности различных мРНК, предшествующие области посттранскрипционного полиаденилирования. Выделены сегменты, выступающие в роли сигналов полиаденилирования (По Proudfoot N. I., Brownlee G. G., Nature, 263, 211.)

ванные повторы и способную образовывать шпилечную структуру, которая напоминает структуру терминаторов у прокариот (рис. 16.7). Мутагенез *in vitro* клонированного гена гистона морского ежа и анализ транскриптов, образующихся после инъекции мутантных генов в ооциты *Xenopus*, показали, что последовательности ДНК, участвующие в образовании шпилечной структуры, а также концевая последовательность АССА необходимы для правильной терминации транскрипции. В то же время удаление участков ДНК, следующих за АССА-последовательностью, также приводит к аномальной терминации. Это означает, что наличие общей последовательности, изображенной на рис. 16.7, является необходимым, но не достаточным условием нормальной терминации.

В эукариотических клетках присутствуют и две другие РНК-полимеразы. Полимераза I отвечает за транскрипцию рибосомных РНК. Из-за

Рис. 16.7. 3'-Концевые области гистоновых мРНК содержат показанную на рисунке характерную последовательность, способную к формированию шпилечной структуры за счет образования водородных связей между нуклеотидами, помеченными стрелками (По Birchmeier C., Grosschedl R., Birnstiel M. L., 1982. Cell, 28, 739.)



высокой скорости процессинга первичных рибосомальных РНК-транскриптов практически невозможно определить сайты истинной инициации транскрипции. Поэтому структура промоторных последовательностей, узнаваемых РНК-полимеразой I, еще не установлена. РНК-полимераза III участвует в транскрипции сравнительно небольшого числа генов. Среди них гены тРНК и рибосомальных 5SРНК. Полимераза III транскрибирует также некоторые небольшие вирусные гены, входящие в семейство повторов, называемых *Alu*-повторами, широко распространенных в ДНК многих приматов. Функциональное значение семейства *Alu*-транскриптов пока неизвестно. Для выявления регуляторных последовательностей, контролирующих действие РНК-полимеразы III, были использованы эксперименты по мутагенезу *in vitro*, аналогичные рассмотренным для РНК-полимеразы II. В этом случае также было найдено, что для эффективной транскрипции необходимо наличие определенных 5'-фланкирующих последовательностей, расположенных вблизи точки инициации транскрипции. В то же время определенные участки последовательности, необходимые для инициации транскрипции при участии РНК-полимеразы III, были обнаружены также внутри транскрибируемой последовательности. Эти внутренние участки ДНК узнаются специализированными белками, которые специфически изменяют структуру ДНК и (или) участвуют в фиксации РНК-полимеразы в положении, подходящем для правильной инициации транскрипции.

В состав сигналов терминации транскрипции для РНК-полимеразы III входит несколько нуклеотидов из кодирующей области гена. Собственно терминация происходит на АТ-богатом участке, который заканчивается двумя или тремя уридиновыми остатками на 3'-конце соответствующего транскрипта.

Сплайсинг гяРНК - транскриптов

Типичная организация транскрипционной единицы РНК-полимеразы II показана на рис. 16.8. О существовании интронов, разделяющих смысловые участки многих генов, кодирующих белки эукариот, уже говорилось в гл. 11. Созревание первичных РНК-транскриптов, включающее удаление интронов (сплайсинг) с образованием цитоплазматических мРНК, может служить в качестве еще одного уровня контроля экспрессии генов. Было обнаружено также, что возможность альтернативного сплайсинга позволяет расширить кодирующий потенциал данной транскрипционной единицы.

Сравнение последовательностей на границах 5'-экзон-3'-интрон и 5'-интрон-3'-экзон для ряда гяРНК различных типов эукариотических клеток позволило выявить общие для всех случаев пары нуклеотидов (рис. 16.8). На 5'-конце интрона всегда находится пара GU, а на 3'-конце - почти всегда пара AG. Эти характерные особенности дают основания предположить существование некоторого общего механизма точного вырезания интронов и соединения экзонов в ходе созревания гяРНК.

Сплайсинг обычно начинается после полиадезилации транскрипта и, вероятно, достаточно жестко контролируется. В транскриптах, содержащих ряд интронов, ошибочный сплайсинг, например между 5'-концом одного интрона и 3'-концом второго с удалением соответ-

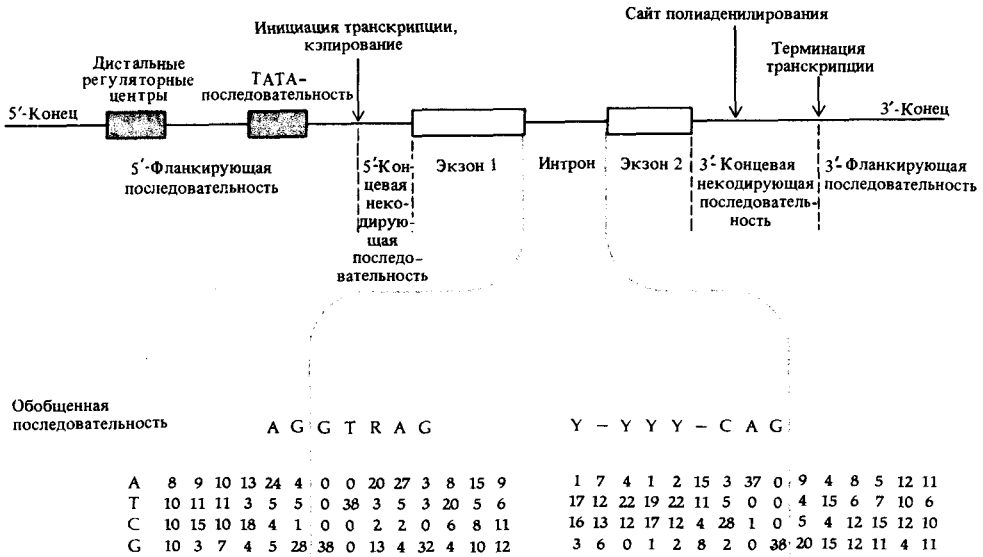


Рис. 16.8. Структурная организация типичной транскрипционной единицы, считываемой РНК-полимеразой II (без соблюдения масштаба). Число экзонов и интронов для различных транскрипционных единиц варьирует в весьма широких пределах. Показана только некодирующая цепь ДНК.

Приведена обобщенная последовательность участков сплайсинга. Эта последовательность выведена на основании сравнительного анализа 38 различных последовательностей на границах между экзонами и интронами (данные приведены внизу рисунка).

ствующего экзона, — явление чрезвычайно редкое. В каждом случае происходит удаление всех интронов по отдельности. В то же время порядок удаления интронов может быть различным. Этот процесс в данном транскрипте не обязательно начинается с 3'- или 5'-концевого интрона. Следовательно, может существовать несколько различных интермедиа-тов на пути к одной и той же мРНК.

В то же время альтернативный сплайсинг действительно имеет место и так же жестко контролируется в соответствии, например, с типом клеток, со стадией развития, а также со стадией инфекции вирусами типа SV40 или аденовирусами. По мере детального изучения различных транскрипционных единиц становится известно все большее и большее число примеров альтернативного контролируемого сплайсинга, приводящего к образованию различных зрелых мРНК из одного первичного транскрипта. Альтернативный сплайсинг, вероятно, очень характерен для основных регуляторных генов, например для комплекса *bithorax* у *Drosophila* (см. гл. 17), в системе иммунного ответа у млекопитающих и в организации экспрессии генов нейроэндокринной системы.

Кальцитонин — это полипептидный гормон, продуцируемый клетками щитовидной железы и играющий регуляторную роль в метаболизме кальция. Исследования продукции кальцитониновой мРНК в культуре клеток опухоли щитовидной железы крысы выявили спонтанные изменения типов мРНК, образующиеся в ходе созревания первичного транскрипта кальцитонинового гена. С использованием рекомби-

нантных ДНК-зондов для кальцитониновой мРНК исследователям удалось обнаружить, что различные клеточные линии, производные исходной опухолевой линии, продуцируют различные мРНК, родственные кальцитониновой или CGR-мРНК (от англ. *calcitonin gene-related*). Один из видов CGR-мРНК в больших количествах присутствует в клетках гипоталамуса, которые в норме продуцируют очень мало собственно кальцитониновой мРНК. С другой стороны, в обычных клетках щитовидной железы производится значительное количество именно кальцитониновой мРНК. Специфический для каждой из желез уровень продукции этих двух родственных мРНК определяется альтернативным сплайсингом, проиллюстрированным на рис. 16.9. Очевидно, клетки различного типа, входящие в состав сложного многоклеточного организма, способны осуществлять специфический контроль сплайсинга и тем самым обеспечивать синтез сходных, но не идентичных полипептидов, проявляющих различные (но, вероятно, родственные) функции.

Механизм сплайсинга и факторы, определяющие его специфичность, пока почти неизвестны. Известно, что молекулы гЯРНК исходно связаны с набором так называемых малых ядерных рибонуклеопротеидов (мяРНП). Судя по всему, каждая молекула мяРНП состоит из специализированных белков, связанных с одним из видов малой ядерной РНК (мяРНК), обозначенных U1, U2, U4, U5 и U6, содержащихся в ядре в значительных количествах. Изучению мяРНП в немалой степени способствовало обнаружение у больных красной волчанкой (аутоиммунное ревматическое заболевание) антител, специфически взаимодействующих с некоторыми видами мяРНП из различных организмов. Это свидетельствует о высокой консервативности определенных видов мяРНП.

Удобной модельной системой для изучения сплайсинга оказались ядра клеток, инфицированных аденовирусом, в которых происходит процесс созревания аденовирусных мРНК. Можно полагать, что ранний этап экспрессии вирусных генов основан на использовании обычного клеточного аппарата сплайсинга. Участие в этом процессе мяРНП было выявлено благодаря тому, что антитела к мяРНП, полученные от больных волчанкой, специфически ингибируют ранние этапы сплайсинга при созревании аденовирусной мРНК. Вероятно, наиболее существенную роль в раннем вирус-специфическом сплайсинге играют мяРНП, содержащие мяРНК типа U1.

На ранних этапах сплайсинга аденовирусной гЯРНК происходит процессинг по участкам соединения интрон-экзон и экзон-интрон, которые соответствуют структуре обобщенной последовательности, показанной на рис. 16.8. Характерно, что 5'-концевая последовательность мяРНК U1 комплементарна обобщенным 5'- и 3'-концевым последовательностям интронов. Это означает, что за счет комплементарного связывания соответствующих участков интронов и мяРНК U1 может достигаться сближение концевых последовательностей данного интрона, обеспечивающее их взаимную ориентацию, необходимую для правильного сплайсинга (рис. 16.10, А). Более того, оказалось, что мяРНК U2 содержит участок, комплементарный концевым последовательностям некоторых экзонов, соединение которых в ряде мРНК происходит после удаления соответствующих интронов (рис. 16.10, Б). Это свидетельствует о том, что мяРНП представляет собой по крайней мере часть молекулярного аппарата сплайсинга.

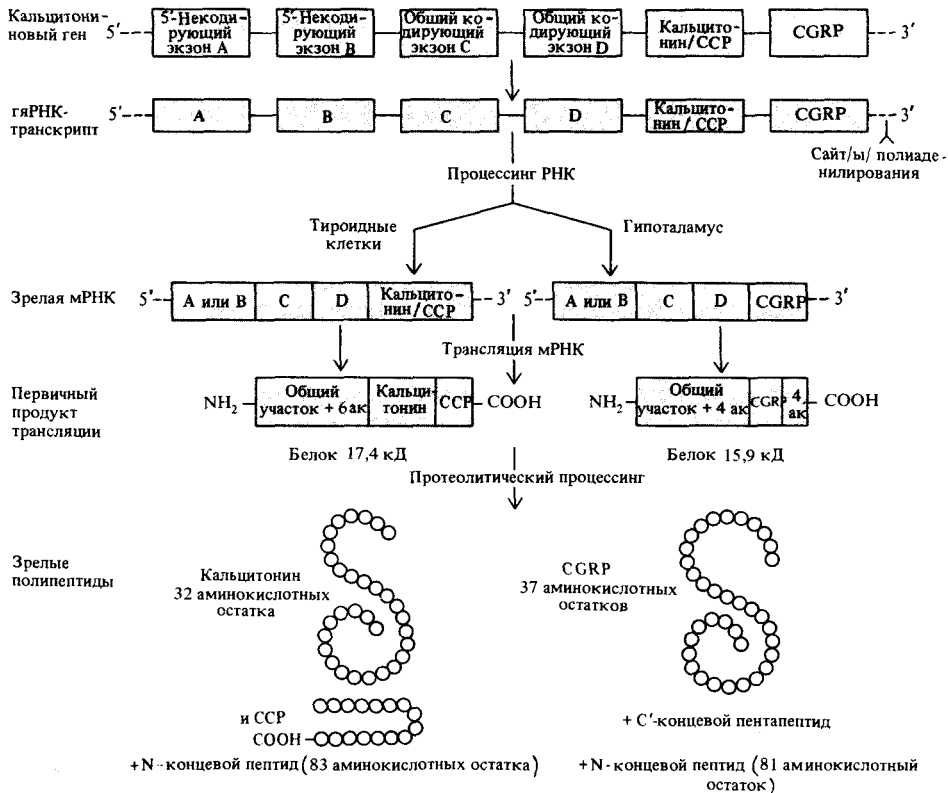


Рис. 16.9. Модель альтернативного сплайсинга гяРНК, обеспечивающего продукцию кальцитонина и кальцитониноподобного пептида (CGRP) в тироидных клетках и клетках гипоталамуса соответственно. (По *Amara S.G. et al.*, 1982. *Nature*, 298, 240.)

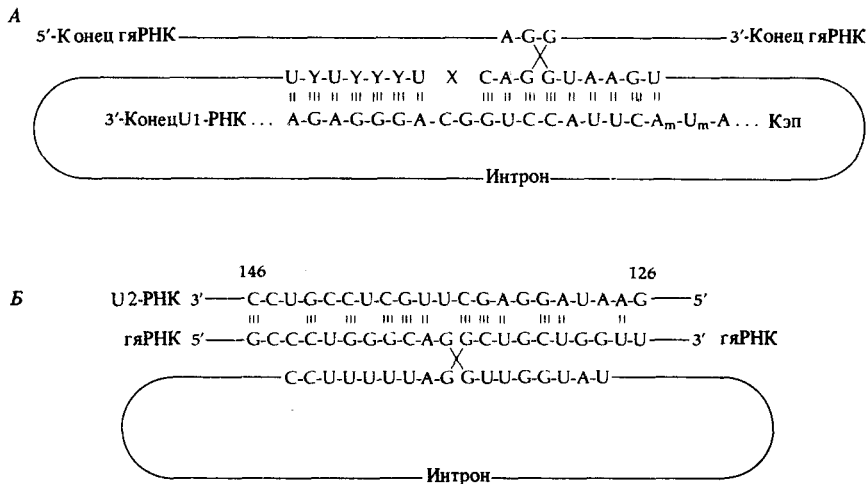


Рис. 16.10. Возможные варианты участия мяРНК U1 и U2 в удалении интронов из гяРНК. А. Молекула U1 образует систему водородных связей с 5'- и 3'-концевыми участками интрона, сближая концы соседних экзонов. (По *Lerner M.R. et al.*, 1980. *Nature*, 283, 220.) Б. Молекула U2 образует водородные связи с 5'- и 3'-концами соседних экзонов, что сопровождается «выплетыванием» соответствующего интрона, способствующим его удалению. (По *Ohshima Y et al.*, 1980. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78, 4471.)

Транскрипция и структура хроматина

Гигантские молекулы ДНК в ядрах эукариотических клеток чрезвычайно плотно упакованы в хроматиновую структуру, которая представляет собой иерархическую систему сверхспирализации нуклеосомно-связанной ДНК. Образование спиралей высших порядков, которые описывались в гл. 4, несомненно, делают ДНК недоступной для действия транскрипционного аппарата клетки. Процесс транскрипции связан с определенными изменениями в структуре хроматина.

Клонированные фрагменты ядерной ДНК могут быть использованы в качестве радиоактивных зондов для изучения изменений в структуре хроматина, которыми сопровождается транскрипция соответствующих генов. Об изменениях в структуре хроматина в области интенсивно транскрибируемых последовательностей свидетельствует их повышенная чувствительность к расщеплению ДНКазой I. О способах обнаружения такого рода структурных изменений подробнее рассказывается в *Дополнении 16.1*.

Считают, что повышение чувствительности к ДНКазе I в области активных генов связано с образованием открытых участков хроматина. Даже на таких открытых участках ядерная ДНК остается все же более устойчивой к действию ДНКазы, чем свободная ДНК, вероятно, за счет сохранения связи с нуклеосомами. Размер открытых участков хроматина, которые в большей степени, чем компактные участки, доступны действию ДНКазы, может достигать нескольких тысяч нуклеотидных пар. Это означает, что так называемые хроматиновые домены по размеру значительно превышают обычные транскрипционные единицы.

Экспериментальные приемы, описанные в *Дополнении 16.1*, были использованы также для изучения структуры хроматина внутри активных доменов. При обработке ядер даже небольшими количествами ДНКазы I в структуре открытых участков удается выявить наличие гиперчувствительных областей. С помощью радиоактивных зондов, полученных на основе очень небольших рестрикционных фрагментов из различных участков определенного гена, удалось установить, что гиперчувствительные области располагаются в 5'-фланкирующей последовательности ДНК активной транскрипционной единицы. Так, гиперчувствительный участок, прилегающий к гену *tk* вируса герпеса, локализуется в области от -4 до -182 п.н. (см. рис. 16.4), включая как ТАТА-последовательность, так и дистальные последовательности, необходимые для инициации транскрипции. Было установлено, что наличие гиперчувствительных к ДНКазе участков в 5'-концевой области транскрипционной единицы является характерной особенностью активно транскрибируемых генов. По крайней мере в некоторых случаях эти участки оказываются также чувствительными к действию эндонуклеазы S1, расщепляющей одноцепочечную ДНК, что указывает на возможность возникновения в гиперчувствительной области неканонических структур ДНК.

Дополнение 16.1. Исследование структуры хроматина

Структуру участков хроматина, содержащих гены, клонированные в составе рекомбинантных векторных ДНК, можно изучать непосредственно на интактных ядерных ДНК, в качестве критерия используя различия в чувствительности к действию нуклеаз. Участки ДНК, входящие в область «открытых» хроматиновых структур, более доступны нуклеазной атаке, чем участки, существующие в виде более компактных структурных образований.

Для обнаружения таких участков ДНК проводят мягкое разрушение клеток, не сопровождающееся разрушением ядер. Аликвоты ядерной фракции подвергают действию возрастающей дозы нуклеазы типа ДНКазы I, которая вносит одноцепочечные разрывы в двухцепочечную ДНК. После этого из каждой аликовоты выделяют ДНК и подвергают ее расщеплению определенной рестриктазой. Полученные препараты анализируют с помощью электрофореза и гибридизации по Саузерну

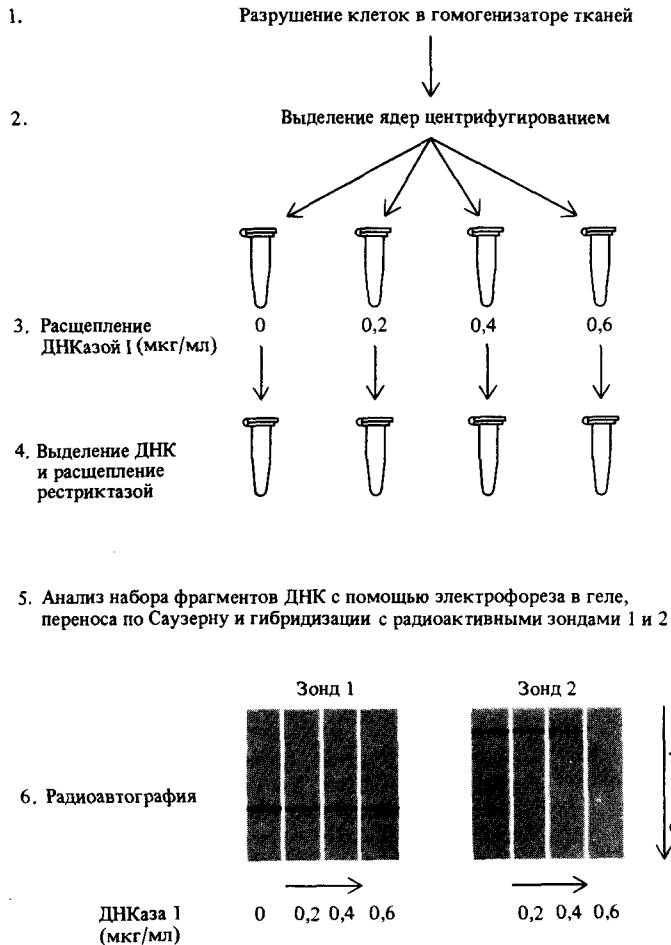


Рис. 16.11. Обнаружение участков хроматиновой ДНК, чувствительных к расщеплению ДНКазой I. Рестрикционный фрагмент, выявляемый по гибридизации с зондом 1, устойчив к ДНКазе I, вероятно, ввиду защитного действия структуры соответствующего участка хроматина. Напротив, другой рестрикционный фрагмент, гибридизующийся с зондом 2, чувствителен к действию ДНКазы I. С увеличением концентрации фермента в реакционной смеси количество соответствующего фрагмента убывает.

(см. гл. 9). В качестве зонда для локализации искоемых рестрикционных фрагментов после электрофореза используют клонированные радиоактивно меченные фрагменты соответствующих генов.

Обработка ДНКазой I не приводит к изменению положения рестрикционного фрагмента ДНК на электрофореграмме, поскольку точки расщепления ДНКазой I случайным образом распределены по обеим цепям ДНК. Если участок ДНК оказывается доступен действию ДНКазы I (как в случае участка, комплементарного зонду 2, рис. 16.11), то при увеличении

концентрации ДНКазы количество фрагмента в пробе и интенсивность сигнала на радиоавтограмме падают. Такое поведение характерно для транскрипционно активных областей ДНК. Участок ДНК, фрагмент которого гибридизуется с зондом I, ведет себя в данных экспериментах аналогично участкам, расположенным в неактивной области ядерной ДНК: количество фрагмента с увеличением концентрации ДНКазы I практически не меняется, поскольку соответствующий участок недоступен действию фермента.

Таким образом, рассмотренные выше подходы надежно свидетельствуют о существовании в хроматине гиперчувствительных областей ДНК. Они позволяют также выявить корреляцию между транскрипцией и возникновением гиперчувствительных участков вблизи точки инициации транскрипции. В то же время следует помнить, что обнаружение корреляции еще не означает установления точной причинно-следственной связи событий. Лишь в некоторых случаях с помощью генетического анализа удалось показать, что последовательности гиперчувствительных участков ДНК действительно необходимы для инициации транскрипции. Наиболее интересен пример транскрипции гена *Sgs4* *Drosophila*, о котором упоминалось в гл. 9. В 5'-фланкирующей и структурной области этого гена было выявлено пять гиперчувствительных участков (рис. 16.12). Эти участки обнаруживаются только в ДНК, выделенной из ядер клеток слюнной железы в стадии развития, сопровождающейся активной экспрессией гена *Sgs4*. Известны мутанты, которым не свойственна экспрессия этого гена. Соответствующие мутации картируются в 5'-фланкирующей области гена. У двух типов мутантов делетированы наиболее удаленные гиперчувствительные участки ДНК (рис. 16.12). В случае наиболее отдаленной делеции (*Ber*) налицо практически полное отсутствие транскрипции гена *Sgs4*. В хроматине клеток слюнной железы у мутантов *Ber* обычными методами в районе гена

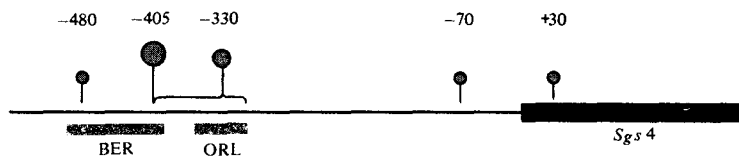


Рис. 16.12. Участки, гиперчувствительные к ДНКазе I в области 5'-конца гена *Sgs4* и в предшествующей области ДНК из ядер клеток слюнной железы *Drosophila*. Размеры серых кружков отражают относительную чувствительность соответствующих участков к ДНКазе I. Фи-

гурной скобкой отмечен весьма протяженный гиперчувствительный участок в области -330. Внизу отмечены две делеции, упомянутые в тексте. (По Shermoen A. W., Beckendorf S. K., 1982. Cell, 29, 601. Copyright 1982 M. I. T.)

Sgs 4 не удается обнаружить гиперчувствительные участки, выявляемые в норме, в том числе и те, которые локализируются вне области делеции. Напротив, в случае делеции *ORL* уровень транскрипции гена *Sgs 4* составляет 1–3% от нормального, а при обычном картировании гиперчувствительных участков удается выявить все, кроме участка ДНК, затронутого делецией. Очевидно, различные гиперчувствительные участки по-разному влияют на процесс транскрипции гена *Sgs 4*. Судя по всему, наиболее отдаленный (дистальный) участок необходим для изменения структуры хроматина в области протяженностью около 500 п.н. Наличие этого участка – необходимое условие инициации транскрипции. Второй участок в последовательности ДНК, вероятно, также требуется для нормального осуществления транскрипции, однако он едва ли непосредственно вовлечен в изменение структуры хроматина.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что так же, как и в случае прокариотических генов, участки ДНК, предшествующие последовательностям эукариотических генов, необходимы для регуляции экспрессии этих генов. Однако в отличие от прокариотических генов некоторые из этих участков могут использоваться для регуляции структуры хроматина, в то время как другие могут участвовать в регуляции структуры самой ДНК, выступая в качестве необходимых компонентов в процессе точного взаимодействия РНК-полимеразы с ТАТА-последовательностью перед началом транскрипции гена.

Был выдвинут целый ряд правдоподобных и даже взаимно не исключающих друг друга гипотез относительно функционального значения 5'-фланкирующих последовательностей. Характерно, что все они основаны на представлении об участии специфических регуляторных

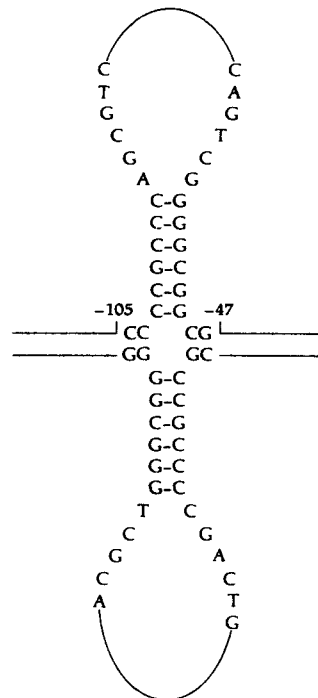


Рис. 16.13. Крестообразная шпильчатая структура, которую может принимать 5'-фланкирующая область ДНК гена *tk*. Считается, что образование водородных связей между комплементарными участками первой и второй дистальной последовательности (см. рис. 16.4) может делать структуру такой двойной шпильки достаточно стабильной.

белков, которые пока еще не были идентифицированы. Вышеупомянутые регуляторные гипотезы включают следующие предположения:

1. Гиперчувствительные участки ДНК могут возникать за счет действия регуляторных белков, специфически связывающихся с определенными последовательностями, вытесняющих эти последовательности из контакта с нуклеосомами. В результате структура данного участка ДНК меняется таким образом, что он становится аномально чувствительным к расщеплению ДНК-азой I.
2. Гиперчувствительные участки могут содержать особые последовательности, которые сами по себе способствуют локальному изменению конфигурации ДНК. Так, первый и второй дистальные участки, расположенные с 5'-конца по отношению к ТАТА-последовательности гена *tk* (рис. 16.4), содержат инвертированные повторы, которые могут формировать альтернативную крестообразную структуру (см. рис. 16.13).
3. Гиперчувствительные участки могут содержать последовательности или находиться рядом с последовательностями, которые способствуют переходу ДНК из В- в Z-форму. Такой переход будет изменять число правосторонних витков спирали и таким образом способствовать образованию открытой структуры. Этот эффект может сказываться на достаточно отдаленных участках спирали и тем самым обеспечивать необходимое изменение структуры ДНК в области инициации транскрипции.

Согласованная регуляция экспрессии генов

Несцепленные гены в клетке могут подвергаться согласованной регуляции для обеспечения эффективного ответа на такие внешние факторы, как присутствие в среде гормонов, рост ткани за счет клеточной пролиферации, стрессовые факторы, типа голодания или теплового шока. Ключ к пониманию механизмов, обеспечивающих согласованную регуляцию, может быть найден при сравнении 5'-фланкирующих последовательностей согласованно регулируемых транскрипционных единиц. Примеры, приведенные в табл. 16.3, указывают на то, что для генов, подверженных согласованной регуляции, характерно наличие сходных коротких последовательностей, расположенных на различном расстоянии от точки инициации транскрипции. В ряде случаев с помощью анализа мутантов показано, что такие общие последовательности действительно необходимы для индукции. Так, в дрожжевом гене *his 4* в 5'-концевой области содержатся три очень сходных по структуре повтора, которые присутствуют также в других генах биосинтеза аминокислот. Для предотвращения индукции гена в ответ на аминокислотное голодание необходима делеция всех трех повторов, которая в то же время не сказывается на обычном конститутивном уровне экспрессии гена *his 4*.

Синтез небольшого числа белков в ответ на тепловой шок (выдерживание при температуре выше физиологической) является характерной защитной реакцией практически любых эукариотических клеток. В случае *Drosophila* гены, кодирующие такие белки, подробно охарактеризо-

Таблица 16.3. Наборы согласованно регулируемых генов, содержащих общие 5'-концевые повторы

Организм	Ген	Регуляция	Обобщенная последовательность	% гомологии с обобщенной последовательностью	Положения	
Дрожжи	<i>his 1</i>	Индукция аминокислотным голоданием	A ^A _T GTGACTC	89	-334, -319	
	<i>his 3</i>			78	-170, -73	
	<i>his 4</i>			89	-99, -33	
						-195, -183
						-139, -88
	<i>tpr 5</i>			78	-190, -65	
<i>Drosophila</i>	<i>hsp 70(87A7)</i>	Индукция тепловым шоком	CTNGAATNTTCTAGA	85	-62	
	<i>hsp 70(87C1)</i>					
	<i>hsp 83</i>			92	-74	
	<i>hsp 26</i>			85	-62	
	<i>hsp 27</i>			54	-68	
	<i>hsp 68</i>			69	-61	
	<i>hsp 23</i>			62	-75	
	<i>hsp 22</i>			85	-147	
Шелкопряд (<i>A. polyphemus</i>)	Поздние хорионовые гены: 401	Экспрессия в период хориогенеза	T ^A _T CGTGAA ^G _C TT ^T _C TAT	80	-87	
	18					
	Средние хорионовые гены: 292					
	10		TG ^T _A TANNNAAT ^A _T	58	-87	
Человек	Проопиомеланокортин	Репрессия глюкокортикоидами	TNAAGAGGAANAAGACGA [*] CATGA	67	-486	
Мышь	MMTV**	Индукция глюкокортикоидами		95	-392	
Крыса	Гормон роста	Индукция глюкокортикоидами		95	-392	
Курица	Кональбумин	Стероид-индуцируемые белки яичного белка	AAAATGGGC	100	-140	
	Лизоцим			78	-142	
	Овальбумин			89	-140	

* Остаток, отмеченный звездочкой, отсутствует в одной из последовательностей.

** Вирус рака молочной железы у мышей. Отмеченная последовательность находится со стороны 5'-конца от точки инициации вирусной РНК внутри области вирусного длинного концевой повтора.

По Davidson E. H., Jacobs H. T., Britten R. J., 1983 Nature, 301, 468.

ваны. 5'-Концевые области этих генов проявляют значительное структурное сходство. Обобщенная последовательность, характерная для генов этого типа, представлена в табл. 16.3. При введении одного из клонированных генов теплового шока *hsp 70*, содержащего неповрежденную 5'-концевую последовательность, в культуру клеток млекопитающих наблюдалась транскрипция этого гена в ответ на тепловой шок. Делеция этой последовательности предотвращает транскрипцию клонированной ДНК в ответ на тепловой шок. Более того, если с помощью рекомбинации *in vitro* эту последовательность вместе со всей остальной 5'-фланкирующей областью ДНК *hsp 70* присоединить к гену *tk* вируса герпеса, то в ответ на тепловой шок наблюдается транскрипция гена *tk*.

Взаимосвязь 5'-фланкирующих последовательностей, необходимых для индукции, и гиперчувствительных участков еще окончательно не установлена. Последовательность, необходимая для транскрипции гена *hsp 70* в ответ на тепловой шок, расположена внутри гиперчувствительного участка перед геном. В то же время гены теплового шока *Drosophila* содержат гиперчувствительные участки и в отсутствие теплового шока. Таким образом, в этом случае образование открытой структуры хроматина может быть необходимым условием, но в то же время оно, вероятно, не является фактором, непосредственно активирующим транскрипцию.

Эти примеры, так же как и те, что были рассмотрены ранее, указывают на то, что 5'-фланкирующие последовательности в ряде транскрипционных единиц, вероятно, взаимодействуют с позитивными регуляторными элементами (по всей видимости, белковой природы). Если бы на эти последовательности действовали также отрицательные регуляторные элементы (репрессоры), то можно было бы ожидать, что по крайней мере некоторые мутации, вызывающие делеции или иные изменения в этих последовательностях, приводили бы к конститутивной транскрипции, что противоречит имеющимся фактам. Это, однако, не означает, что в эукариотических клетках вообще не существует репрессоров. Данные, указывающие на участие репрессоров в регуляции экспрессии у эукариот, будут представлены в этой главе и гл. 17.

Метилирование ДНК

Единственное модифицированное основание, обычно входящее в состав эукариотических ДНК, — это 5-метилцитозин (m^5C). В ДНК из разных типов эукариотических клеток метилированы от 2 до 7% остатков цитидина. (Единственное исключение — это ДНК *Drosophila* и некоторых других насекомых, которые практически не содержат m^5C .) Почти всегда m^5C встречается в составе динуклеотида CpG; частота метилирования C в паре CpG для различных организмов и типов тканей варьирует в пределах 20–80% (см. Дополнение 16.2). Этот динуклеотид представляет собой «минипалиндром», в связи с этим метилирование в одной цепи всегда сопровождается метилированием соответствующего остатка C в комплементарной цепи.

Дополнение 16.2. Анализ метилирования ДНК

В изучении состояния метилирования эукариотических ДНК важную роль сыграло обнаружение двух рестриктаз *HpaII* и *MspI*, узнающих одну и ту же тетрауклеотидную последовательность CCGG, однако по-разному реагирующих на состояние метилирования внутреннего остатка С. Метилирование этого остатка за-

щищает последовательность от расщепления *HpaII*, но не *MspI*, благодаря чему удается легко тестировать метилирование определенной части динуклеотидных сайтов CpG, входящих в состав узнаваемых этими рестриктазами четверок – CCGG. Так, абсолютно неметилированная ДНК характеризуется одним и тем же

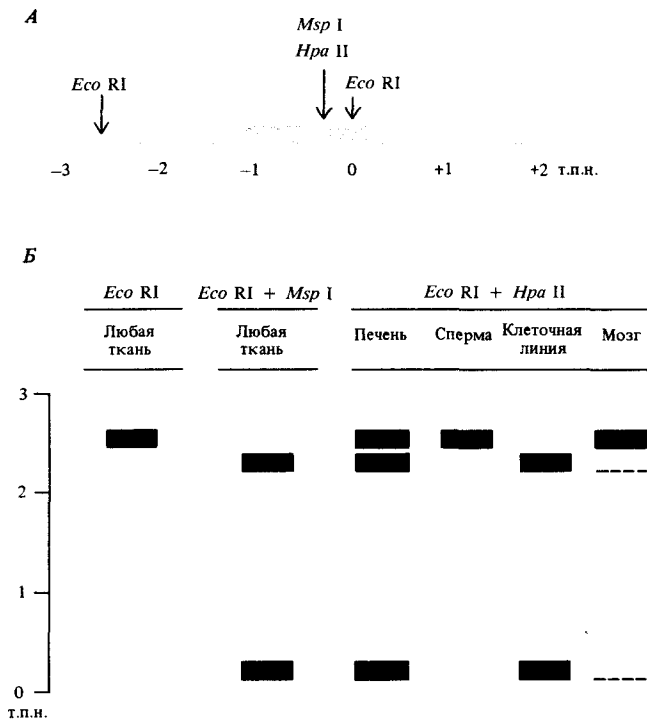


Рис. 16.14. Обнаружение метилированных последовательностей CCGG в β-глобиновом гене кролика. При расщеплении *EcoRI* образуется протяженный фрагмент, содержащий большую часть β-глобинового гена, включая оба интрона (показаны белым) и 5'-фланкирующую последовательность. Этот фрагмент после электрофореза и переноса по Саузерну регистрируется по гибридизации с радиоактивным зондом (слева). Расщепление этого фрагмента рестриктазой *MspI* происходит независимо от степени метилирования содержащихся в нем последовательностей CCGG (середина). Характер расщепления этого же фрагмента рестриктазой *HpaII* позволяет выявить уровень тканеспецифичного метили-

рования CCGG-последовательностей (справа). Данный фрагмент в составе ДНК спермы полностью метилирован, о чем говорит его абсолютная нечувствительность к действию *HpaII*. В то же время этот фрагмент, содержащийся в ДНК, полученной из культуры кроличьих клеток, неметилирован и в одинаковой степени подвержен расщеплению *MspI* и *HpaII*. При изучении ДНК из клеток мозга и печени обнаруживается профиль расщепления, представляющий собой смесь тех, что изображены на рисунке слева и в середине. Таким образом в этих клетках имеет место неполное метилирование соответствующих последовательностей. (По Razin A., Riggs A.D., 1980. Science, 210, 604.)

профилем электрофоретического разделения фрагментов рестрикции как *HpaII*, так и *MspI*. В то же время в случае метилирования одной или более последовательностей CCGG обнаруживаются различия в наборах рестрикционных фрагментов, полученных при обработке ДНК этими рестриктазами (рис. 16.14). Более того, если метилирование некоторого сайта в ДНК не является полным (то есть часть молекул ДНК в популяции метилирована, а часть – неметилирована по данному сайту), то электрофоретический анализ препарата, полученного при обработке ДНК рестриктазой *HpaII*, выявляет картину, которая представляет собой сочетание электрофоретических профилей, показанных на рис. 16.4. Таким образом, при сравнении результатов электрофореза препаратов, полученных при расщеплении ДНК рестриктазами *HpaII* и *MspI*, можно

выявить степень метилирования сайтов CCGG в данном препарате ДНК. Распределение сайтов метилирования в определенных генах можно изучить с помощью переноса и гибридизации по Саузерну электрофоретически разделенных фрагментов рестрикции с использованием в качестве радиоактивных зондов искомым клонированных генов (рис. 16.14). Метилирование тех или иных остатков может быть также выявлено при анализе нуклеотидной последовательности по методу Максама – Гилберта. Метильная группа в m^5C блокирует специфическое расщепление по этому остатку, поэтому отсутствие соответствующего фрагмента в наборе, образуемом при статистическом расщеплении по С, указывает точную локализацию модифицированного основания.

Определенные сайты метилирования в ДНК соматических клеток оказываются метилированными также и в ДНК дочерних клеток. При полуконсервативной репликации последовательности Cm^5CGG , в которой метилированы обе цепи, дочерние ДНК первоначально получают только по одной метилированной цепи. В эукариотических клетках присутствует так называемая поддерживающая метилаза, которая вскоре узнает возникшие при репликации «полуметилированные» сайты и метилирует остаток С в соответствующем сайте новосинтезированной цепи ДНК (рис. 16.15).

В то же время уровень метилирования ДНК в клетках данного типа подвержен изменениям. Изменения в уровне экспрессии генов данной клетки часто сопровождаются процессами метилирования и деметилирования (рис. 16.15) определенных сайтов, расположенных в области ло-

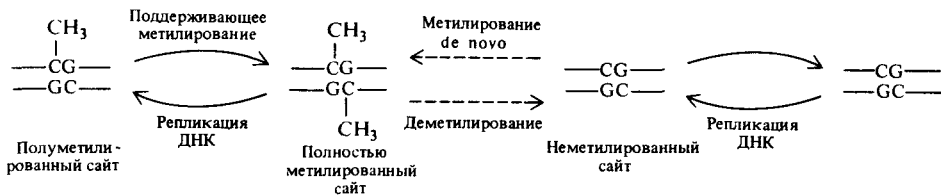


Рис. 16.15. Три возможных состояния метилирования CG-сайтов в двухспиральной ДНК. Полуконсервативная репликация полностью метилированного сайта приводит к образованию полуметилированного сайта, т.е. метилированного только по остатку С родительской цепи. Поддерживающая метилаза узнает такой сайт и метилирует со-

ответствующий остаток новообразованной цепи, наследственно закрепляя таким образом полностью метилированное состояние данного сайта. Поскольку этот фермент узнает только полуметилированные сайты, положение неметилированных сайтов также закрепляется наследственно.

кализации генов, для которых наблюдается изменение уровня экспрессии. Появление в области генов, расположенных в районах изменения структуры хроматина, новых участков, чувствительных к расщеплению ДНКазой I, как правило, сопровождается по крайней мере частичным деметилированием сайтов Cm^5CGG , находящихся вблизи или внутри соответствующих генов.

Известна также корреляция между протеканием вирусной инфекции и процессами метилирования ДНК. Линия клеток, трансформированных вирусом герпеса Саймири, но не продуцирующих в заметных количествах вирусного потомства, характеризуется высоким внутриклеточным содержанием эписомных копий высокометилированной вирусной ДНК. В то же время клеточные линии, отличающиеся активной продукцией вируса, содержат практически неметилированную вирусную ДНК. Аденовирусная вирионная ДНК также неметилирована. Однако, когда эта ДНК интегрирована в хромосомную ДНК и не транскрибируется, она оказывается метилированной. Аналогично проретровирусная ДНК в клетках, не отличающихся высокой продукцией ретровируса, метилирована. Впрочем, следует отметить, что подобные корреляции сами по себе не могут выявить причинно-следственной связи между метилированием—деметилированием и регуляцией экспрессии.

Прямые эксперименты показали, что метилирование может быть непосредственной причиной инактивации генов. Это можно проиллюстрировать на примере аденовирусной транскрипционной единицы, кодирующей белок, специфически связывающийся с вирусной ДНК, которая была клонирована в векторе рBR322. После инъецирования клонированной ДНК в ядра ооцитов *Xenopus* во фракции РНК удается обнаружить транскрипты аденовирусного гена. Однако в случае предварительного метилирования вирусной ДНК *in vitro* с помощью *Hpa* II транскрипция аденовирусного гена в аналогичных условиях не наблюдается. Характерно, что этот эффект связан с метилированием одной или более специфических $CCGG$ -последовательностей, а не с метилированием как таковым, поскольку обработка ДНК метилазой *Bsu* RI, модифицирующей последовательности $GGCC$, никак не отражается на транскрипции. Пока еще неясно, каким образом метилирование оказывает ингибирующее влияние на процесс транскрипции.

Связь метилирования с процессами регуляции активности генов представляет особый интерес, поскольку, как было отмечено выше, состояние метилирования тех или иных сайтов может закрепляться в ходе передачи наследственной информации при полуконсервативной репликации. Как будет рассмотрено в гл. 17, выбор путей дифференцированного развития клеток в ходе эмбриогенеза закрепляется на уровне точной передачи наследственной информации при пролиферации того или иного типа дифференцированных клеточных линий. Поэтому изменения в распределении метилированных сайтов в процессе эмбрионального развития могут быть положены в основу привлекательной, хотя и непроверенной еще гипотезы, объясняющей каким образом может наследственно закрепляться выбранный путь дифференцированного развития различных зародышевых клеток.

Регуляция гемоглобиновых генов в ходе развития организма

Определенный вклад в формирование представлений о связи регуляции экспрессии генов с развитием организма внесли работы по изучению биосинтеза гемоглобина у птиц и млекопитающих. Молекулы гемоглобинов, как отмечалось в гл. 10, представляют собой тетрамеры, содержащие по две пары глобиновых цепей различного типа. В ходе развития организма наблюдается образование различных вариантов гемоглобина в зависимости от экспрессии различных типов α - и β -глобиновых генов. В табл. 16.4 показан субъединичный состав различных гемоглобинов, образующихся в ходе развития человеческого организма. Экспрессия различных α - и β -глобиновых генов строго упорядочена, но осуществляется различными типами клеток в различных тканях в зависимости от стадии развития эмбриона (рис. 16.16).

С использованием генно-инженерных подходов удалось изучить расположение этих генов в ДНК, а также зарегистрировать изменения структуры хроматина и ДНК, связанные с регуляцией экспрессии этих генов. Как α -, так и β -глобиновые гены образуют кластеры тесно сцепленных генов. Оба кластера генов были клонированы в виде набора рекомбинантных фаговых векторов, содержащих перекрывающиеся фрагменты глобиновых генов, с использованием методов, описанных в гл. 9. Расположение генов внутри кластеров показано на рис. 16.17. Интересно отметить, что некоторые глобиновые гены представлены более чем одной копией ($\alpha_1, \alpha_2, \gamma^G, \gamma^A$), причем на соответствующей стадии развития происходит одновременная экспрессия обеих копий. Удивительной особенностью организации кластеров оказалось то, что гены в них расположены в соответствии с порядком их экспрессии и все транскрибируются с одной и той же цепи ДНК.

ДНК каждого клонированного гена из обоих кластеров транскрибируется РНК-полимеразой II в системе транскрипции *in vitro* на основе экстракта культуры опухолевых клеток человека. Это свидетельствует о том, что каждый ген представляет собой индивидуальную транскрипционную единицу. Более того, транскрипция *in vitro* всех зародышевых, эмбриональных и зрелых генов, за исключением δ -глобинового гена, происходит с сопоставимой эффективностью. Таким образом, регуляция транскрипции глобиновых генов в ходе развития, вероятно, определяет

Таблица 16.4. Субъединичный состав гемоглобинов, образующихся на различных стадиях онтогенеза у человека

Стадия развития	Тип гемоглобина	α -Подобные цепи	β -Подобные цепи
Эмбриональная	G1	ξ_2	ϵ_2
	G2	α_2	ϵ_2
	P1	ξ_2	γ_2
Фетальная	F	α_2	G_{γ_2}
	F	α_2	A_{γ_2}
	A	α_2	β_2
Взрослый организм	A	α_2	β_2
	A2	α_2	δ_2

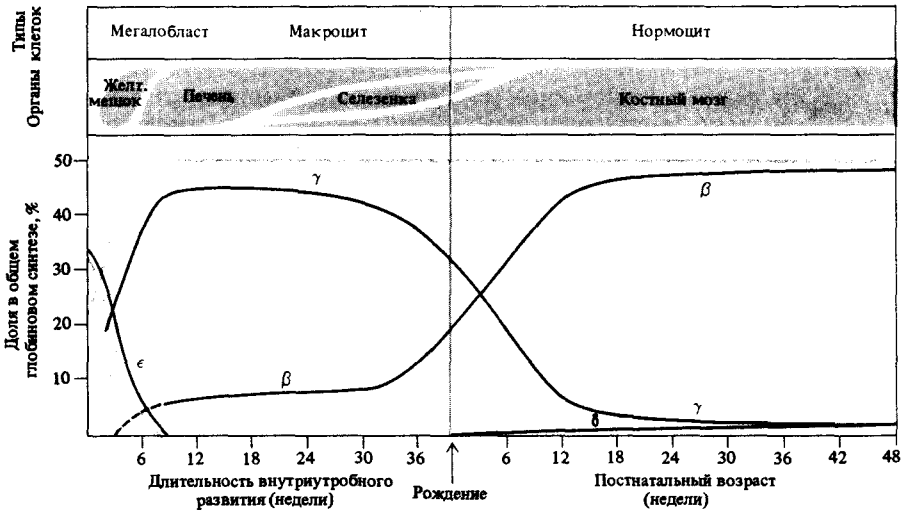


Рис. 16.16. Изменения в синтезе глобиновых полипептидов в ходе развития человеческого организма. Наверху указаны типы клеток и соответствующих органов, в которых про-

исходит наработка глобиновых цепей. α -Подобные глобиновые цепи – цветные линии; β -подобные цепи – черные линии. (По Wood W.G., (1976). Br. Med. Bull. 32, 282.)

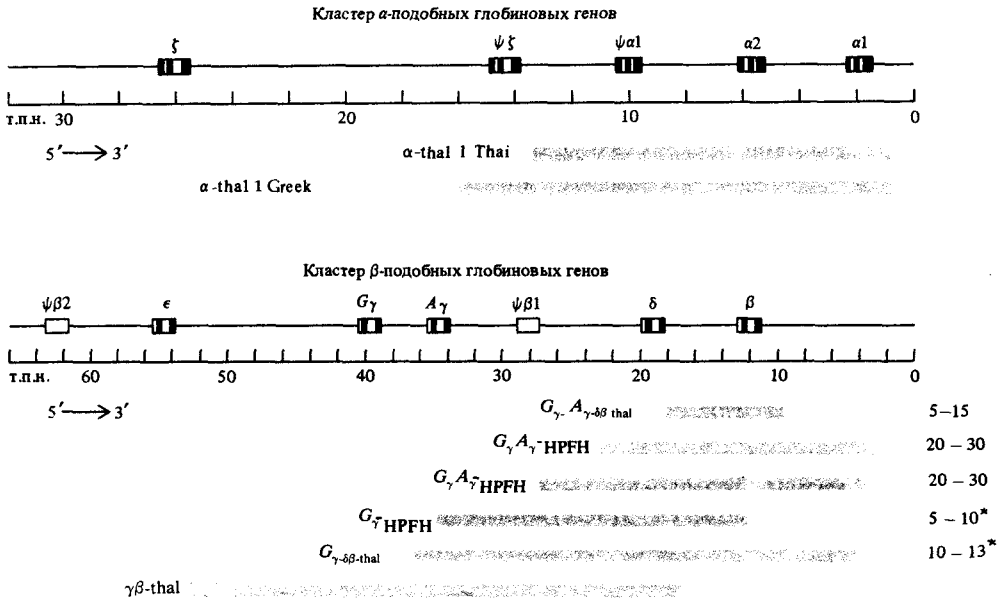


Рис. 16.17. Организация ДНК в кластерах α -подобных и β -подобных глобиновых генов. Черные сегменты – экзоны; белые – интроны. Показаны также неэкспрессируемые псевдогены (ψ). Приведены данные о величине и локализации делеций, наблюдаемых при различных вариантах талассемии (см. в тексте). Заштрихованные сегменты по краям отражают неоднозначность в определении кон-

цевых участков ряда делеций. Справа приведены данные о процентном содержании HbF, наблюдаемом при гетерозиготности по соответствующим делециям. Звездочка означает, что образующийся HbF (фетальный гемоглобин) содержит из β -подобных цепей только цепи типа G_γ . (По Maniatis T. et al., 1980. Annu. Rev. Genet., 14, 145.)

ся дифференцированной репрессией определенных генов кластера. Если бы для транскрипции определенных глобиновых генов требовалось наличие специфических активаторов, то пришлось бы считать, что все они присутствуют в культуре опухолевых клеток. В то же время в этой культуре клеток не наблюдается экспрессии нормальных копий генов. Отсутствие активности глобиновых генов в большинстве клеточных линий и избирательная активность лишь некоторых генов на определенных стадиях развития указывают на их репрессию, которая может достигаться, например, за счет маскирования генов в неактивных компактных участках хроматиновой структуры.

Некоторые общие особенности регуляции экспрессии эукариотических генов, рассмотренные в предшествующих разделах, распространяются и на процессы регуляции гемоглобиновых генов, которые зависят от стадии развития организма. С этой точки зрения наиболее подробно изучались кластеры куриных глобиновых генов, что связано в первую очередь с доступностью соответствующих гемоглобин-продуцирующих клеток на любой стадии развития. Установлено, что каждый из кластеров располагается в хроматиновом домене, который у гемоглобин-продуцирующих клеток более чувствителен к действию ДНКазы I, чем у клеток других тканей. Более того, в хроматине гемоглобин-продуцирующих клеток обнаружены участки, гиперчувствительные к ДНКазе I, расположенные перед сайтами инициации транскрипции активно транскрибируемых глобиновых генов. В хроматине клеток тканей иного типа аналогичные участки не обнаруживаются. В гемоглобин-продуцирующих клетках взрослой особи инактивация эмбриональных глобиновых генов коррелирует с исчезновением гиперчувствительных участков, предшествующих сайтам инициации транскрипции этих генов. Наблюдается также пониженный уровень метилирования сайтов CG внутри и вблизи активно транскрибируемых последовательностей. Инактивация эмбриональных генов, напротив, сопровождается повышением уровня метилирования соответствующих сайтов. Таким образом, имеются характерные различия в структуре хроматиновых доменов, содержащих кластеры α - и β -подобных глобиновых генов, в клетках эмбриона и взрослого организма. Поскольку на различных стадиях развития продукция гемоглобина обеспечивается клетками определенного типа, можно полагать, что связанная с развитием регуляция глобиновых генов сопровождается поэтапным установлением в этих клетках альтернативных вариантов структуры соответствующих областей хроматина. Безусловно, многое еще предстоит узнать о природе регуляторных молекул, ответственных за установление различных вариантов хроматиновой структуры, а также о том, на какие последовательности ДНК действуют эти регуляторные молекулы.

При изучении кластеров глобиновых генов была обнаружена их еще одна удивительная особенность. Оказалось, что в каждом кластере содержится последовательности, которые гибридизуются с клонированными α - и β -глобиновыми зондами и в то же время не направляют синтеза каких-либо полипептидов. Подобные последовательности, названные псевдогенами ($\psi\alpha$, $\psi\beta$ – рис. 16.17), были обнаружены в ДНК целого ряда млекопитающих, как в кластерах α - и β -подобных глобиновых генов, так и в других областях генома. Псевдогены были обнаружены и при изучении других семейств эукариотических генов. У псевдогенов при сравнении с истинными (активными) генами обнаруживаются разноо-

бразные небольшие изменения нуклеотидной последовательности. Многие из этих изменений непосредственно предотвращают экспрессию за счет небольших делеций или вставок, сбивающих рамку считывания и приводящих к обрыву трансляции на возникающих в рамке терминаторных кодонах. Псевдогены можно, вероятно, считать своего рода обломками, которые накапливаются в геноме в результате разного рода эволюционных процессов.

Целый ряд человеческих генетических заболеваний связан с изменениями в экспрессии генов α - и β -подобных глобиновых кластеров. К таким заболеваниям относится талассемия, при которой наблюдается в той или иной степени выраженное нарушение баланса синтеза α - и β -глобиновых цепей, приводящее к анемии различной тяжести. Классификация талассемических заболеваний основана на том, какие из генов оказались подвержены изменениям в уровне экспрессии. В случае α -талассемии различают формы α^+ и α^0 в зависимости от того, происходит или вовсе не происходит синтез каких-либо α -глобиновых полипептидов. Аналогичным образом в случае β -талассемии различают формы β^+ и β^0 . На основании изучения множества случаев талассемии можно утверждать, что мутации, вызывающие это заболевание, могут влиять на экспрессию соответствующих генов на любом уровне, начиная от стадии инициации транскрипции и до сплайсинга трансляции мРНК и образования стабильных глобиновых цепей.

Дополнительные представления о регуляции глобиновых генов в ходе развития организма удалось получить при изучении фенотипических проявлений делеций определенных генов глобиновых кластеров. Такие делеции, удаляющие один или более генов из кластера, влияют на экспрессию в ходе развития организма оставшихся генов в *цис*-положении. Так, две формы α^0 -талассемии вызываются делециями генов $\alpha 1$ и $\alpha 2$ или $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\psi \xi$ (рис. 16.17). Гомозиготность по каждой из форм вызывает синдром, называемый водянкой плода, при котором совершенно не синтезируются α -глобины, и смерть наступает при рождении или вскоре после него. При этом вплоть до самой смерти продолжается экспрессия ξ -глобинового гена, который в норме на этих стадиях развития совершенно перестает экспрессироваться (рис. 16.16). В то же время экспрессия β -подобных глобиновых генов протекает без всяких изменений – во время происходит «выключение» ϵ -глобинового гена и «включение» γ -глобиновых генов.

Известен также ряд делеций в кластере β -подобных глобиновых генов (рис. 16.17). Некоторые из них (хотя и не все) обуславливают постоянное присутствие и функционирование в клетке фетальных гемоглобинов (HPFH – от англ. *hereditary persistence of fetal hemoglobin*), у взрослых гомозиготных по этому признаку людей клинические симптомы анемии отсутствуют. Фенотип HPFH наблюдается и при гетерозиготности, что указывает на *цис*-действие таких делеций, предотвращающих нормальную репрессию γ -глобиновых генов у взрослого человека. Аномальная экспрессия β -глобиновых генов сопряжена с делециями, отмеченными на рис. 16.17. Поскольку еще одна делеция ($^G\gamma^A\gamma\delta\beta$ -талассемия – см. рис. 16.17), удаляющая только гены δ и β , не связана с фенотипом HPFH, можно полагать, что для нормальной репрессии γ -глобиновых генов на определенной стадии развития необходимо наличие регуляторной последовательности, предшествующей δ -глобиновому гену. Влияние на транскрипцию отдаленных последова-

тельность проявляется и в случае делеции, показанной в нижней части рис. 16.17 (γ - β -талассемия), при которой неповрежденная β -глобиновая транскрипционная единица оказывается тем не менее неэкспрессируемой. Как и в случае кластера α -подобных глобиновых генов, делеции в β -глобиновом кластере не оказывают влияния на нормальную, связанную с развитием регуляцию экспрессии генов другого кластера. Не вызывает сомнения, что существуют особые гены, ответственные за согласованную регуляцию, благодаря которой на определенных стадиях развития организма происходят согласованные изменения в экспрессии генов обоих кластеров.

Контроль экспрессии генов, основанный на перестройках ДНК

В некоторых эукариотических организмах для изменения экспрессии тех или иных генов используются перестройки последовательностей в хромосомных ДНК. Такого рода хромосомные перестройки обнаружены и изучены у таких объектов, как дрожжи *S. cerevisiae*, трипаносомы (возбудители сонной болезни, переносимые мухой цеце) и В-лимфоциты животных, дифференциация которых приводит к появлению в организме множества разнообразных специфических иммуноглобулинов (так называемых антител). Такая широкая филогенетическая распространенность этого феномена привела к предположению о том, что перестройка ДНК также вовлечена в процессы регуляции экспрессии генов в ходе развития организмов.

Типы спаривания у дрожжей

Для дрожжей характерно проявление двух альтернативных вариантов экспрессии определенной группы генов, которые определяют тип спаривания (a или α) индивидуальных клеток. Гаплоидные a -клетки способны узнавать и сливаться с гаплоидными α -клетками с образованием диплоидов (a/α). Диплоидные клетки могут расти в виде диплоидов или при голодании подвергаться мейозу с образованием гаплоидных спор с типами спаривания a или α . При мейозе маркеры a и α расщепляются как аллельные варианты по локусу типа спаривания, который картируется в хромосоме III. Прорастание гаплоидной споры любого типа сопровождается делением клеток за счет почкования. После первого отпочкования клетка приобретает способность к переключению типа спаривания на противоположный как для себя самой, так и для следующей дочерней клетки в ходе второго деления. Таким образом, при каждом последующем делении происходит подобное переключение с частотой около 80%, что приводит к появлению диплоидного потомства гаплоидной споры (рис. 16.18).

Возникает вопрос, каким образом в гаплоидной споры, несущей определенный аллель типа спаривания (a или α), может проявляться генетическая информация, характерная для аллеля альтернативного типа спаривания (α или a соответственно). Детальный генетический анализ этой проблемы позволил сформулировать так называемую *кассетную*



Рис. 16.18. Процесс почкования, связанный с переключением типа спаривания у дрожжей. Показано созревание гаплоидной споры с типом спаривания *a*. После первого отпочкования материнская *a*-клетка приобретает способность к переключению своего типа спаривания и типа спаривания дочерней клетки, возникающей при втором отпочковании. От-

почковавшаяся клетка с исходным типом спаривания не может изменить его, прежде чем сама впервые не подвергнется почкованию. В данном случае такая возможность не успевает реализоваться, поскольку происходит слияние и диплоидизация клеток с различным типом спаривания.

модель интерконверсии типов спаривания. Согласно этой модели, в каждой дрожжевой клетке содержатся локусы обоих типов спаривания в виде молчащих копий (*a* и α), а также локус какого-то одного типа в виде экспрессируемой копии, которая и определяет наблюдаемый тип спаривания (α или *a*). Считают, что переключение типа спаривания представляет собой перенос (транспозицию) генетической информации от одного из молчащих локусов к локусу, собственно и определяющему проявляемый тип спаривания, который сопровождается удалением той информации, которая до этого содержалась в локусе типа спаривания. Процесс переключения контролируется продуктом гена *HO*, мутации которого блокируют процесс переключения.

Использование методов работы с рекомбинантными ДНК позволило довольно быстро подтвердить справедливость кассетной модели. В настоящее время известна структурная организация ДНК как в истинном локусе типа спаривания (*MAT*), так и в области молчащих копий (*HML α* и *HMR α*). Все они расположены на хромосоме III (рис. 16.19). Хромосомы двух альтернативных типов спаривания различаются лишь небольшим негомологичным сегментом ДНК, обозначенным *Y*. Протяженность *Y α* —642 п.н., а протяженность *Y α* —747 п.н. Для обоих типов спаривания характерно наличие трех одинаковых участков последовательности—*W*, *X* и *Z*. В соответствующих молчащих копиях, содержащих последовательность *Y α* или *Y α* , также содержатся все или по крайней мере некоторые из этих общих участков последовательности (рис. 16.19). Процесс переключения представляет собой замену последовательностей *Y α* (или *Y α*), а также общих последовательностей, присутствующих в локусе *MAT*, на соответствующие последовательности одного из молчащих локусов.

Реализация различных вариантов экспрессии определенных генов в случае *a*- или α -клеток обусловлена образованием различных РНК-транскриптов в зависимости от типа последовательности *Y*, присутствующей в локусе *MAT* и содержащей область инициации транскрипции. Характерно, что инициация транскрипции происходит только в области последовательности *Y*, входящей в состав локуса *MAT*, и не происходит на соответствующих последовательностях в локусах *HMR α* и *HML α* , что, вероятно, отражает различия в структуре хроматина в ло-

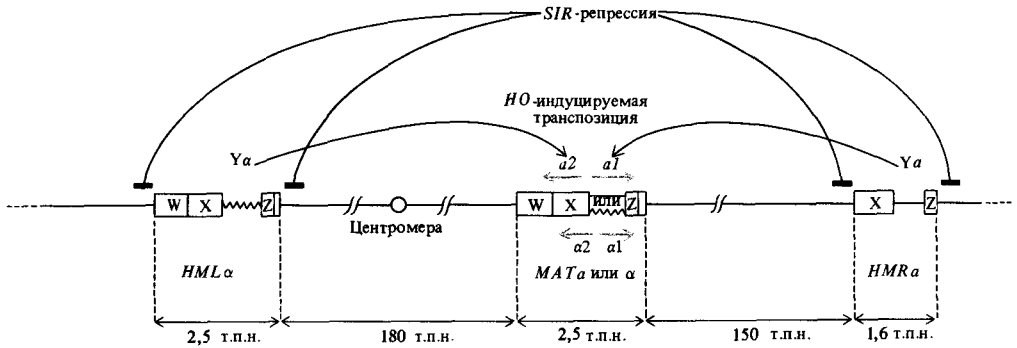


Рис. 16.19. Организация ДНК в локусах *HMLα*, *HMRα* и *MAT* на хромосоме III *S. cerevisiae*. Тип спаривания определяется генами, транскрипция которых инициируется в локусе *MAT* с последовательностью *Ya* или *Yα*. В локусах *HMLα* и *HMRα* транскрипция этих генов подавляется продуктами генов *SIR*. (По Nasmyth K. A., 1982. Annu. Rev. Genet., 16, 439.)

кусе *MAT* и в локусах *HML* и *HMR*. Для подавления транскрипции с *Y*-последовательностей, расположенных в локусах *HML* и *HMR*, необходима экспрессия четырех генов *SIR*. Считают, что продукты этих генов, взаимодействуя с сайтами, расположенными рядом с областями *HML* и *HMR*, индуцируют образование компактной хроматиновой структуры, которая в свою очередь препятствует действию РНК-полимеразы. В то же время продукты генов *SIR* не действуют на locus *MAT*, что открывает возможность инициации транскрипции на расположенной в этом локусе последовательности *Y*.

Направленность переноса информации от *HML* или *HMR* к *MAT*, но не в обратном направлении, возможно, также обусловлена меньшей компактностью структуры хроматина в области *MAT*. Полагают, что ген *HO* кодирует эндонуклеазу, вносящую двуцепочечный разрыв между последовательностями *Y* и *Z*. Такой разрыв может возникать только в области *MAT* и не возникает в идентичных последовательностях, локализованных в рамках *HML* и *HMR*. С образования двуцепочечного разрыва, вероятно, начинается собственно процесс переключения, в основе которого может находиться механизм, сходный с механизмом мейотической рекомбинации в рамках модели «двуцепочечный разрыв – репарация» (см. гл. 14). При деградации участка *Y* в области *MAT* может возникать брешь, репарируемая за счет геной конверсии при участии последовательностей *HML* или *HMR*.

Белки клеточной поверхности у трипаносомы

В клетках трипаносомы могут происходить перестройки ДНК, которые обеспечивают альтернативную экспрессию индивидуальных представителей большого семейства генов, кодирующих различные варианты поверхностных гликопротеинов (*VSG*). Любая клетка трипаносомы в каждый данный момент времени продуцирует только один из вариантов *VSG*. Поверхность клетки покрывают от 5 до 10 миллионов молекул *VSG*, которые предотвращают контакт иммунной системы организ-

ма хозяина со всеми остальными белками трипаносомы, которые были бы расценены ею как чужеродные. Прежде чем хозяйский организм успевает выработать эффективный иммунный ответ против данного варианта VSG-антигена, экспрессированного на поверхности потомства инфицирующей клетки трипаносомы, в индивидуальной клетке происходит переключение на продукцию нового варианта VSG. Таким образом, в ходе инфекции реализуется переключение на все новые отличные варианты VSG с частотой, достаточной, чтобы противостоять очередным попыткам хозяина выработать эффективный иммунный ответ. Исход этой конкурентной борьбы для организма-хозяина часто оказывается фатальным.

С помощью методов работы с рекомбинантными ДНК удалось установить, что в геноме трипаносомы содержится более 100 генов, кодирующих различные варианты VSG. Экспрессия данного гена VSG достигается за счет его дубликации и транспозиции копии гена в область экспрессионного центра, расположенного на другом участке генома. Переключение на экспрессию нового гена VSG сопровождается удалением из области экспрессионного центра прежде находившейся там копии гена VSG. Считают, что в экспрессионном центре находится промотор, способный направлять транскрипцию встроившейся очередной копии гена VSG. Такой способ организации существенно отличает экспрессионный центр трипаносомы от локуса *MAT* дрожжей. В случае переключения типа спаривания у дрожжей промоторные участки содержатся непосредственно в рамках перемещающихся последовательностей $Y\alpha$ и $Y\alpha$. В то же время, как и в случае дрожжевого локуса *MAT*, экспрессионный центр трипаносомы располагается в области хроматина, более чувствительной к ДНКазе I, чем участки хроматиновой структуры, содержащие неэкспрессируемые гены VSG. Интересно, что выработавшаяся у трипаносом система преодоления иммунного ответа хозяина, как будет видно из дальнейшего, механистически очень напоминает саму систему иммунного ответа.

Иммуноглобулиновые гены

Третий и наиболее сложный пример процессов перестройки ДНК связан с организацией иммунной системы млекопитающих и других высших позвоночных. Направленность эволюционного развития иммунной системы определялась необходимостью противостоять инфекции и удалять из организма собственные дефектные клетки, которые могут оказаться раковыми. Иммунная система млекопитающих обладает способностью продуцировать по крайней мере 10^6 антител с различной специфичностью. Такое разнообразие антител вполне достаточно для того, чтобы обеспечить специфический иммунный ответ по отношению к любой чужеродной молекуле (антигену). Характерно, что антитела к синтетическим антигенам, которые никак не могли фигурировать в эволюционной истории организма, вырабатываются им столь же эффективно, что и антитела к обычным природным антигенам. Антитела продуцируются в крови клетками В-лимфоцитов. Каждый из миллионов покоящихся В-лимфоцитов способен специфически распознавать одну определенную антигенную детерминанту, которая может быть представлена в составе чужеродной молекулы. Присутствие чужеродного

Таблица 16.5. Различные классы иммуноглобулинов человека, возникающих в ходе иммунного ответа

Класс	Тяжелая цепь	Подкласс	Легкая цепь	Субъединичный состав
IgM	μ	—	κ или λ	$(\mu_2\kappa_2)_5$ $(\mu_2\lambda_2)_5$
IgG	γ	γ_1, γ_2 γ_3, γ_4	κ или λ	$(\gamma_2\kappa_2)$ $(\gamma_2\lambda_2)$
IgA	α	α_1, α_2	κ или λ	$(\alpha_2\kappa_2)_{1,2,3}$ $(\alpha_2\lambda_2)_{1,2,3}$
IgD	δ	—	κ или λ	$(\delta_2\kappa_2)$ $(\delta_2\lambda_2)$
IgE	ϵ	—	κ или λ	$(\epsilon_2\kappa_2)$ $(\epsilon_2\lambda_2)$

антигена первоначально регистрируется одним или несколькими В-лимфоцитами в популяции, исходно несущими подходящие антитела. Взаимодействие с антигеном индуцирует пролиферацию данных лимфоцитов, которая приводит к образованию клонов клеток, продуцирующих антитела к данному антигену. В ходе установления иммунного ответа вырабатываются иммуноглобулины нескольких различных классов с одинаковой специфичностью к антигену (табл. 16.5). Первыми нарабатываются IgM, антитела, связанные с клеточной мембраной В-лимфоцитов. Вслед за этим начинается продукция IgD и IgG, причем последние представляют собой основной класс антител, высвобождаемых в кровоток. Некоторые из клеток клональной популяции В-лимфоцитов, активированных антигеном, вырабатывают также IgA и IgE.

Способность организма продуцировать такое колоссальное разнообразие специализированных белков (антител) порождает естественный вопрос: каким образом эти белки кодируются в ДНК? В последние десять лет благодаря развитию методов работы с рекомбинантными ДНК на этот вопрос удалось получить достаточно исчерпывающий ответ. Важнейшим фактором, определяющим разнообразие антител, является способность лимфоцитов к перегруппировке и комбинированию определенных сегментов ДНК с образованием тысяч различных возможных вариантов структуры соответствующих генов.

Для молекул антител характерна димерная структура, в которой каждый из мономеров состоит из двух различных полипептидных цепей, которые в соответствии с размером называют *тяжелыми* (H) и *легкими* (L). Цепи соединены между собой дисульфидными мостиками, как показано на рис. 16.20 для молекулы IgG. Удалось определить аминокислотную последовательность для целого ряда различных H- и L-цепей, которые были получены из крови человека или мыши, страдающих множественной миеломой, болезнью, при которой сверхпролиферация определенного клона антител-продуцирующих лимфоцитов происходит без всякой индукции антигеном. Эти исследования показали, что как H-, так и L-цепи иммуноглобулинов содержат так называемые *вариабельные* (V) и *константные* (C) участки последовательности. То есть при сравнении аминокислотных последовательностей множества различных L-цепей оказывается, что различия в аминокислотной последо-

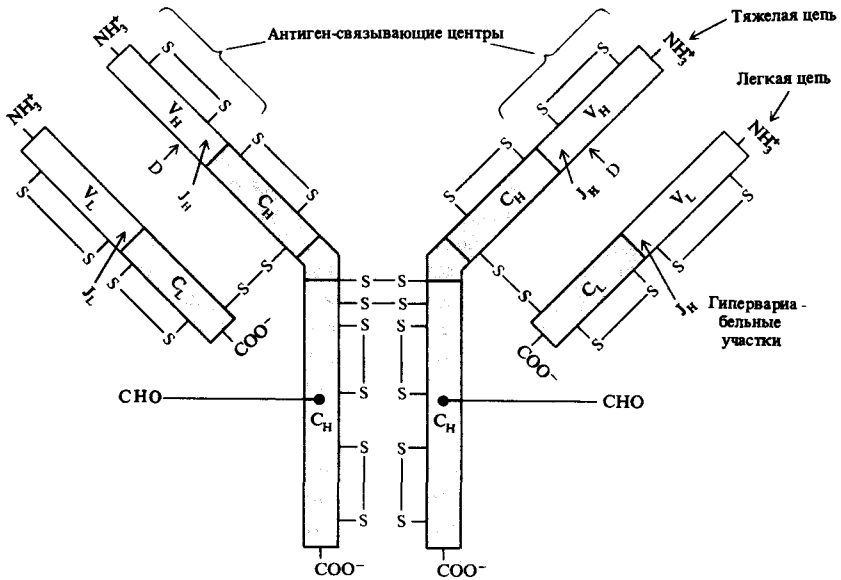


Рис. 16.20. Схематически представлена структура молекулы IgG (антитела млекопитающих). Показаны вариабельные (белые) и константные (цветные) участки легких (L) и тяжелых (H) полипептидных цепей. Отмечены также участки цепей, кодируемые представителями различных семейств генов — V_H, D, J_H, C_H, V_L, J_L и C_L. Каждая молекула представ-

ляет собой димер, состоящий из идентичных субъединиц L и H, соединенных дисульфидными связями. Показаны также внутрицепочечные дисульфидные связи, существенные для формирования пространственной структуры молекулы. Символом CHO- показаны углеводные остатки, связанные с тяжелыми цепями.

вательности локализуются главным образом в V_L-, а не в C_L-участке цепи. Аналогичным образом различия в последовательностях H-цепей иммуноглобулинов данного класса также сосредоточены в соответствующих участках (V_H). Антигенная специфичность индивидуальных антител определяется аминокислотными последовательностями их V_L- и V_H-участков. В этом отношении особенно важную роль играют аминокислотные остатки, расположенные в области так называемых гипервариабельных участков (рис. 16.20). Антиген-связывающие центры иммуноглобулинов находятся между V_H- и V_L-участками цепей. Каждая димерная молекула антител, образуемых одним клоном лимфоцитов, состоит из идентичных H- и L-цепей, и каждый данный клеточный клон продуцирует антитела одного типа.

L-цепи кодируются двумя основными группами генов, обозначаемых λ и κ, расположенными на различных хромосомах. В состав каждой группы входят три различных типа генов: семейство генов V_L, кодирующих первые 97 аминокислотных остатков с N-конца цепи; небольшое семейство генов J_L (от англ. joining — соединяющие), кодирующих следующие 10–12 остатков, и один или несколько генов C_L, кодирующих C-концевую половину L-цепи. На рис. 16.20 помечены участки цепи, кодируемые генами каждого из этих семейств. У человека каждое из се-

мейств V_λ и V_κ состоит из 200–300 генов, а каждое из семейств J_λ и J_κ содержит по 5 генов. Таким образом, комбинирование представителей этих семейств генов в каждом случае может приводить к образованию ~ 1000 ($5 \cdot 200$) различных V_L участков. У мыши семейство V_κ насчитывает около 300 генов, а семейство J_κ состоит из 4 генов. В то же время семейства V_λ и J_λ каждое содержат лишь 1–2 гена.

Фрагменты Н-цепей кодируются одной группой генов, локализованной на хромосоме, отличной от обеих хромосом, содержащих гены L-цепей. Как показано на рис. 16.20, переменный участок Н-цепи кодируют три различных семейства генов: V_H (около 300 представителей); D (не менее 10 представителей) и J_H [4 гена]. Из них может быть составлено около 12000 комбинированных генов тяжелых цепей. Таким образом, при случайном попарном сочетании различных вариантов легких и тяжелых цепей можно получить $24 \cdot 10^6$ ($12000 \cdot 2000$) различных видов антител. Кроме того, С-концевая область Н-цепей кодируется различными генами C_H , которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, перечисленным в табл. 16.5 (рис. 16.21).

В течение многих лет было совершенно непонятно, каким образом направляется синтез Н- и L-цепей, содержащих идентичные С-участки и различные V-участки. Предполагали, что С- и V-участки кодируются различными генами, а для интерпретации процессов объединения этих участков в единую полипептидную цепь выдвигали ряд различных гипо-

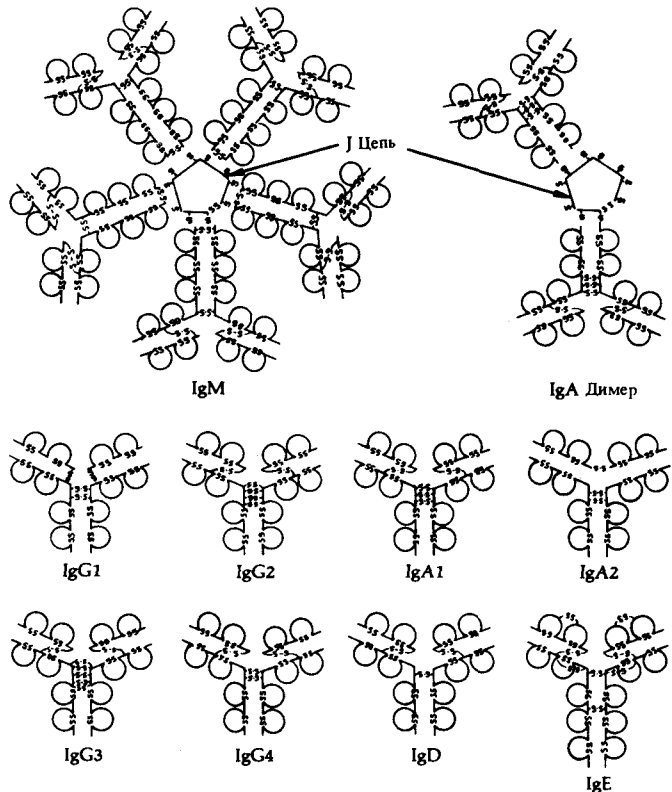


Рис. 16.21. Субъединичная структура различных классов иммуноглобулинов человека. Различия в структуре целиком определяются различиями в константных участках тяжелых цепей (см. табл. 16.5). (По Hood L. E., Weissman I. L., Wood W. B., 1978. Immunology, Benjamin Cummings, Menlo Park, Calif.)

тез. В 1976 г. Тонегава и его коллеги показали, что гены V_{λ} и C_{λ} , кодирующие легкую цепь иммуноглобулинов мышьиной миеломы, примыкают друг к другу в составе ДНК миеломных клеток, но находятся гораздо дальше друг от друга в ДНК эмбриональных клеток или клеток спермы. Авторы предположили, что в ходе дифференциации лимфоцитов выбор пути синтеза данного варианта L-цепи сопровождается перемещением данной пары генов V_{λ} и C_{λ} , которое приводит к согласованной транскрипции обоих генов с образованием общей мРНК, кодирующей данную разновидность цепи. В других миеломных опухолях наблюдалась перегруппировка генов V_{λ} и C_{λ} легких цепей. Выбор пути образования иммуноглобулиновых цепей данного типа, основанный на комбинации данных генов V_{λ} и C_{λ} , исключает продуктивное использование комбинаций генов V_{λ} и C_{λ} . Верно и обратное. Более того, в каждом случае в продуктивном комбинировании семейств генов λ или κ принимают участие только гены, расположенные на одной из гомологичных хромосом. Это явление получило название *аллельного исключения*.

Экспериментальные данные о процессах перегруппировки генов, кодирующих константные и переменные участки иммуноглобулиновых цепей, были получены с помощью методов, основанных на применении рекомбинантных ДНК. Для этого из фракции полисом выделяли мРНК, кодирующую L-цепь миеломы, на ее основе с помощью обратной транскриптазы получали кДНК, которую клонировали на плазмидном векторе. Нарботанную в значительных количествах клонированную кДНК расщепляли подходящей рестриктазой таким образом, чтобы получить два фрагмента, соответствующих V- и C-участкам L-цепи. Фрагменты ДНК разделяли препаративно с помощью электрофореза, вводили радиоактивную метку с помощью ник-трансляции, денатурировали и использовали в качестве зондов для идентификации фрагментов рестрикции ДНК из миеломных или эмбриональных клеток, содержащих последовательности, комплементарные последовательностям зондов. Наиболее существенно, что, как показано на рис. 16.22, в ДНК клеток миеломы оба V- и C-кодирующих участка локализуются на одном и том же *Eco* RI-фрагменте, в то время как в эмбриональной ДНК они находятся на различных *Eco* RI-фрагментах. Это означает, что на каком-то этапе развития между эмбриональной клеткой и дифференцированным лимфоцитом происходит специфическая перестройка ДНК, которая в данном случае привела к удалению *Eco* RI-сайта (или сайтов), находившегося в рамках протяженной области ДНК между V- и C-кодирующими участками в эмбриональной ДНК. После такой перестройки эти участки оказались расположенными в непосредственной близости друг к другу. Комбинация генов L-цепи, возникшая при их перегруппировке в ходе дифференциации лимфоцита, при его последующем митотическом делении устойчиво наследуется дочерними клетками.

Общая организация группы генов L-цепи показана на рис. 16.23. Число генов V точно неизвестно и находится в диапазоне 200–300. Каждый ген содержит примыкающую к структурной области промоторную последовательность, однако не транскрибируется до тех пор, пока не произойдет продуктивная перестройка ДНК, соединяющая его с одним из пяти генов J . Гены V и J разделяются короткими, одинаково организованными участками последовательности, которые содержат

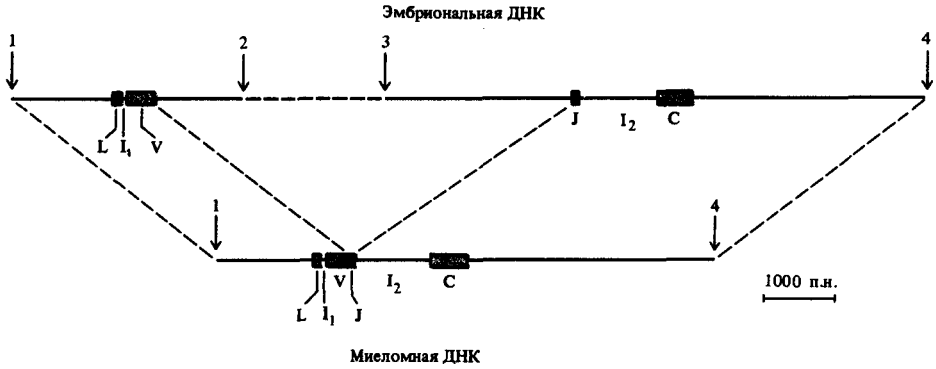


Рис. 16.22. Организация последовательностей ДНК λ_L -легких цепей в зародышевых и дифференцированных миеломных клетках мыши. Пронумерованные стрелки указывают положения *Eco*RI-сайтов. мРНК, соответствующая легкой полипептидной цепи, состоит из лидерной последовательности (L), последовательности переменных участков (V и J) и последовательности константного участка (C). В ДНК присутствуют две промежуточные последовательности, I_1 и I_2 , причем I_1 отделяет лидерный участок от ва-

риабельного, а I_2 – переменный участок от константного. В ДНК дифференцированных миеломных клеток все эти последовательности находятся на одном *Eco*RI-фрагменте между сайтами расщепления 1 и 4. В эмбриональной ДНК последовательности L, I_1 и V находятся в одном *Eco*RI-фрагменте между сайтами 1 и 2, а последовательности J (кодирует 13 аминокислотных остатков переменного участка), I_2 и C – на другом *Eco*RI-фрагменте между сайтами 3 и 4 (По Brack C. et al., 1978. Cell, 15, 1.)

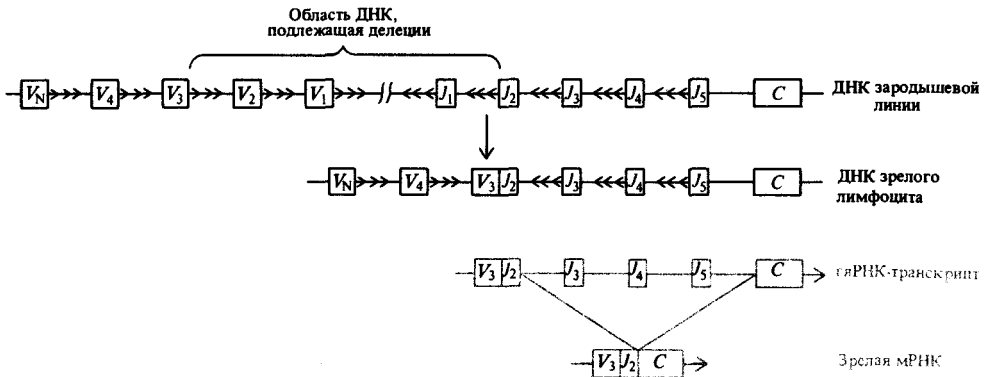


Рис. 16.23. Организация семейств генов λ легких цепей, расположенных в одной хромосоме. Единичная перестройка ДНК объединяет одного из представителей семейства генов V_x (200–300 различных генов) с одним из пяти представителей семейства генов J_x .

Таким образом, возникает индивидуальная транскрипционная единица с промотором, примыкающим к гену V_x . Соответствующая мРНК полипептидной цепи L_x образуется при сплайсинге гяРНК-транскрипта.

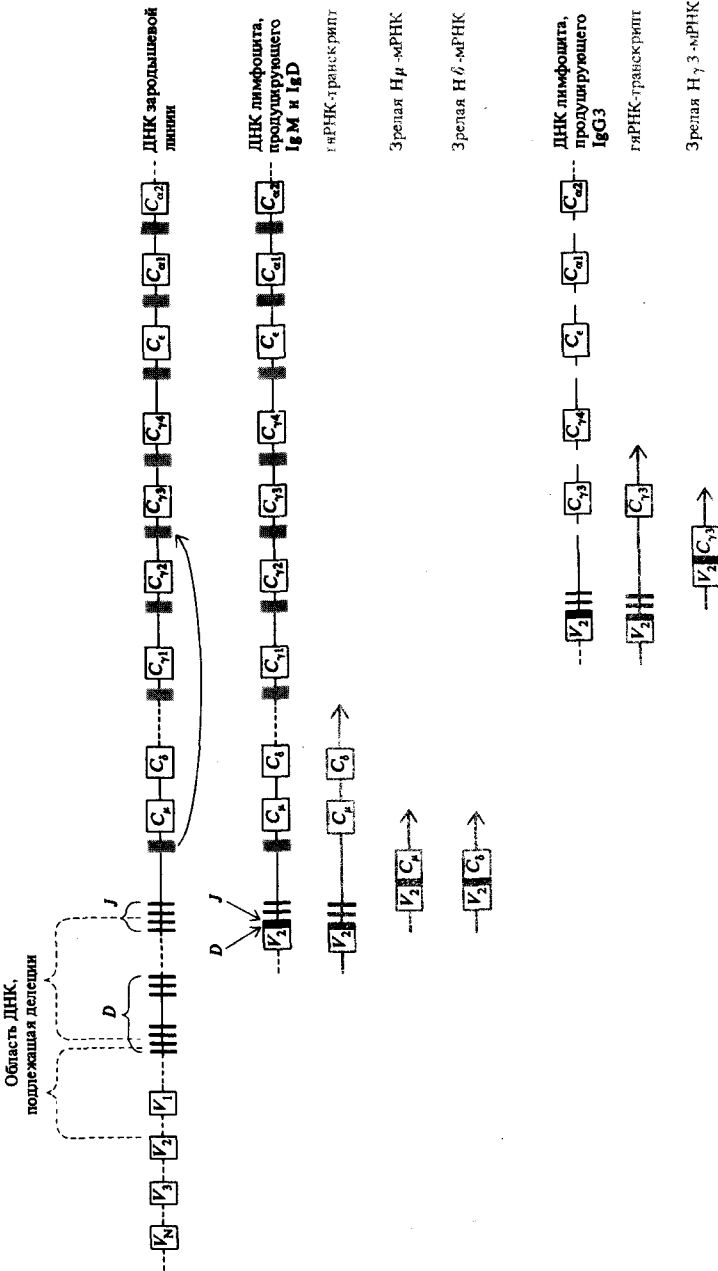


Рис. 16.24. Организация семейств генов тяжелых цепей в ДНК единичной хромосомы. В результате двойной перестройки ДНК представитель семейства генов V_H соединяется с одним из генов семейства D и с одним из генов семейства J_H. Образуется транскрипционная единица, считываемая в виде гЯРНК, содержащей участки V_HDJ_H, а также участки C_H и C_δ. При альтернативном сплайсинге такого транскрипта могут возникнуть мРНК, кодирующие H_μ- и H_δ-цепи. Третья перестройка ДНК, включающая рекомбинацию по сайтам переклещивания классов (помечены серым), приводит к тому, что данный В-лимфоцит начинает продуцировать иммуноглобулины определенного класса. При этом тот же самый участок V_HDJ_H, который исходно примыкал к участку C_{H1}, объединяется с одним из представителей семейства C_H (в данном случае с геном C_{H3}).

7 консервативных п. н. с одной стороны и 9—с другой, разделенных последовательностью из 12 п. н. Считают, что эти участки последовательности принимают участие в перестройке ДНК, приводящей к делеции области хромосомы, расположенной между двумя объединяемыми генами V и J . В сформированной ДНК дифференцированного лимфоцита транскрипция инициируется на промоторе гена V и продолжается до гена C включительно. В ходе сплайсинга РНК-транскрипта удаляются все J -участки, кроме того, который непосредственно примыкает к гену V . Таким образом, формируется мРНК, в которой последовательно соединены по одной копии генов V , J и C .

На рис. 16.24 показана общая организация группы генов H -цепи. Семейства генов J_H , D , и V_H расположены перед семейством генов C_H . Каждый из генов V_H содержит собственную промоторную последовательность. Выбор экспрессии данного V -участка тяжелой цепи сопровождается двумя перегруппировками генов в ДНК: объединением генов V_H и D с удалением промежуточной области ДНК и объединением $V_H D$ и J_H , также с удалением промежуточной последовательности. Таким образом, возникает транскрипционная единица, с которой за счет альтернативного сплайсинга могут считываться μ - и δ -варианты тяжелой цепи данного типа. В сочетании с продуктами экспрессии образовавшихся транскрипционных единиц типа L_μ или L_δ экспрессия генов H_μ и H_δ обеспечивает продукцию IgM и IgD. В дальнейшем на стадии терминальной дифференцировки В-лимфоцитов происходит так называемое *переключение классов*, которое настраивает клетку на продукцию того или иного из перечисленных в табл. 16.5 класса иммуноглобулинов. Это переключение сопряжено с третьей перестройкой ДНК, в ходе которой экспрессируемая область $V_H D J_H$ объединяется с определенным C_H -участком, при этом удаляется промежуточная область ДНК. Каким образом в В-лимфоцитах происходит регуляция таких сложных перестроек ДНК, пока неизвестно.

Заключение

Выявление множества разнообразных процессов, вовлеченных в регуляцию экспрессии эукариотических генов, свидетельствует о том, что эта регуляция осуществляется на целом ряде различных уровней. Как видно из приведенных в настоящей главе примеров, многое уже известно о регуляторных центрах в ДНК. Эти знания основаны на структурной информации, полученной с применением рекомбинантных ДНК. В то же время многие аспекты регуляции генов у эукариот остаются неясными. Относительно мало известно о регуляторных молекулах, которые должны взаимодействовать с регуляторными центрами ДНК, а также об эффекторах, оказывающих модуляторное действие на функционирование регуляторных молекул в отношении экспрессии тех или иных генов. Ясно, что многие важнейшие детали регуляции экспрессии эукариотических генов на молекулярном уровне подлежат дальнейшему изучению.

Библиография

- Amara S.G. et al.* (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products, *Nature*, **298**, 240–244.
- Birchmeier C., Grosschedl R., Bernstiel M.L.* (1982). Generation of authentic 3' termini of an H2A mRNA *in vitro* is dependent on a short inverted DNA repeat and on spacer sequences, *Cell*, **28**, 739–745.
- Borst P., Cross G.A.M.* (1982). Molecular basis for trypanosome antigenic variation, *Cell*, **29**, 291–303.
- Brack C. et al.* (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination, *Cell*, **15**, 1–14.
- Cordon J. et al.* (1980). Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes, *Science*, **209**, 1406–1414.
- Darnell J.E., Jr.* (1982). Variety in level of gene control in eukaryotic cells, *Nature*, **297**, 365–371.
- Davidson E.H., Jacobs H.T., Britten R.J.* (1983). Very short repeats and coordinate induction of genes, *Nature*, **301**, 468–470.
- Early P. et al.* (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_H, D and J_H, *Cell*, **19**, 981–992.
- Early P., Hood L.* (1981). Allelic exclusion and nonproductive immunoglobulin gene rearrangements, *Cell*, **24**, 1–3.
- Elgin S.C.R.* (1981). DNase I–hypersensitive sites of chromatin, *Cell*, **27**, 413–415.
- Harland R.M., Weintraub H., McKnight S.L.* (1983). Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology, *Nature*, **302**, 38–43.
- Hood L.E., Weissman I.L., Wood W.B.*, 1978. Immunology, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.
- Lerner M.R. et al.* (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**, 220–224.
- McGinnis W. et al.* (1983). DNA sequence changes in an upstream DNase I–hypersensitive region are correlated with reduced gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1063–1067.
- McKnight S.L.* (1982). Functional relationship between transcriptional control signals of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus, *Cell*, **31**, 355–365.
- McKnight S.L., Kingsbury R.* (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene, *Science*, **217**, 316–324.
- Marcu K.B.* (1982). Immunoglobulin heavy-chain constant-region genes, *Cell*, **29**, 719–721.
- Nasmyth K.A.* (1982). Molecular genetics of yeast mating type, *Annu. Rev. Genet.*, **16**, 439–500.
- Ohshima Y. et al.* (1981). Novel models for RNA splicing that involve a small nuclear RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4471–4474.
- Proudfoot N.J., Brownlee G.G.* (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA, *Nature*, **263**, 211–214.
- Razin A., Riggs A.D.* (1980). DNA methylation and gene function, *Science*, **210**, 604–610.
- Rozek C.E., Davidson N.* (1983). *Drosophila* has one myosin heavy-chain gene with three developmentally regulated transcripts, *Cell*, **32**, 23–34.
- Sharp P.A.* (1981). Speculation on RNA splicing, *Cell*, **23**, 643–646.
- Shermoen A.W., Beckendorf S.K.* (1982). A complex of interacting DNase I–hypersensitive sites near the *Drosophila* glue protein gene, *Sgs4*, *Cell*, **29**, 601–607.
- Strathern J.N., Herskowitz I.* (1979). Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast, *Cell*, **17**, 371–381.
- Vardimon L. et al.* (1982). Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by *in vitro* methylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1073–1077.
- Weisbrod S.* (1982). Active chromatin, *Nature*, **297**, 289–295.
- Yang V.W. et al.* (1981). A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1371–1375.

Ключевые слова и понятия

Гиперчувствительные участки
хроматина

Иммуноглобулиновые гены

Метилирование ДНК

Мутагенез *in vitro*

мяРНК

мяРНП

Наследственная устойчивость

зародышевых гемоглобинов (HPFH)

Ооциты *Xenopus*

Перестройки ДНК

Последовательность ТАТА

Согласованная регуляция

Сплайсинг гяРНК-транскриптов

Талассемия

Типы спаривания дрожжей – кассетная
модель

Экспрессионный центр у трипаномы

Экспрессия глобиновых генов

Задачи

16.1. Перечислите этапы экспрессии человеческого β -глобинового гена, на которых в случае определенных мутаций может наблюдаться предотвращение нормальной экспрессии. Опишите молекулярный фенотип каждой из таких мутаций. (Не следует рассматривать мутации, имеющие слишком общий характер и способные вызвать гибель клетки.)

16.2. Каковы основные различия в организации ДНК эукариотических и прокариотических клеток? Как эти различия проявляются в регуляции экспрессии генов двух типов клеток?

16.3. Какие из обсуждавшихся в этой главе генетических регуляторных механизмов могут вносить вклад в наследственно закрепленный профиль экспрессии генов соматических клеток в ходе развития многоклеточного организма?

16.4. Многие несцепленные гены эукариотических клеток, например гены α - и β -глобиновых кластеров, подвержены согласованной регуляции. Каким образом может достигаться согласованность в регуляции этих генов?

16.5. Способность к выживанию при аномально высоких температурах обеспечивается генетическим регуляторным механизмом, который выработался на ранних этапах развития жизни на земле.

Приведите данные, которые согласуются с этой гипотезой или противостоят ей.

16.6. Согласно одной из гипотез, появление гиперчувствительных участков в хроматине обусловлено локальными структурными переходами ДНК из Z- в B-форму (см. гл. 4). Что дает основания полагать, что такой переход на участке структуры в области регуляторной последовательности действительно может облегчать инициацию транскрипции в промоторной области?

16.7. Изображенная на рис. 16.2 схема проведения мутагенеза *in vitro* позволяет получать простые делеционные мутанты по контролирующей области гена *tk* (стадии 1–3). В чем преимущества метода линкерного сканирования (стадия 4) по сравнению с простым делеционным мутагенезом *in vitro* в обнаружении регуляторных последовательностей клонированных генов?

16.8. Схематически изобразите последовательность событий, приводящих к переключению типа спаривания у дрожжей. Предложите механизм такого переключения, основанный на модели «двухцепочечный разрыв – репарация», рассматриваемой на примере процессов мейотической рекомбинации (см. гл. 14).

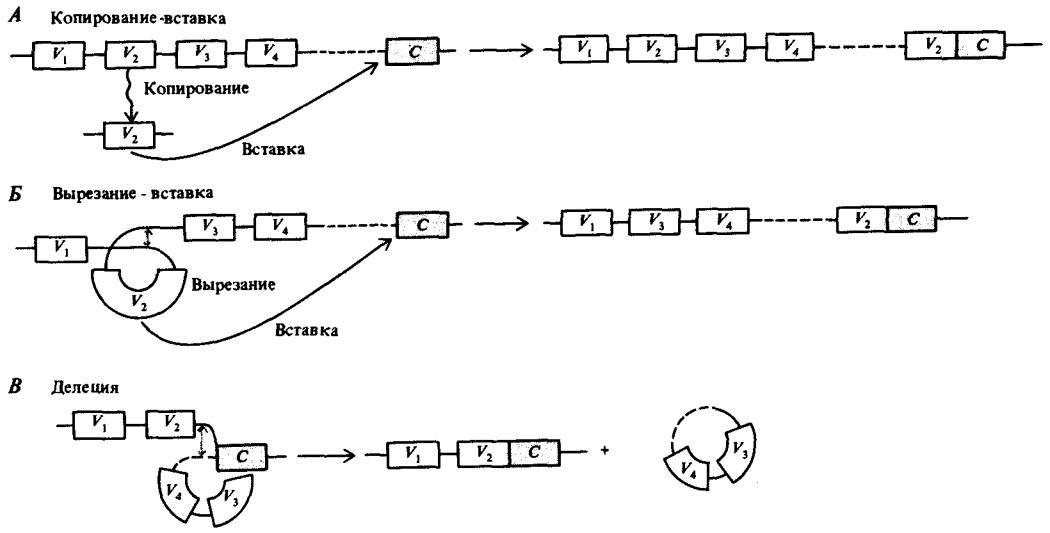


Рис. 16.25.

16.9. Предложите эксперименты, основанные на применении рекомбинантных ДНК и рестрикционного анализа, которые позволят выявить различия между

тремя моделями, показанными на рис. 16.25. (Для упрощения на схемах показаны только гены V и C .)

Генетический анализ развития

Высшие эукариоты – это многоклеточные организмы, у которых различные группы клеток приспособлены для выполнения разных функций. Развитие организма начинается с зиготы, содержащей одно диплоидное ядро. Затем зигота делится митотически, образуя множество клеток малого размера, содержащих дочерние ядра. Клетки, возникающие в результате этих ранних делений дробления, в ходе дальнейшего развития зародыша дают начало различным специализированным типам клеток, в каждом из которых происходит экспрессия определенного набора генов.

Дифференциальная экспрессия генов

Какие механизмы приводят к тому, что сестринские ядра, ведущие свое происхождение от одного и того же ядра зиготы, образуют при дальнейших делениях дочерние ядра, вступающие на разные пути развития? Большая часть клеток животных – это соматические клетки, судьба которых – погибнуть, не внося вклад в последующие поколения. Только зародышевые клетки, сегрегирующие в раннем эмбриогенезе, обладают *тотипотентностью* (способностью пройти все этапы развития и дать начало любому типу клеток). Приводит ли дифференцировка клеток, происходящая после выбора какого-либо специфического пути развития, к селективной элиминации генов, которые не будут иметь экспрессии, или в этом случае происходит их постоянная инактивация?

В экспериментах нескольких типов получены данные, свидетельствующие о том, что процессы развития не обязательно приводят к необратимым изменениям клеточного ядра. Эти эксперименты показывают, что в соматических клетках в процессе развития происходит *дифференциальная экспрессия генов*.

Одно из наиболее прямых доказательств этого факта – демонстрация тотипотентности путем трансплантации ядра из дифференцированной соматической клетки в зиготу, лишенную ядра. Используя африканскую шпорцевую лягушку *Xenopus laevis*, Джон Гердон получил таким образом взрослых особей. Путем облучения большими дозами ультрафиолета из неоплодотворенных яиц функционально удаляется ядро; затем в каждое из яиц вводится дифференцированное ядро из клетки головастика; таким образом иницируется развитие. В ряде случаев яйца, в которые были введены ядра, развиваются во взрослых особей (рис. 17.1). Для доказательства того, что в развитии участвовало именно трансплантированное ядро, а не собственное ядро яйцеклетки, не погибшее при УФ-облучении, применяли генетическое маркирование. Для выделения яйцеклеток использовали линию, для которой было характерно наличие в ядре двух ядрышек – по одному на каждый ядрышкового организатор двух гомологичных хромосом. Ядро соматической клетки было получено от особи, гетерозиготной по делеции ядрышкового организатора и имеющей поэтому в ядре только одно ядрышко. Все ядра в клетках особи, полученной в результате трансплантации ядра, имели только одно ядрышко. Таким образом, в этих случаях вся информация, необходимая для нормального развития, присутствует в ядре дифференцированной клетки и может быть вновь активирована и использована для повторения процесса развития.

Различными способами было показано, что контроль первоначальных этапов дифференцировки делящихся ядер определяется внеядерными компонентами яйцеклетки, возникающими в процессе оогенеза. По крайней мере один из этих компонентов – детерминанты будущих зародышевых клеток – были идентифицированы и локализованы в яйцеклетке; показано, что они поступают только в клетки будущей зародышевой линии.

Детерминация клеток зародышевой линии у дрозофилы контролируется факторами, присутствующими в ооплазме задней части яйца. Зародышевые клетки происходят от полярных клеток (рис. 17.2), которые образуются перед формированием клеточной бластодермы (что обсуждается ниже), когда некоторые из ранних ядер дробления мигрируют в заднюю часть яйцеклетки. Существование детерминантов полярных клеток было показано путем инъекции ооплазмы задней части яйцеклетки в передний конец других яйцеклеток, где в это время формировались полярные клетки. При этом возникал эмбрион, имеющий полярные клетки как в заднем, так и в переднем конце. Функциональность этих дополнительных полярных клеток демонстрируется путем их трансплантации в третий эмбрион, находящийся на стадии пребластодермы, где они объединяются с полярными клетками этого эмбриона (рис. 17.2). Во время гастрюляции, когда начинается упорядоченное движение клеток, полярные клетки мигрируют внутрь эмбриона и объединяются с соматическими клетками гонады; их потомки участвуют в образовании гамет взрослого насекомого. Контрольные эксперименты показывают, что ооплазма, взятая не из задней, а из других частей яй-

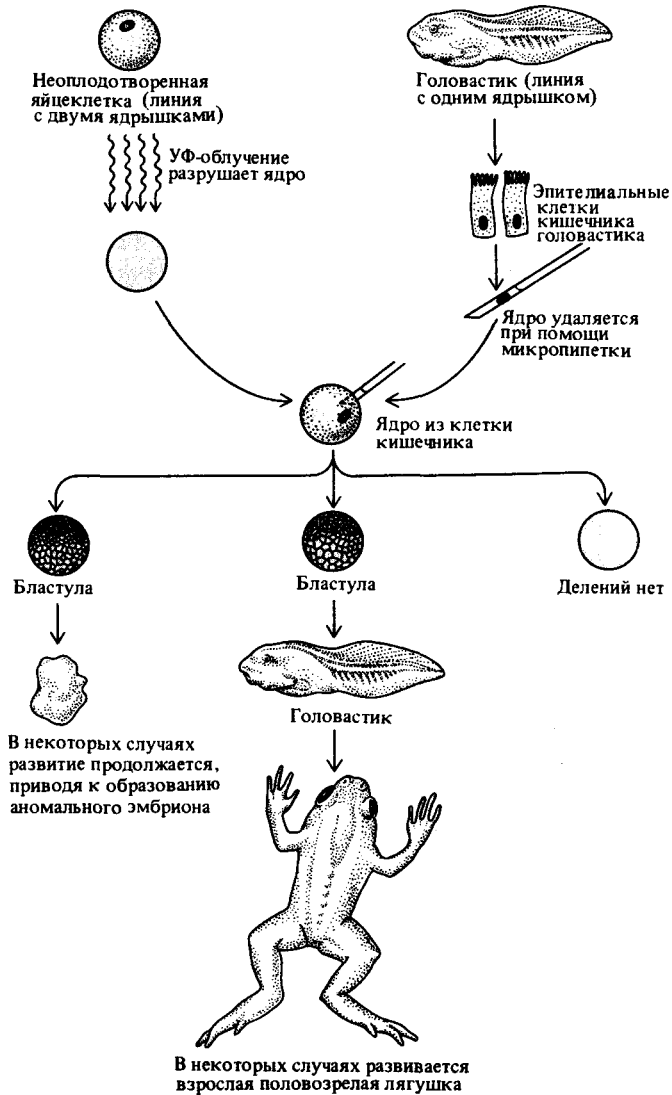


Рис. 17.1. Методика, применяемая для демонстрации тотипотентности ядра дифференцированной клетки. (По *Gurdon J. B.*, 1968. *Scientific American*, December, p. 24.)

цеклетки, при трансплантации не приводит к образованию полярных клеток. В сходных экспериментах по трансплантации показано, что детерминанты зародышевых клеток появляются в яйцеклетке во время поздних стадий оогенеза, перед окончательным формированием зрелой яйцеклетки.

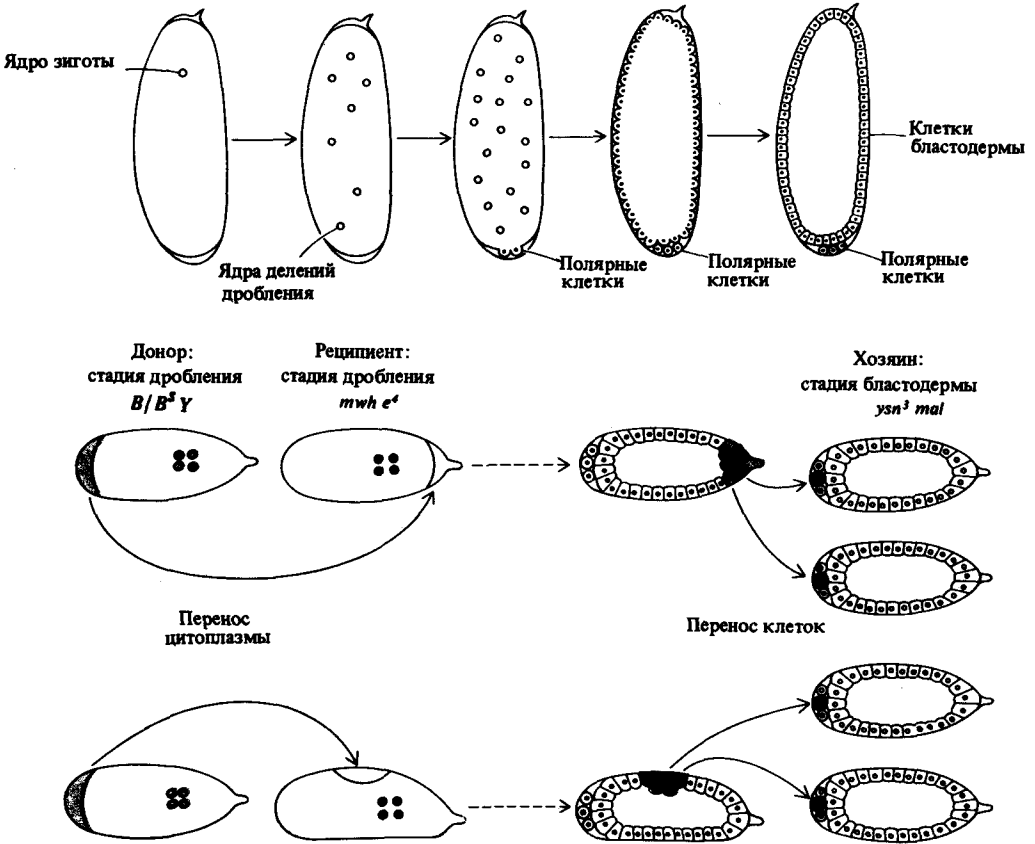


Рис. 17.2. А. Полярные клетки в заднем конце эмбриона дрозофилы образуются до формирования клеточной бластодермы. По крайней мере некоторые полярные клетки затем мигрируют в соматические гонады, где образуются примордиальные зародышевые клетки. (По Gehring W., 1973. In: Genetic Mechanisms of Development, ed. by F. H. Ruddle, Academic Press, New York, p. 107.) Б. Присутствие детерминантов полярных клеток в задней части яиц *Drosophila melanogaster* можно доказать путем трансплантации этой ооплазмы в те части других яиц, где полярные клетки обычно не образуются. Показанный на рисунке донор цитоплазмы взят из линии, в которой как X-, так и Y-хромосомы маркированы доминантными мутациями *Bar* (*B* и B^1) для того, чтобы выявить возможный перенос донорского ядра вместе с полярной цитоплазмой донора. Яйца-реципиенты взяты из линии, гомозиготной по мутациям третьей

хромосомы *multiple wing hair* (*mwh*) (множественные щетинки на крыльях) и *ebony* (черный цвет тела) (e^1). Трансплантированная полярная плазма индуцирует образование полярных клеток в месте инъекции в яйцо-реципиент. Функциональная природа индуцированных полярных клеток выявляется путем их трансплантации в задний конец эмбриона, чья X-хромосома маркирована рецессивными мутациями *yellow* (*Y*) (желтый цвет тела), *singed* (sn^3) (опаленные щетинки) и *maroonlike* (*mal*) (коричневый цвет глаз), где они участвуют в формировании зародышевых клеток. Часть (но не все) гамет, образуемых взрослыми мухами, развивающимися из таких эмбрионов, несет маркеры mwh^4 , а не маркеры $usn^3 mal$. Следовательно, индуцированные полярные клетки, генотип которых соответствует генотипу яйца-реципиента, являются истинными полярными клетками. (По Illmensee K., 1976. In: Insect Development, ed. by P. Lawrence, Blackwell, London, p. 86.)

Клеточная детерминация

Детерминация соматических клеток зародыша, т.е. выбор ими определенного пути развития, происходит, вероятно, принципиально иным способом, чем детерминация зародышевых клеток. Внимательное изучение судьбы линий клеток, ведущих свое происхождение от клеток раннего эмбриона, показало, что главную роль в их дифференцировке играет пространственное расположение эмбриональных клеток. В этих исследованиях показано, что клетки используют позиционную информацию, которая позволяет каждой клетке определить свое местонахождение относительно других клеток эмбриона. Модельными объектами для изучения процессов развития стали плодовая мушка (*Drosophila*) и мышь; именно на них были получены сведения о том, когда происходит дифференцировка в раннем эмбриогенезе, приводящая к появлению различных клеточных линий, которые все вместе формируют взрослый организм.

Карта зачатков бластодермы дрозофилы

У дрозофилы после оплодотворения яйцеклетки ядро зиготы, а затем и возникающие дочерние ядра проходят девять синхронных делений, образуя группу ядер, находящихся в общей для них ооплазме. После девятого деления подавляющее большинство этих ядер перемещается

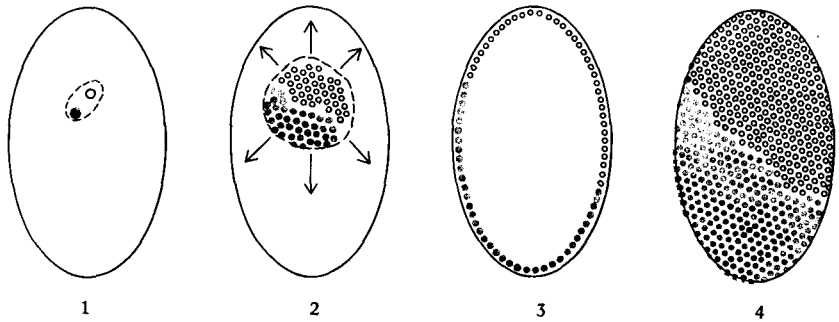


Рис. 17.3. Схематическое изображение делений дробления, приводящих к формированию синцитиальной бластодермы *Drosophila*. Три рисунка слева показывают: (1) два ядра, образовавшихся в результате первого деления дробления, из которых одно (обозначено белым цветом) потеряло X-хромосому; (2) яйцеклетка после нескольких делений дробления; из образовавшейся группы ядер половина имеет генотип XX (окрашены), а другая половина XO (белые); (3)

яйцеклетка после миграции ядер к оболочке. На рисунке справа (4) показана поверхность синцитиальной бластодермы перед образованием клеточных мембран, состоящая из ядер XO и XX в равных соотношениях. Отметьте границу, которая проходит между участками, состоящими из ядер XO и XX. (По Hotta Y, Benzev S. 1973. В Genetic Mechanisms of Development, ed. by F.H. Ruddle, Academic Press, New York, стр. 129.)

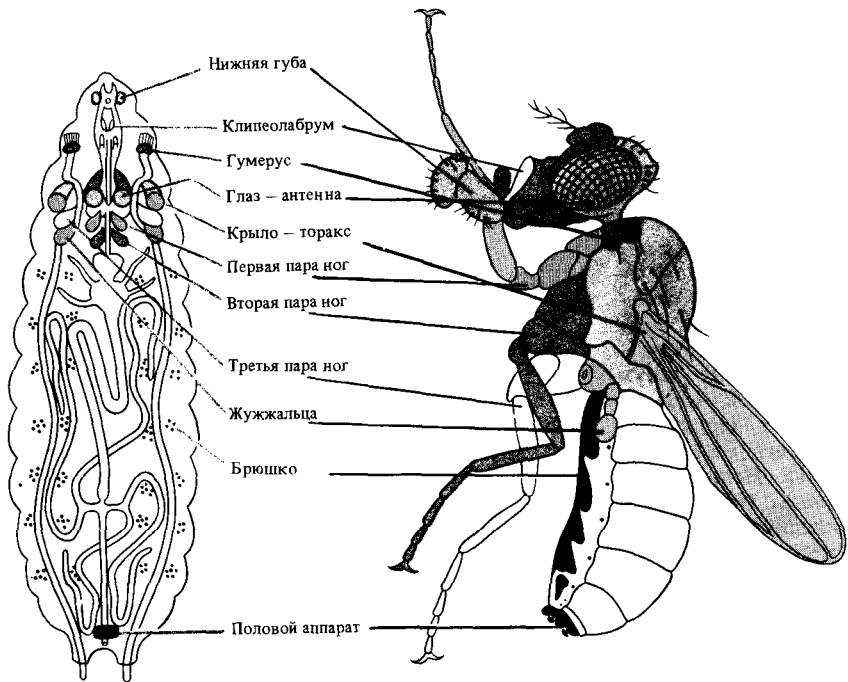
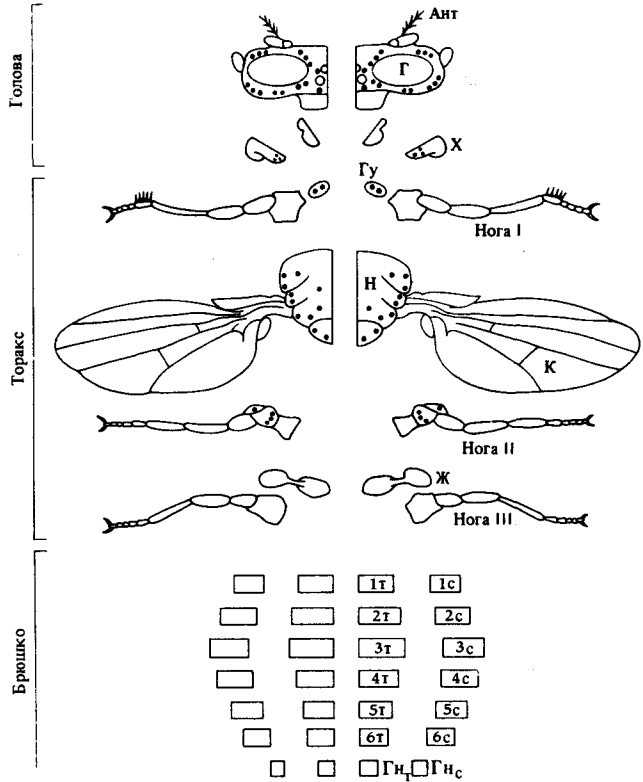


Рис. 17.4. Имагинальные диски зрелой личинки *Drosophila*. Абдоминальные стерниты и тергиты развиваются из зачатков меньшего размера, называемых гистобластами (на рисунке отмечены точками).

к оболочке яйца, делится еще четыре раза и образует *синцитиальную* бластодерму (т.е. такую бластодерму, ядра в которой расположены в общей цитоплазме) (рис. 17.3). Вскоре после этого вокруг каждого ядра формируются клеточные оболочки, в результате чего образуются клетки и возникает клеточная бластодерма. Затем происходит гастрюляция и органогенез. Из яйца выходит личинка, которая состоит из двух типов клеток: личиночных и имагинальных. Тело личинки состоит из личиночных клеток. Когда личинка питается, растет, периодически проходит линьку, личиночные клетки не делятся, а только увеличиваются в размерах. Имагинальные клетки, напротив, обычно делятся, их количество увеличивается во время роста личинки, и из них формируются имагинальные диски (рис. 17.4). В период окукливания имагинальные диски дифференцируются и дают начало разным органам взрослого насекомого (рис. 17.5).

Имагинальные диски можно культивировать, имплантируя их в брюшную полость взрослых самок, где гормональные условия допускают пролиферацию клеток, но предупреждают дифференцировку (см. рис. 10.9). Дифференцировка имагинальных дисков может быть достигнута путем их трансплантации в полость тела личинки непосредственно перед ее окукливанием. Гормональные изменения окукливающейся личинки индуцируют дифференцировку трансплантированных дисков; например, имагинальные клетки глаза дают начало структурам глаза и т.д.

Рис. 17.5. Развернутый вид наружных частей тела взрослой особи дрозофилы. Каждая часть в период окукливания развивается из отдельного зачатка, или имагинального диска. Отдельные части скрепляются вместе перед выходом мухи из куколки. Сокращения: АНТ—антенна; Г—глаз; Х—хоботок; Гу—гумерус; Н—нотум; К—крыло; Ж—жужжальца; т—тергит; с—стернит; Гн—гениталии. (По *Hotta Y., Benzev S., 1973. Genetic Mechanisms of Development*, ed. by F. H. Ruddle, Academic Press, New York, p. 129.)

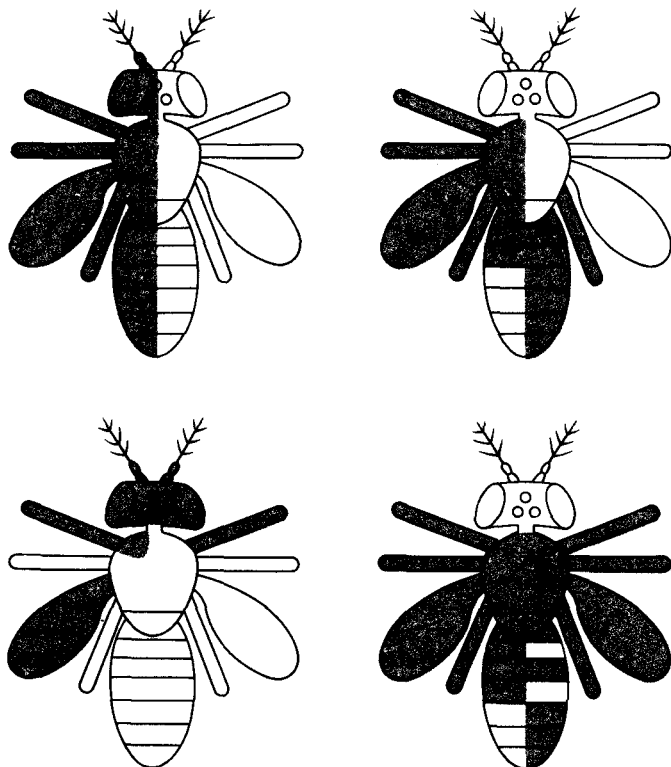


Различные данные указывают на то, что детерминация клеток зачатков личиночных и имагинальных органов различных сегментов тела происходит во время образования клеточной бластодермы или сразу после этого. Во-первых, клетки, изолированные из передней части бластодермы эмбриона, дают начало только имагинальным структурам передней части насекомого. Напротив, из клеток заднего конца бластодермы, образуются только имагинальные структуры задней части насекомого.

Во-вторых, удаление клеток из определенных участков поверхности бластодермы приводит к специфическим повреждениям взрослого насекомого, развившегося из поврежденного эмбриона. Эти данные показывают, что положение клеток в бластодерме определяет судьбу этих клеток в течение всего процесса развития. Наконец, исследование гинандроморфов, о котором мы вкратце расскажем, показывает, что делящиеся ядра, мигрирующие к поверхности яйца, являются тотипотентными и проходят детерминацию в соответствии со своим положением на поверхности яйцеклетки.

Половая дифференцировка у дрозофилы зависит непосредственно от хромосомного состава каждой клетки. Как упоминалось в гл. 3, пол определяется отношением количества X-хромосом к количеству аутосом, зиготы ХО дают самцов, являющихся стерильными вследствие отсутствия генов Y-хромосомы, необходимых для сперматогенеза.

Рис. 17.6. Типичные гинандроморфы у *D. melanogaster*. Части тела, состоящие из клеток XX (окрашены), имеют фенотип самки; части, состоящие из клеток XO (не окрашены), имеют фенотип самца и несут рецессивные мутации, которые выявляются благодаря отсутствию второй X-хромосомы, несущей аллели дикого типа. (По Hotta Y., Benzev S., 1973. Genetic Mechanisms of Development, ed. by F. H. Ruddle, Academic Press, New York, p. 129.)



Зиготы, имеющие две X-хромосомы, иногда теряют X-хромосому из одного или двух ядер, образующихся после деления ядра зиготы. Некоторые мутации или перестройки, приводящие к образованию кольцевой X-хромосомы, сильно увеличивают частоту элиминации X-хромосомы во время первых делений дробления. Возникающие в результате этого мозаики XO/XX развиваются во взрослых особей, являющихся по фенотипу наполовину самками, наполовину самцами (половая дифференцировка у дрозофилы происходит независимо в каждой клетке). Такие особи называются гинандроморфами. Гинандроморфы не состоят из беспорядочно смешанных мужских и женских клеток. Между клетками различного типа всегда существует линия раздела. Она выражена особенно четко, когда мужские клетки несут X-хромосому с мутациями, изменяющими цвет кутикулы, цвет глаз или строение щетинок, а женские клетки гетерозиготны по соответствующим аллелям дикого типа. Такая линия раздела может проходить по телу мухи самыми различными способами; некоторые из них приведены на рис. 17.6.

В 1929 г. Стертевант описал метод картирования зачатков взрослых имагинальных структур путем регистрации частоты, с которой в популяции гинандроморфов линия разделения полов разделяет два органа взрослого насекомого. (Вспомним, что Стертевант также показал, как использовать данные по рекомбинации для построения хромосомных карт, — см. гл. 5). Этот метод был впоследствии (1969 г.) использован Ан-

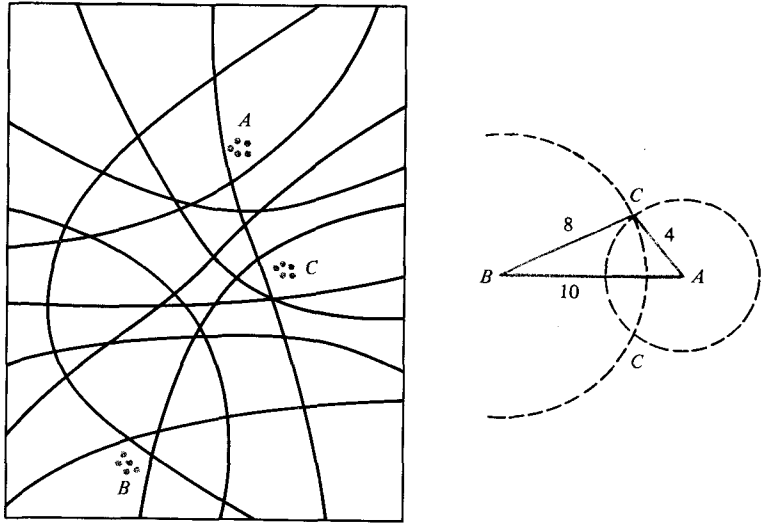


Рис. 17.7. Принципы построения карт зачатков органов. Двумерная непрерывная поверхность бластодермы построена из одного слоя клеток; слева на рисунке она показана в проекции на плоскость. На ней указаны три зачатка (А, В и С). На рисунке приведено несколько возможных линий, разделяющих бластодерму на два участка, один из которых состоит из клеток с фенотипом самки, а другой — с фенотипом самца; некоторые из этих линий находятся между зачатками. Чем больше расстояние между зачатками, тем больше вероятность, что у данного гинандроморфа разделительная линия пройдет между этими зачатками. В таком случае органы взрослого насекомого, возникшие из них, будут иметь различный пол и генотип. Частота гинандроморфов, у которых

два данных органа различны по полу и генотипу, является мерой расстояния между их зачатками на карте зачатков. Один *стерт* — это единица, определяемая как такое расстояние между двумя сайтами, что разделительная линия между ними проходит у 1% всех гинандроморфов. На правой диаграмме сайты А и В расположены на расстоянии 10 стертов друг от друга; если расстояние между С и В — 8 стертов, то сайт С расположен в одной из двух точек пересечения, показанных на рисунке. Выбор между этими двумя точками можно сделать путем картирования данных трех сайтов относительно каких-либо дополнительных сайтов. (По Hotta Y., Benzer S., 1973. Genetic Mechanisms, ed. by F. H. Ruddle, Academic Press, p. 129.)

тонио Гарсиа-Беллидо и Джоном Мерриамом для построения карты зачатков бластодермы, показывающей физическую связь между зачатками.

В принципе построение карт зачатков схоже с построением хромосомных карт, за исключением того, что в первом случае картируются сайты на двумерной поверхности бластодермы, а во втором — сайты по длине хромосомы. При построении карты зачатков, чем дальше друг от друга расположены зачатки, тем чаще будет проходить между ними линия разделения полов. Например, если у 10% всех гинандроморфов первая и вторая пары ног составлены из клеток разного пола, говорят, что зачатки этих ног находятся на расстоянии 10 стертов друг от друга на карте зачатков (см. рис. 17.7).

Карта зачатков, полученная путем детального количественного исследования гинандроморфов, обнаруживает поразительное сходство с организацией имаго по переднезадней оси (рис. 17.8). Сама яйцеклетка имеет хорошо различимые переднезаднюю и дорзально-вентральную оси, отражающие соответствующие оси самки, которая ее произвела. Построение логически согласованной карты зачатков бластодермы возможно только в том случае, если судьба тотипотентного ядра деления дробления определяется позицией, которую это ядро занимает во время формирования бластодермы. Эта ситуация является следствием случайной ориентировки первого деления дробления (рис. 17.3), на что указывает различная ориентация границы раздела полов у разных гинандроморфов.

Таким образом, в пределах оболочки яйцеклетки должна существовать некая *позиционная информация*, в результате реализации которой клетки, занявшие различное положение, вступают на различные пути развития.

Эмбриогенез мыши

Развитие мыши представляет интерес как тем, что может служить модельной системой для изучения развития человека, так и тем, что, сильно отличаясь от таковой у дрозофилы, она позволяет получить дополнительное представление о фундаментальных процессах развития. После оплодотворения яйцеклетки мыши зигота проходит несколько полных делений дробления; зародыш проходит стадии 2, 4, 8, 16, 32 и 64 клеток перед имплантацией в стенку матки (рис. 17.9). На стадии

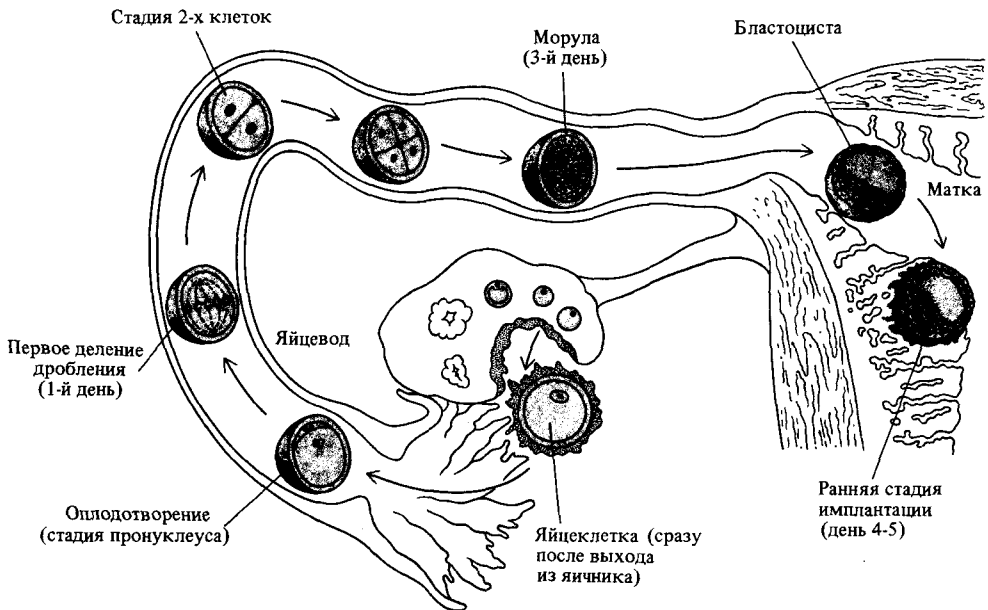


Рис. 17.9. Ранние стадии развития в эмбриогенезе мыши.

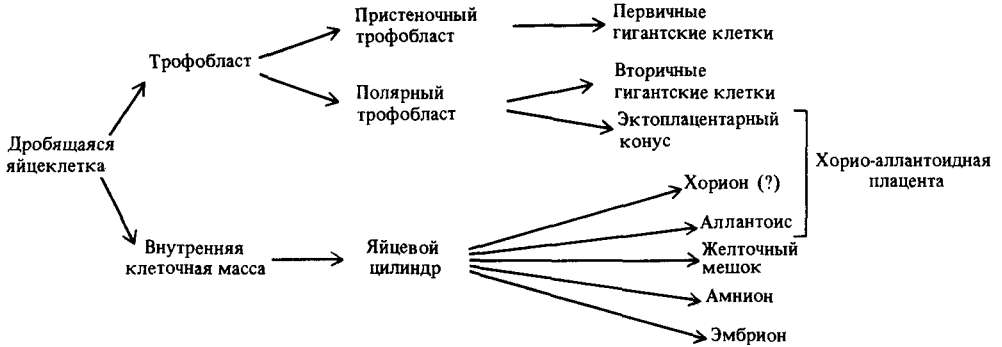


Рис. 17.10. Карта зачатков трофобластов и внутренней клеточной массы бластоцисты мыши в возрасте 3–5 дней. (По Gardiner R. L., 1975. In: Developmental Biology of Reproduction, ed. by C. Markert and J. Papaconstantinou, Academic Press, New York.)

8 клеток клетки тотипотентны; каждая из них может дать начало клеткам любого типа. Тотипотентность была показана путем трансплантации клетки 8-клеточного эмбриона одного генотипа в 8-клеточный эмбрион другого генотипа и проверки генотипов клеток плаценты и зародыша, который развился из созданного таким образом эмбриона-химеры. Для определения генотипа в экспериментах часто используют электрофоретически разделяемые варианты ферментов. На стадии 64 клеток (*бластоциста*) эмбрион, однако, состоит уже из клеток двух хорошо различимых типов: клеток внешнего слоя, или *трофобластов*, и клеток *внутренней клеточной массы* (ВКМ). Клетки бластоцисты уже не являются тотипотентными.

Считается, что первый сигнал к тому, чтобы сестринские клетки вступили на различные пути развития, поступает на стадии 16-клеток (стадия *морюлы*), когда в силу геометрических причин некоторые клетки оказываются со всех сторон окруженными другими клетками (*inside—outside hypothesis*). Вероятно, среда внутренних клеток отличается от таковой внешних клеток, которые находятся в контакте с яйцеводом. Этот позиционный сигнал вызывает первый шаг в детерминации клеток. К стадии бластоцисты эта ситуация становится очевидной благодаря разделению клеток на трофобласты и ВКМ. Однако дальнейшая судьба клеток ВКМ еще не определена. Отдельные клетки могут быть трансплантированы из ВКМ бластоцисты одного генотипа в ВКМ бластоцисты другого генотипа, где они принимают участие в процессе развития и дают начало химерным мышам, имеющим клетки двух разных генотипов. Показано, что одна клетка ВКМ дает начало дочерним клеткам, которые могут затем участвовать в образовании клеток любого типа у взрослой мыши. Сам зародыш развивается из нескольких клеток ВКМ; остальные клетки образуют ткани, не принадлежащие зародышу, такие, как плацента (рис. 17.10).

Генетический анализ развития

Развитие—это совокупность процессов, приводящих к превращению оплодотворенной яйцеклетки в сложно организованный многоклеточный организм. Разделение причины и следствия здесь, возможно,

является спекуляцией. Исследование мутаций, влияющих на развитие, предоставляет способ анализ развития и определения того, как взаимодействие различных процессов складывается в наблюдаемый нами непрерывный процесс развития.

На основе генетического анализа сформулирован ряд гипотез о том, как действуют гены, контролирующие развитие. Только для нескольких организмов разработаны генетические методики, позволяющие провести подобный анализ. Этими организмами являются лабораторная мышь – модель для исследования развития у млекопитающих и человека, плодовая мушка *Drosophila melanogaster* и почвенная нематода *Caenorhabditis elegans*. Два последних объекта имеют следующие преимущества. Благодаря 70 годам непрерывного изучения дрозофилы для нее разработаны наиболее изящные методики изучения генетического контроля развития. С другой стороны, *Caenorhabditis*, интенсивное изучение которой продолжается только 15 лет, имеет самый простой путь развития. Взрослые особи *Caenorhabditis* являются гермафродитами и состоят всего из 800 соматических клеток, образующихся из ядра зиготы в результате жестко контролируемой последовательности митозов. Происхождение всех клеток нормального организма *Caenorhabditis* известно; многие ее мутации, затрагивающие развитие, доступны для изучения. Однако в настоящее время большая часть наших представлений о том, как гены контролируют развитие, получена благодаря исследованиям, проведенным на дрозофиле и в меньшей степени на мыши.

Мутации, затрагивающие эмбриогенез у мыши

Локус *T* у мыши долгое время привлекал генетиков благодаря разнообразию возникающих в нем мутаций (см. гл. 6). Существует много рецессивных аллелей *t*, которые образуют с доминантным аллелем *T* сбалансированные летали. Этот удачный факт позволяет исследователям, занимающимся генетикой мышей, сохранять такие мутации для дальнейшего изучения (рис. 6.14) – преимущество, которым генетики-дрозофиллисты пользуются уже по крайней мере 60 лет, но которое отсутствует в случае большинства рецессивных летальных мутаций у мыши. Анализ комплементации аллелей *t* является одним из основных генетических приемов, позволяющих различить мутанты, поскольку большинство из них подавляет рекомбинацию в том районе хромосомы, где они возникли.

Показано, что некомплементарные аллели *t* в гомозиготном состоянии прерывают эмбриональное развитие на определенных стадиях (рис. 17.11). Эмбрионы, гомозиготные по t^{12} , достигают стадии морулы, но погибают перед стадией бластоцисты. Гомозиготы по t^{w73} достигают стадии бластоцисты, начинают имплантироваться в стенку матки, однако не могут сделать этого должным образом и погибают. Другие аллели *t* в гомозиготном состоянии блокируют последующие стадии эмбрионального развития. Поскольку каждый мутантный аллель, вероятно, блокирует развитие на стадии, где появляются новые межклеточные взаимодействия, возникает привлекательная гипотеза: локус *T* в норме контролирует развитие путем изменения свойств поверхностей

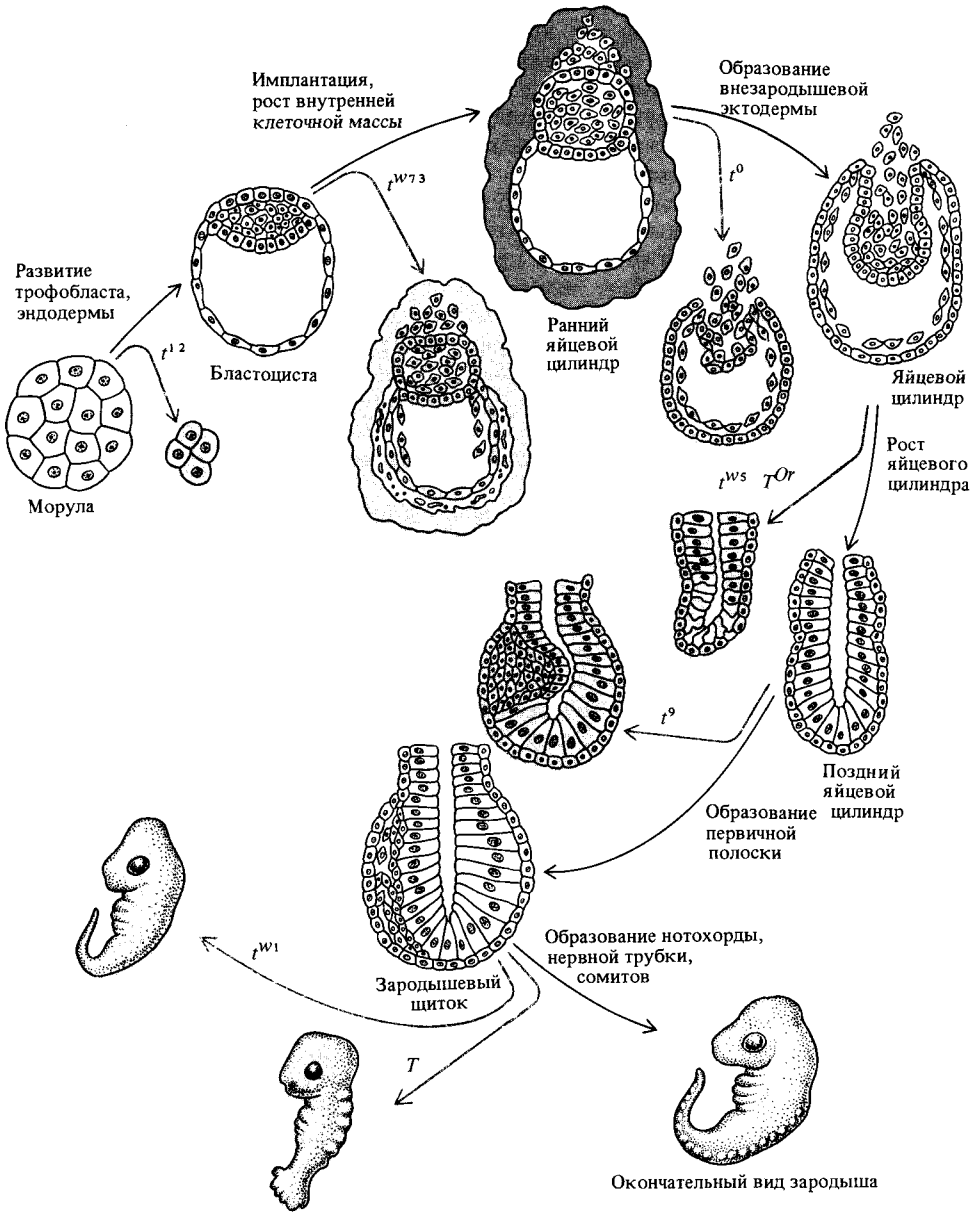


Рис. 17.11. Схематическое изображение раннего эмбриогенеза мыши; показаны остановки развития, наблюдаемые у эмбрионов, гомозиготных по некоторым мутациям локуса *T*. (По Bennett D., 1975. Cell, 6, 441.)

клеток и, таким образом, приводит к образованию новых клеточных ассоциаций.

Различные аллели t оказывают влияние на клеточную мембрану сперматозоидов, подтверждая тем самым высказанное выше предположение о том, что эти аллели влияют на клеточные мембраны ранних эмбрионов. Их воздействие на клеточные мембраны доказывается благодаря появлению новых антигенных свойств. Гетерозиготные самцы $t/+$ продуцируют два типа сперматозоидов, различающихся по антигенным свойствам, что предполагает активность локуса T после мейоза, когда развивается зрелая сперма. По неизвестной причине сперматозоиды, несущие аллель t , более эффективны при оплодотворении, чем сперматозоиды t^+ . Поэтому рецессивные аллели t имеют селективное преимущество во многих природных популяциях диких мышей, несмотря на свое вредное действие на организм.

Генетический анализ развития мыши производится на разных стадиях. Количество мутаций, интересных с этой точки зрения, невелико, тогда как сложность процессов развития высока. Напротив, генетический анализ *Drosophila* уже начинает приводить к построению логически последовательной модели того, как действуют гены при контроле менее сложного процесса развития у насекомых.

Мутации с материнским эффектом у дрозофилы

Тот факт, что положение тотипотентного ядра в оболочке яйцеклетки определяет путь развития этого ядра и дочерних митотических ядер, предполагает, что процесс оогенеза, предшествующий оплодотворению, должен играть важную роль в развитии зиготы. Действительно, многие мутации с материнским эффектом приводят к тому, что мутантная самка откладывает не развивающиеся нормально яйца, в которых происходит гибель зародыша независимо от его фенотипа (рис. 17.12). Наличие таких мутаций указывает на то, что развитие не может идти нормально в отсутствие должным образом подготовленной цитоплазмы яйцеклетки, образующейся под контролем материнского генома. Показано, что X-хромосома дрозофилы (составляющая 20% всего генома) содержит около 160 генов, способных давать летальные мутации с материнским эффектом (см. гл. 20). Это значительная доля (около 10%) всего числа генов X-хромосомы.

Природа дефектов ооплазмы, вызываемых этими мутациями, известна только в очень немногих случаях. На основе имеющихся в настоящее время данных невозможно определить, приводит ли большинство из этих мутаций к нарушению общего метаболизма или же к нарушению функций, необходимых для регуляции активности генов в эмбриональных клетках в процессе развития. Впрочем, по крайней мере некоторые из мутаций с материнским эффектом оказывают сильное влияние на развитие эмбриона.

Самки, гомозиготные по температурочувствительной мутации *daughterless*, откладывают яйца при непермиссивной температуре, при которой клетки XX (хромосомный набор самки) погибают. Только яйца,

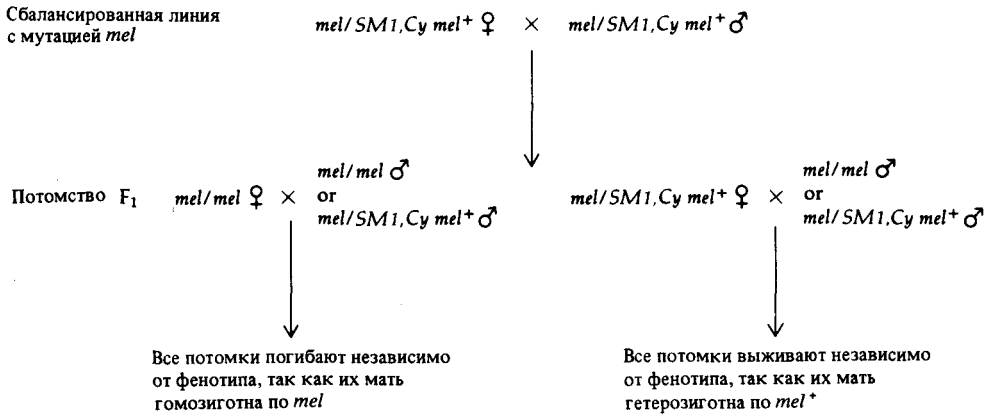


Рис. 17.12. Генетическая характеристика летальной мутации с материнским эффектом (*mel*). В качестве примера приведена мутация, расположенная во второй хромосоме дрозофилы и поддерживаемая в линии с хромосомой-балансером *SM-1*, маркированной доминантной мутацией *Curly* (*Cy*).

содержащие клетки ХУ (хромосомный набор самца), выживают и дают взрослых насекомых. Таким образом, самка, несущая эту мутацию, имеет только сыновей. Яйца самок генотипа *daughterless*, оплодотворенных сперматозоидами, несущими Х-хромосому, не погибают после инъекции в них очень малого количества цитоплазмы из нормальных неоплодотворенных яйцеклеток. Очевидно, что продукт гена *daughterless* дикого типа необходим для нормального развития самки.

Две другие мутации с материнским эффектом — *bicaudal* и *dorsal* — оказывают еще более глубокое влияние на поведение клеток бластодермы зародыша. Вероятно, эти мутации изменяют позиционную информацию в оболочке яйцеклетки таким способом, который предполагает наличие *координирующей системы*, определяющей эту информацию.

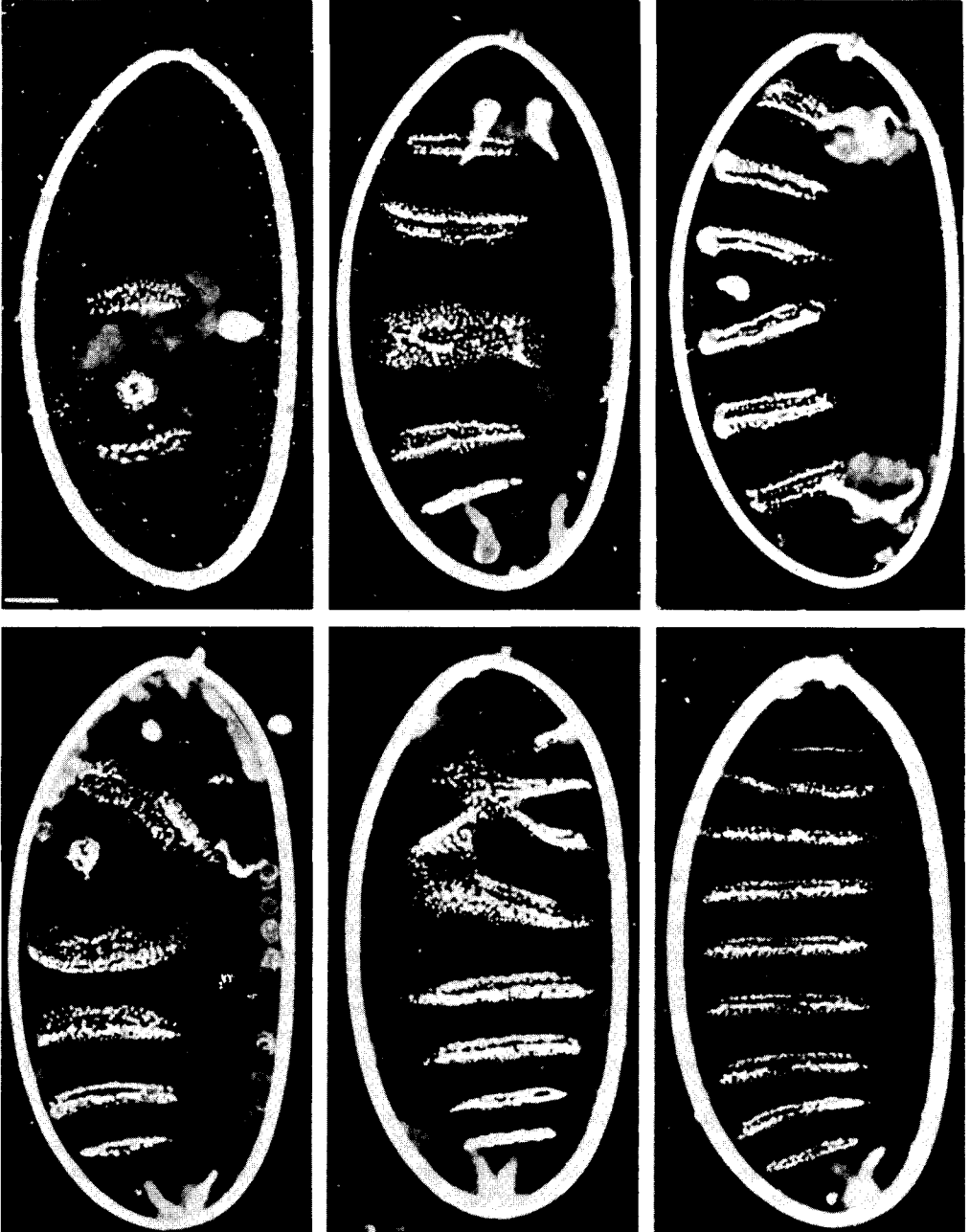
Самки, гомозиготные по мутации *bicaudal*, откладывают яйца, независимо от генотипа зиготы дающие уродливые эмбрионы с двумя брюшками. Передняя часть этих эмбрионов не развивается нормально, вместо нее как зеркальное отражение абдоминального отдела задней части образуется второе брюшко. Однако зачастую у обеих этих абдоминальных половин отсутствует часть абдоминальных сегментов (рис. 17.13, А).

Полярные клетки, обычно находящиеся в задней части зародыша, в аномальной передней части эмбриона *bicaudal* также не образуются. Ясно, что детерминация полярных клеток и клеток бластодермы осуществляется различными механизмами.

Такое грубое нарушение путей развития, как у клеток бластодермы в переднем конце эмбриона *bicaudal*, предполагает, что позиционная информация задней части эмбриона замещается на позиционную информацию его передней части.

Одна из простых моделей утверждает, что положение переднезадней оси в яйцеклетке определяется концентрацией некоего морфогена, образующего градиент концентрации вдоль этой оси. Возможно, что мута-

A



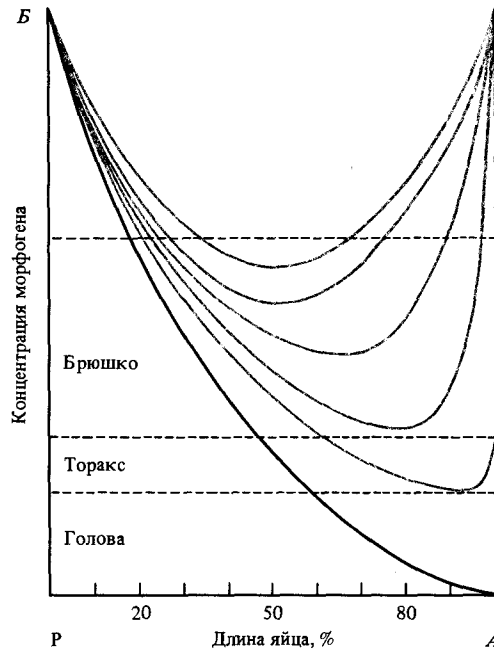


Рис. 17.13. А. Эмбрионы, имеющие фенотип *bicaudal*, выраженный в различной степени. Б. Градиент концентрации гипотетического морфогена вдоль передне-задней оси нормального эмбриона на стадии бластодермы (черная линия). Региональная детерминация частей тела определяется специфическими концентрациями морфогена в различных частях эмбриона. Высокие концентрации определяют развитие брюшка, низкие — головы, а промежуточные — торакса. Красными линиями обозначены нарушения градиента, приводящие к появлению абдоминальных сегментов как в передней, так и в задней частях эмбриона, расположенных как зеркальное от-

ражение друг друга. Увеличение этих нарушений градиента (1–5) приводит к увеличению нарушений в общей организации аномального эмбриона. Градиент, соответствующий кривой 1, приведет к отсутствию головы; соответствующий кривой 2 — к появлению крайней задней части брюшка в области головы, градиент, соответствующий кривой 3, — к возникновению симметричной зеркальной копии крайней задней части брюшка у центра яйца. (По Nüsslein C. Volhard, 1979. In: Determinants of Spatial Organisation, ed. by S. Subtelny and R. Konigsberg, Academic Press, New York, p. 199.)

ция *bicaudal* нарушает этот градиент так, что концентрации морфогена вдоль оси яйцеклетки изменяются, как показано на рис. 17.13, Б.

Самки, гомозиготные по мутации *dorsal*, откладывают яйца, в которых развивается трубка из эмбриональной гиподермы, т.е. из клеток, которые обычно образуют дорзальные клетки бластодермы. Внутренние органы, формирующиеся вследствие инвагинации вентральных клеток, не образуются; трубка гиподермы заключает в себе просто желточную массу. Вероятно, все клетки бластодермы, находящиеся ниже дорзально-вентральной линии, в этом случае развиваются не как вентральные, а как дорзальные клетки. Фенотип *dorsal* предполагает по аналогии с *bicaudal*, что мутация *dorsal* может нарушать образование градиента морфогена вдоль дорзально-вентральной оси яйца. Этот

морфоген предположительно отличается от морфогена, определяющего развитие по переднезадней оси. Существование двух данных мутаций предполагает, что организация яйцеклетки, сформированная в процессе онтогенеза, способствует возникновению градиентов двух морфогенов, расположенных под прямым углом друг к другу. Это обуславливает наличие в яйцеклетке координирующей системы, которая определяет положение каждой точки в пределах яйцеклетки через концентрацию двух морфогенов.

Таким образом, детерминация клеток эмбриона, т.е. выбор ими определенного пути развития, на стадии бластодермы осуществляется путем реализации позиционной информации, присутствующей в яйцеклетке. Отсюда следует, что реализация позиционной информации, возможно, является функцией ядер, мигрирующих к оболочке яйца во время формирования бластодермы, и поэтому на нее должен оказывать влияние генетический состав ядра зиготы. Если это так, то должны существовать мутанты, неправильно интерпретирующие позиционную информацию; эти мутанты должны влиять на развитие зародыша в зависимости от генотипа зиготы, а не материнского генотипа (см. рис. 17.12).

Гомеозисные мутации у *Drosophila*

Выбор клетками бластодермы определенного пути развития требует, чтобы позиционная информация ядра интерпретировалась клетками правильно, поскольку в этом случае для активации выбираются гены, специфичные для каждого данного пути развития. Поэтому экспрессия мутаций, нарушающих правильную интерпретацию позиционной информации или память об этой информации, должна осуществляться не материнским геномом, а геномом эмбриона. Известно много таких мутаций; они называются *гомеозисными*. Эти мутации приводят к тому, что клетки вступают на иной путь развития, чем тот, который им следовало выбрать, исходя из их расположения в бластодерме. Например, в результате мутации *Antennapedia* из клеток, дающих начало антенне, формируется нога. Мутация *Ophthalmoptera* приводит к тому, что клетки, из которых обычно развивается глаз, дают начало структурам ноги. В результате мутации *Proboscipedia* клетки, из которых у мух дикого типа возникает хоботок, дают при 25°C первую (проторакальную) пару ног, а при 17°C – антенны. Многие гомеозисные мутации действуют так, как будто их результатом является ошибочное определение клетками бластодермы своего расположения относительно переднезадней оси. Так, мутация *Proboscipedia* приводит к тому, что клетки, у нормальной мухи дающие начало хоботку, при 25°C развиваются как клетки следующего сегмента (проторакса), а при 17°C – как клетки предыдущего сегмента (антенно-глазного).

Гомеозисные мутации открывают нам существование генов, нормальной функцией которых является, вероятно, выбор или поддержание определенного пути развития, по которому следуют клетки. Каждый путь развития характеризуется экспрессией определенного набора генов, действие которых приводит к появлению конечного результата этого пути развития: глаза, крыла, ноги и т.д. С первого взгляда кажется уди-

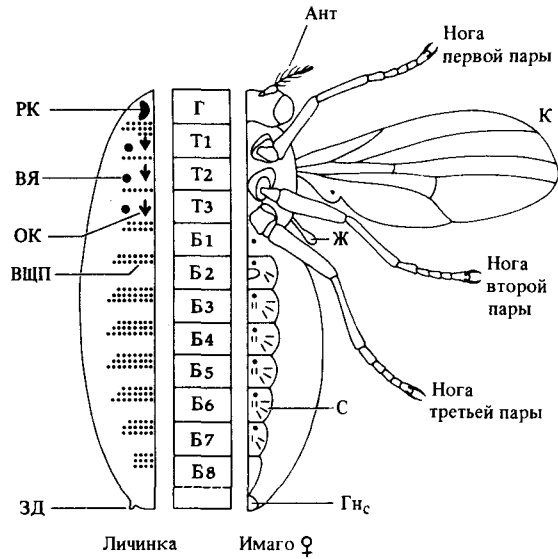


Рис. 17.14. Вид с вентральной стороны нормальной сегментации внешних органов дрозофилы: имаго (справа) и только что вышедшей из яйца личинки (слева). Г – голова; Т – торакс; Б – брюшко. Сегмент – специфические структуры личинки обозначены следующим образом: РК – ротовые крючки; ВЯ – вент-

ральные ямки; ОК – сенсорные органы Кейлина; ВЩП – вентральный щетиночный пояс; ЗД – заднее дыхальце (отверстие трахеальной системы). Обозначения имагинальных структур см. на подпике к рис. 17.5. (По Lewis E. B., 1982. In: Embryonic Development, Part A: Genetic Aspects. Alan R. Liss, New York, p. 272.)

вительным, что несмотря на наличие мутаций, приводящих к таким грубым нарушениям, развитие организма тем не менее доходит до стадии взрослой особи. Возможно, единственная, наиболее важная причина выживания подобных мутантов состоит в том, что такие мутации вызывают сравнительно небольшое нарушение нормальной функции гена. Экспрессивность этих мутаций низка: только некоторые, особо чувствительные клетки действительно имеют мутантный фенотип, тогда как у большей части клеток функциональная активность этого гена обеспечивает развитие нормального фенотипа. Мутационный анализ гомеозисных генов часто выявляет летальность для эмбриона мутаций, которые полностью подавляют функцию гена (таких, как, например, хромосомные делеции).

Наиболее хорошо изученная группа гомеозисных генов – это гены комплекса *bithorax* (ВХ-С), гигантского кластера тесно сцепленных генов, функция которых необходима для нормальной сегментации торакса и брюшка. На рис. 17.14 показана нормальная сегментация у только что вылупившейся из яйца личинки и у имаго.

Фундаментальное исследование генов группы *bithorax* с 1946 г. проводит Льюис. Эти исследования привели к появлению связной картины координации функций генов ВХ-С, необходимой для получения нормальной сегментации (рис. 17.15, А). Район ВХ-С содержит целый ряд рецессивных и доминантных точечных мутаций, приводящих к сегмент-

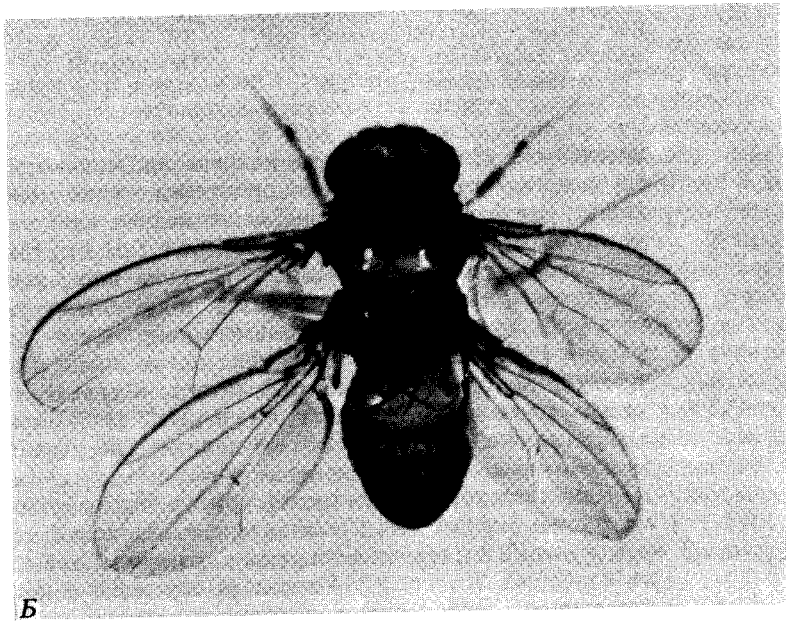
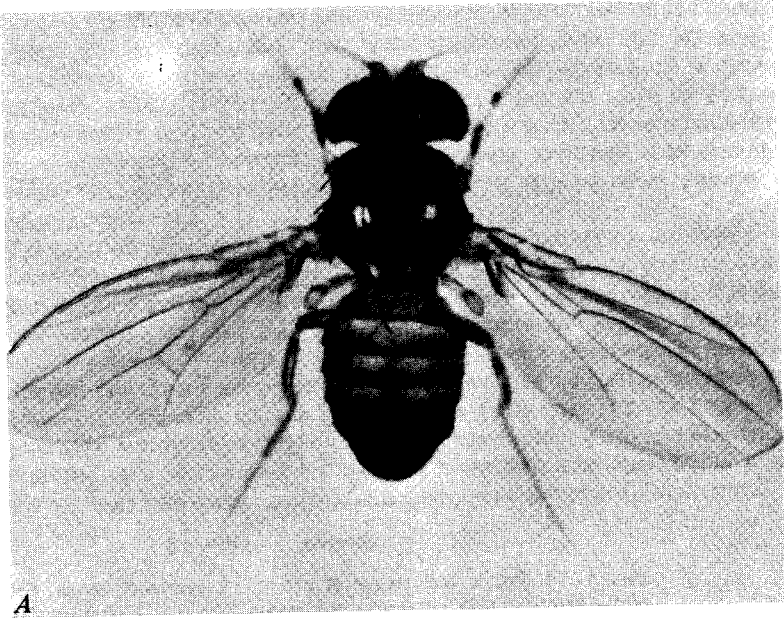


Рис. 17.15. Вид со спинной стороны (А) нормального самца дрозофилы и (Б) тройного мутанта, гомозиготного по мутациям *abx*, *bx*, *pbx*, у которого метоторакс (Т3) полностью превращен в мезоторакс (Т2). (Из Lewis E. B., 1982. In: Embryonic Development, Part A: Genetic Aspects. Alan R. Liss, New York, p. 274.)

Таблица 17.1. Трансформации имаго, вызванные точечными мутациями в ВХ-С

Рецессивные мутации, приводящие к утрате функции и вызывающие трансформацию в сегмент, находящийся в переднем положении

Мутант	Трансформация
<i>abx</i>	Крайний передний Т3 → крайний передний Т2
<i>bx</i>	Передний Т3 → передний Т2
<i>pbx</i>	Задний Т3 → задний Т2
<i>bxd</i>	Задний Т3 → задний Т2
	А1 → Т3
<i>Ubx</i>	Все перечисленные
<i>iab-2</i>	А2 → А1

Доминантные мутации, приводящие к восстановлению функции и вызывающие трансформацию в сегмент, находящийся в заднем положении

Мутант	Трансформация
<i>Cbx</i>	Т2 → Т3
<i>Hab</i>	Т3 → А2
<i>UaB</i>	А1 → А2
<i>Mcp</i>	А4 → А5

но-специфичным гомеозисным трансформациям у имаго (см. рис. 17.15, Б и табл. 17.1). При помощи хромосомных делеций или перестроек в ВХ-С можно сконструировать генотипы, у которых отсутствуют все или часть нормальных генов этого района. Такие делетированные генотипы позволяют изучить функции всех присутствующих генов независимо от того, были ли они идентифицированы благодаря точечным мутациям. Эти делеции летальны: развитие мухи происходит только до стадии выхода из куколки, на которой можно судить о функциях отсутствующих генов по сегментационной трансформации мутантных личинок. На рис. 17.16 показано расположение на хромосоме данных точечных мутаций и точек хромосомных разрывов, происходящих при делециях и перестройках, представляющих интерес для анализа района ВХ-С.

На рис. 17.17 сегментация нормальной линии сравнивается с типами сегментации личинок, у которых отсутствуют различные участки ВХ-С. Нормальные сегменты торакса и абдомена можно идентифицировать по ряду морфологических признаков, приведенных на рис. 17.14. Каждый из этих сегментов отличается по форме вентрального пояса щетинок (ВПЩ), по присутствию или отсутствию органов Кейлина, которые представляют собой три сенсорные щетинки, расположенные в углублении (КО), и присутствию или отсутствию вентральных ямок (ВЯ). Генотип, гомозиготный по *DfPg*, у которого отсутствует весь район ВХ-С, приводит к появлению фенотипа, где сегменты Т3 и А1-А7 представляют собой серию повторов сегмента Т2. Кроме того, аномален сегмент А8: у его задней части присутствуют хитиновые структуры, сходные с ротовыми частями головного сегмента. Ясно, что нормальный район ВХ-С содержит гены, необходимые для правильной дифференциации затронутых сегментов. В отсутствие этих генов все сег-

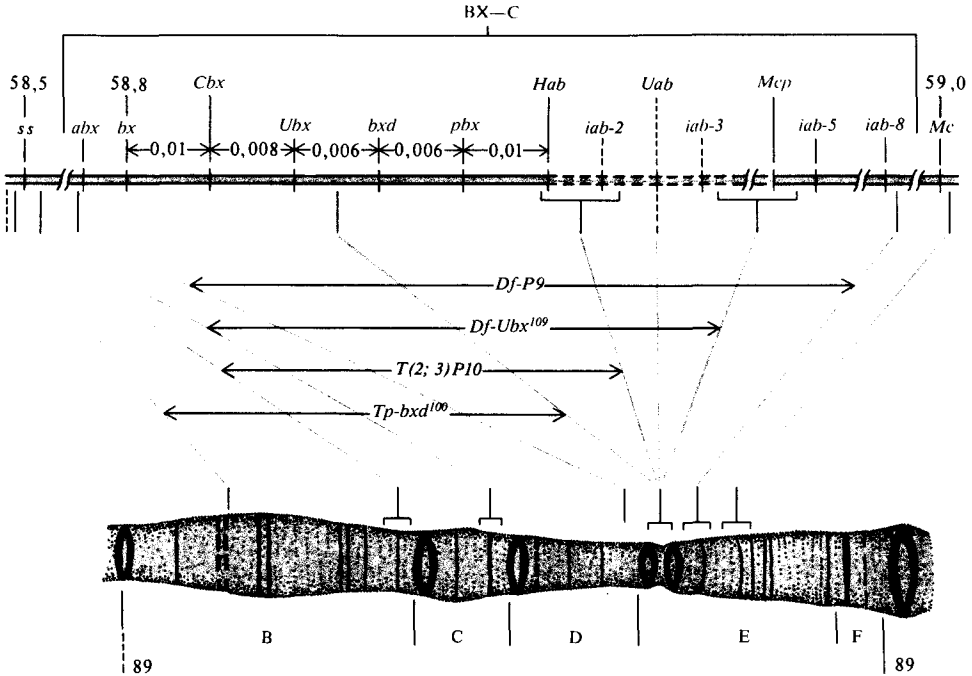


Рис. 17.16. Соответствие генетической карты и карты хромосомы слюнных желез комплекса генов *bithorax* и непосредственно прилегающих к нему участков в правом плече третьей хромосомы *D. melanogaster*. Обозначенная непрерывной линией часть карты сцепления построена на основе изучения рекомбинации. Участок, отмеченный пунктиром, построен на основе цитогенетического изучения хромосомных перестроек; расположение *Uab* относительно *iab-2* и *iab-3* точно не выяснено. Величина комплекса составляет

около 0,05–0,1 сантиморганид; он расположен в районе двух четко выраженных двойных полос и прилегающей слабоокрашенной полосы на участке хромосомы 89E. Взаимодействие *Df-P9* с мутациями и перестройками комплекса *bithorax* происходит так, как если бы делеция *Df-P9* захватывала все гены этого комплекса. (Из Duncan I., Lewis E. B., 1982. In: *Developmental Order: Its Origin and Regulation*, ed. by S. Subtelny and R. B. Green, Alan R. Liss, New York, p. 536.)

менты, кроме A8, развиваются как сегмент T2, что указывает на необходимость этих генов для определения сегмент-специфических путей развития всех сегментов, расположенных после T2.

Другие делетированные генотипы, приведенные на рис. 17.17, показывают, что различные участки BX-C содержат гены, контролирующее нормальное строение сегментов. С этими данными согласуется и тот факт, что точечные мутации района BX-C, нарушающие развитие определенных сегментов (см. табл. 17.1), картируются последовательно слева направо в соответствии с расположением аномальных сегментов от переднего к заднему концу личинки. Рecessивные (приводящие к утрате функции) мутации, нарушающие развитие нормального сегмента T3 и подавляющие путь развития T2, картированы в крайнем левом участке комплекса BX-C. Правее расположены гены, нарушающие развитие сегмента A2, еще правее – нарушающие развитие сегмента A3, и так далее. Единственное исключение из этого правила – мутация *pbx*

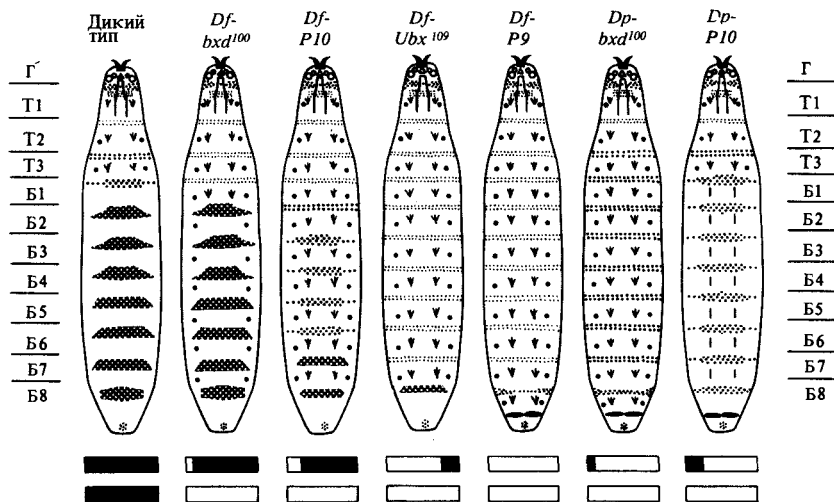


Рис. 17.17. Изменения сегментации только что вышедших из яйца личинок, имеющих генотипы с делециями части или всех генов ВХ-С. Отсутствующие участки 3-й пары хромосом показаны внизу рисунка; незакрашенная часть обозначает отсутствующий участок. Отметим, что различные участки ВХ-С затрагивают специфические признаки всех или некоторых сегментов Т и Б. Например, потеря крайнего левого участка (*Df-bdx¹⁰⁰*) приводит к появлению центральных ямок на всех сегментах А, однако органы Кейлина возникают только на Б1. Потеря несколь-

ко большего участка левого конца комплекса ВХ-С (*Df-P10*) приводит к появлению органов Кейлина на остальных сегментах Б. Напротив, присутствие этого участка при отсутствии остальной части ВХ-С частично подавляет образование органов Кейлина (остается только одна сенсорная щетинка) на сегментах Б и полностью подавляет образование вентральных ямок. Полное отсутствие ВХ-С (*Df-P9*) приводит к тому, что сегменты Т3–Б7 развиваются по типу Т2. Обозначения признаков см. в подписи к рис. 17.14. (По *Struhl G.*, 1981. *Nature*, **283**, 36.)

(рис. 17.16). Доминантные (восстанавливающие функцию) мутации ВХ-С также располагаются на карте в соответствии с порядком расположения сегментов, развитие которых они затрагивают.

Согласно модели, предложенной Льюисом, контроль сегментации торакса и живота происходит следующим образом: гены комплекса ВХ-С детерминируют образование продуктов – регуляторов действия других генов, ответственных за развитие сегмент-специфичных структур. Возможно, что в каждом сегменте действует определенный участок комплекса ВХ-С, который активирует гены, контролирующие сегмент-специфичный путь развития клеток этого сегмента. По предположению Льюиса, регуляция каждого из этих генов осуществляется активными в *цис*-положении контролирующими участками. Некоторые из них идентифицированы благодаря наличию в них доминантных мутаций, обуславливающих активность генов ВХ-С в сегментах, в которых эти гены в нормальном состоянии репрессированы. Далее Льюис высказывает предположение о присутствии в градиенте переднезадней оси бласто-

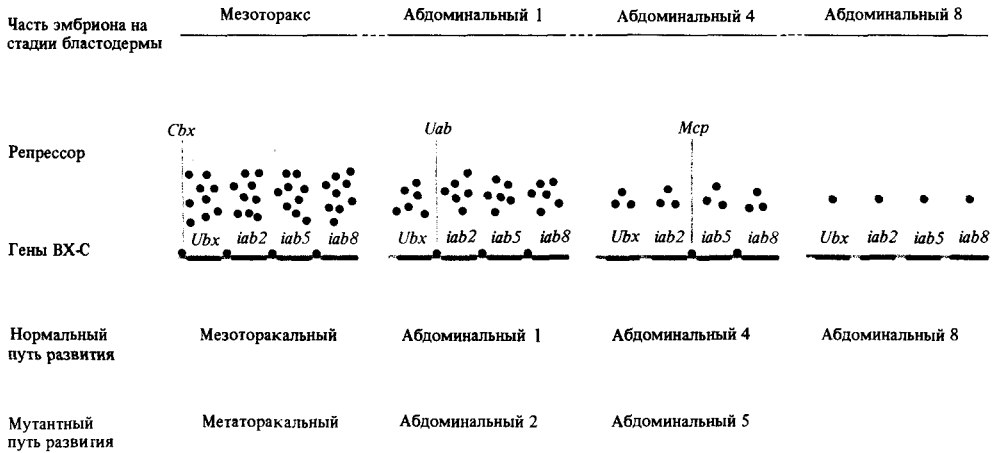


Рис. 17.18. Предложенная Льюисом модель регуляции действия генов ВХ-С через градиент концентрации репрессора (молекулы репрессора обозначены кружками) вдоль переднезадней оси эмбриона на стадии бластодермы. Наиболее высокой из приведенных на этом рисунке концентраций является концентрация в районе мезоторакса (Т2); наиболее низкой – концентрация в районе восьмого брюшного сегмента (В8). Регуляция каждого из генов ВХ-С осуществляется активным в *цис*-положении регуляторным сайтом ДНК (обозначен красным), который связывает репрессор с определенной степенью сродства (сайт с наиболее низкой степенью сродства к репрессору находится слева; по мере продвижения комплекса ВХ-С

слева направо степень сродства увеличивается). При наиболее высокой концентрации репрессора все сайты связаны. По мере снижения концентрации репрессора от левого к правому концу ВХ-С сайты с более низкой степенью сродства уже не могут связывать репрессор, что приводит к активации регулируемых ими структурных генов (*Ubx*, *iab2*, *iab5* и *iab8*) в специфических точках по передне-задней оси. Набор активных в данном районе генов комплекса ВХ-С приводит к выбору клетками этого района определенного пути развития. Действие трех мутантных регуляторных сайтов (которые не могут связывать репрессор) на выбор пути развития выделено цветом.

дермы *репрессора* генов ВХ-С; концентрация этого репрессора наиболее высока в районе бластодермы, соответствующем сегменту Т2, и наиболее низка в районе, соответствующем сегменту А8. Каждый контролирующий участок связывает этот репрессор с различной степенью сродства. Предполагается, что крайний левый контролирующий участок комплекса ВХ-С имеет наиболее низкое сродство к репрессору, а крайний правый – наиболее высокое. Таким образом, каждый сегмент от Т2 до А8 характеризуется активацией все увеличивающегося числа членов ВХ-С, определяемого концентрацией репрессора в сегменте и сродством контролирующих участков района ВХ-С к этому репрессору. В районе бластодермы, соответствующем Т2, высокая концентрация репрессора инактивирует все гены ВХ-С; клетки этого сегмента развиваются по типу Т2. В районе А8 низкая концентрация репрессора приводит к экспрессии всех генов ВХ-С, здесь клетки развиваются по типу А8. В промежутке между Т2 и А8, чем ближе к А8 расположен сегмент, тем большее число генов комплекса ВХ-С активировано в его клетках. На рис. 17.18 схематически представлены элементы этой модели для нескольких сегментов, на этом рисунке показан также постулированный Льюисом эффект нескольких мутаций контролирующих участков.

Данные, подтверждающие существование гипотетического репрессора, получены при исследовании мутаций гена *extra sex combs* (*esc*). Ген *esc* был впервые идентифицирован благодаря рецессивной мутации с частичной потерей функции, которая приводит к замене пар ног сегментов T2 и T3 на пары ног сегмента T1. Однако мутационный анализ, приведенный Штрулем, выявил аллели с полной потерей функции (*esc*⁻), а также температурочувствительный аллель (*esc*^{ts}). Исследование этих мутаций показало, что ген *esc*⁺ действует в течение первых нескольких часов эмбриогенеза, иницируя активность комплекса ВХ-С сегмент-специфическим образом. Мутация *esc*⁻ приводит к тому, что все эмбриональные сегменты развиваются по типу А8, т.е. имеет фенотип, ожидаемый для мутации, инактивирующей репрессор генов ВХ-С.

Отметим, что *esc* является мутацией с материнским эффектом. Когда яйцеклетки матерей генотипа *esc*⁻/*esc*⁺ оплодотворяются сперматозоидами *esc*⁻, зиготы *esc*⁻/*esc*⁻ развиваются вплоть до имагинальной стадии. С другой стороны, если яйцеклетки самок *esc*⁻/*esc*⁻ оплодотворяются сперматозоидами *esc*⁻, развитие зигот дает эмбрионы, в которых все сегменты развиваются по типу А8. Очевидно, организм матери предоставляет продукт гена *esc*⁺ в количестве, достаточном для инициации нормальной сегментации; после инициации для поддержания детерминированного состояния клеток под контролем комплекса ВХ-С этот генный продукт уже не требуется.

Доказательство того, что в отсутствие продукта гена *esc*⁺ гены комплекса ВХ-С активируются в сегментах торакса и абдомена беспорядочно, получено путем создания гомозиготных делеций, захватывающих весь район ВХ-С или его часть, в зиготах, где отсутствует продукт гена *esc*⁺. Развитие таких зигот показано на рис. 17.19. У эмбрионов, у которых отсутствуют все гены ВХ-С (*Df-P9*), сегменты T3 и абдоминальные сегменты напоминают сегменты T2, следовательно, сходство этих сегментов с А8 в отсутствие продукта гена *esc*⁺ действительно обусловлено активацией генов ВХ-С. Однако у головных сегментов эмбрионов с делецией ВХ-С по-прежнему наблюдается трансформация, характерная для эмбрионов, у которых продукт гена *esc*⁺ отсутствует. Это указывает на то, что *esc*⁺ также регулирует другие гомеозисные гены, необходимые для установления нормальных путей развития головных сегментов. В других исследованиях показано, что развитие головы и сегментов T1 контролируется генами комплекса *Antennapedia* (ANT-C), организация которого, возможно, сходна с организацией комплекса ВХ-С. Тогда возможно, что *esc*⁺ контролирует экспрессию как ВХ-С, так и ANT-C, определяя пути, по которым развиваются клетки всех сегментов.

Экспрессия генов ВХ-С контролируется также геном *Polycomb* (*Pc*). Подобно *esc*⁻, *Pc* также характеризуется наличием материнского эффекта на детерминацию клеток эмбриона на стадии бластодермы. Однако в отличие от *esc*⁺ продукт гена *Pc*⁺ необходим в течение всего времени развития для обеспечения нормальной экспрессии генов ВХ-С в клетках различных сегментов. Это было показано путем использования индуцированной рентгеновским облучением митотической рекомбинации для изменения генотипа отдельных клеток в имагинальных дисках во время развития личинки (см. *Дополнение 17.1* в конце главы).

Таким образом, модель Льюиса предлагает общий механизм детерминации клеток эмбриона на стадии бластодермы. Позиционная

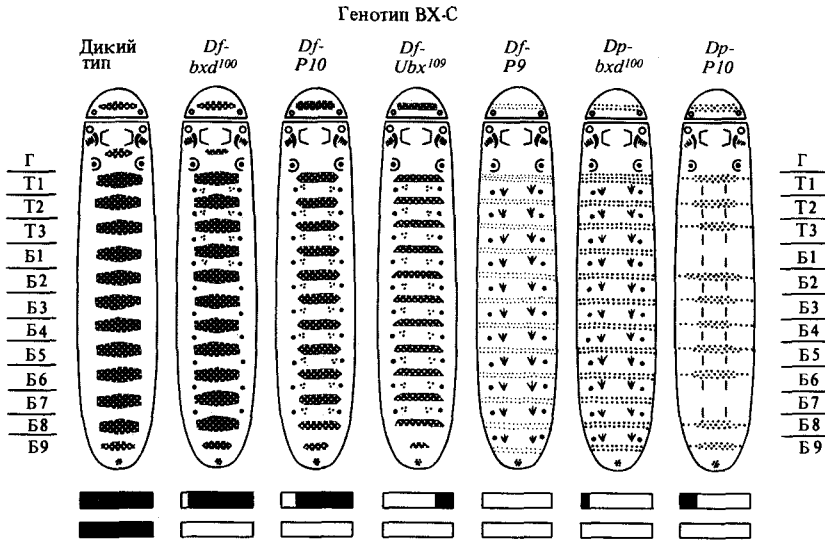


Рис. 17.19. Влияние утраты функции гена esc^+ на детерминацию сегментации мутантных эмбрионов на стадии выхода из яйца. Взаимодействие с различными генотипами ВХ-С показано слева направо. В присутствии нормального генотипа ВХ-С, утрата функции esc^+ приводит к тому, что сегменты Т1–Б8 дифференцируются как Б8. Кроме того, у таких личинок присутствует сегмент Б9 (отсутствующий у нормальных личинок) и наблюдается сложная трансформация головных сегментов. Эффект мутантных генотипов ВХ-С на диффе-

ренцировку сегментов показывает, что ВХ-С является эпистатическим по отношению к esc в сегментах Т1–Б9 (т.е. для экспрессии фенотипа esc необходимо присутствие генов ВХ-С). На основе этого факта было высказано предположение, что esc^+ подавляет действие генов комплекса ВХ-С. Генотип ВХ-С не оказывает влияния на некоторые трансформации головы, что свидетельствует о том, что esc^+ также подавляет действие других генов, возможно принадлежащих комплексу ANT-C. (По *Struhl G.*, 1981. *Nature*, 293, 36.)

информация вдоль переднезадней оси реализуется через концентрацию репрессора. Этот репрессор связывается с активными в *цис*-положении регуляторными последовательностями ДНК, причем степень связывания определяется как концентрацией репрессора, так и степенью его сродства к регуляторным последовательностям. Эти взаимодействия определяют экспрессию генов, находящихся под контролем регуляторных последовательностей. В клетках каждого сегмента происходит экспрессия определенного набора генов, действие которых определяет путь развития каждой клетки и дочерних клеток, возникших в результате митотических делений.

Определение пола и дозовая компенсация

Наличие пола, т.е. развитие двух различных типов скрещивающихся особей внутри одного вида,—общая черта всех эукариотических организмов, от дрожжей до человека. Выбор пола, очевидно, наиболее важный

выбор, который делает в процессе развития оплодотворенная яйцеклетка высшего организма. Как и следовало ожидать, наше понимание того, как происходит этот выбор, в основном основывается на изучении дрозофилы и мыши. У данных видов пол определяется хромосомным составом зиготы (см. гл. 3): зиготы, несущие две X-хромосомы, развиваются как самки, зиготы, несущие одну X и одну Y хромосому, — как самцы. Несмотря на эту общую черту, генетические механизмы, приводящие к выбору определенного пути развития на основе хромосомного состава и осуществляющие этот путь развития, совершенно различны у мыши и дрозофилы.

Как у мыши, так и у дрозофилы Y-хромосома несет аллели только нескольких генов X-хромосомы или вообще не имеет таких аллелей. Означает ли это, что у данных организмов самцы и самки различаются по уровню экспрессии сцепленных с полом генов? Ответ на этот вопрос отрицательный: уровень экспрессии большинства генов X-хромосомы одинаков в мужских и женских клетках мыши и дрозофилы.

Однако способы компенсации зависящей от пола дозы генов, сцепленных с полом, у этих двух организмов, родство между которыми очень отдаленное, совершенно различны. Кроме того, генетические регуляторные механизмы дозовой компенсации и определения пола нельзя назвать полностью независимыми друг от друга: необходимость дозовой компенсации обусловлена определением пола.

У *Drosophila* пол определяется отношением числа X-хромосом к числу аутосом: при $X/A = 1,0$ развиваются самки; если $X/A = 0,5$, развиваются самцы. Как данное отношение определяется на молекулярном уровне, неясно. Клетки особей с хромосомным набором $2X/3A$, где $X/A = 0,67$, очевидно, получают сигнал с неясным смыслом, поскольку в этом случае получаются мозаики, состоящие из чередующихся небольших участков мужских и женских клеток, т.е. отдельные клетки развиваются либо по мужскому, либо по женскому типу. Этот интерсексуальный фенотип обнаруживает высокую степень изменчивости от особи к особи по степени развития таких признаков, как половые органы, половые гребешки на передних ногах у самцов и абдоминальная пигментация.

Считается, что сигнал, возникший как следствие отношения X/A , ответствен за дозовую компенсацию и определение пола. Дозовая компенсация достигается в ответ на этот сигнал путем повышения транскрипционной активности генов единственной X-хромосомы мужских клеток по сравнению с каждой X-хромосомой женских клеток.

Генетический анализ определения пола и дозовой компенсации у *Drosophila* в настоящее время является интенсивно исследуемой областью. Идентифицировано большое количество мутантов, влияющих на развитие фенотипа, характерного для определения пола, и (или) на поло-специфическую активность генов X-хромосомы. Понимания взаимосвязанного действия этих генов пока не достигнуто. Как ни странно, сейчас существует более ясное представление о том, как происходят дозовая компенсация и определение пола в процессе развития млекопитающих.

У млекопитающих дозовая компенсация достигается путем инактивации одной из X-хромосом в клетках $2X/2A$ (в коротком плече X-хромосомы остаются активными по крайней мере два гена; возможно, что целиком инактивируется только ее левое плечо). Инактивированная

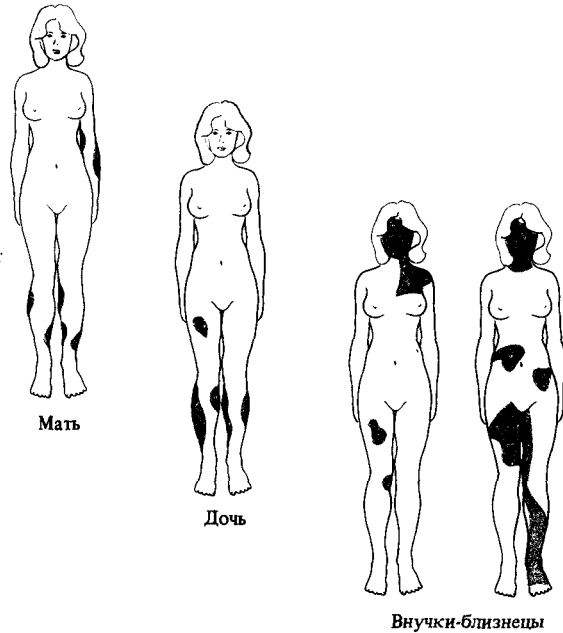
X-хромосома представлена в интерфазных ядрах соматических клеток самок в виде гетерохроматинового образования, которое в таких же ядрах самцов отсутствует. Эти образования из неактивного гетерохроматина иногда называют *тельцами Барра* в честь Мэррея Барра, который впервые наблюдал их в нейронах самок кошек в 1949 г. Инактивация X-хромосом соматических клеток происходит приблизительно во время имплантации эмбриона раннего возраста в матку. В период гаметогенеза и раннего развития инактивация и активация X-хромосом регулируются.

У плацентарных млекопитающих, таких, как человек, кошка, мышь, материнские и отцовские X-хромосомы инактивируются в различных клетках эмбриона случайным образом. Если определенная X-хромосома инактивируется, она остается инактивированной и у других клеток. Отсюда следует, что самки, гетерозиготные по генам X-хромосомы, являются мозаиками: они состоят из участков клеток, в которых происходит экспрессия разных аллелей гетерозиготы. Именно на основе открытия этого мозаицизма и была высказана гипотеза о том, что дозовая компенсация у млекопитающих осуществляется путем инактивации X-хромосом, а тельца Барра служат цитологическим доказательством этой инактивации. Например, кошки с черепаховой окраской, имеющие чередующиеся участки черной и желтой шерсти, почти всегда бывают самками. Котята-самцы у матерей черепаховой окраски бывают либо желтыми, либо черными, ген *yellow coat* (C^Y), определяющий желтую окраску шерсти, является аллелем гена *black coat* (C^B), определяющего черную окраску шерсти. Пятнистая черепаховая окраска самок (генотип C^Y/C^B) обусловлена случайной инактивацией X-хромосом в раннем периоде развития. Клеточные клоны – потомки клеток, в которых инактивирована хромосома с геном C^B , дают участки желтой шерсти, а те, в которых инактивирована хромосома с геном C^Y , – участки черной шерсти. Изредка встречаются самцы черепаховой окраски, они всегда обладают хромосомным набором XXУ и имеют одно тельце Барра в каждой из соматических клеток.

Женщины, гетерозиготные по генам, сцепленным с полом, являются *мозаиками*. Например, сцепленная с полом мутация эктодермальной дисплазии, обуславливающая отсутствие зубов, вызывает мозаицизм у гетерозиготных по ней женщин. У таких женщин на некоторых участках челюстей нет зубов; на теле чередуются участки кожи с присутствием и отсутствием потовых желез (рис. 17.20). Для женщин, гетерозиготных по сцепленному с полом гену гемофилии, характерна высокая степень изменчивости по количеству вырабатываемого организмом фактора свертываемости крови. Его количество варьирует от 20% до 100% нормального и, возможно, определяется случайностью инактивации X-хромосомы в относительно небольшом числе клеток, предшественников клеток крови.

Механизм инактивации X-хромосом неясен. Нормальные аутомные гены окраски шерсти у мышей, транслоцированные в X-хромосому, приобретают способность к инактивации. Самцы, несущие такую X-хромосому с транслокацией и гомозиготные по аутомному мутантному гену окраски, имеют нормальную окраску шерсти благодаря активности транслоцированного гена дикого типа. Однако шерсть самок, гетерозиготных по X-хромосоме с транслокацией, состоит из участков с нормальной и мутантной окраской. Очевидно, аутомный ген под-

Рис. 17.20. Три поколения женщин из одной семьи, гетерозиготных по мутации, вызывающей ангидротическую эктодермальную дисплазию (две последние женщины являются идентичными близнецами). У этих женщин отдельные участки кожи (на рисунке выделены цветом), где аллель дикого типа инактивирован, лишены потовых желез; остальная кожа, где инактивирован мутантный аллель, является нормальной. (По E. Novitski, Human Genetics, Macmillan, New York, 1977.)



вергается инактивации из-за своей локализации в другой хромосоме. Это предполагает, что дозовая компенсация структурных генов у млекопитающих не затрагивает регуляторные сайты, тесно сцепленные со структурными генами X-хромосомы. Напротив, X-хромосома млекопитающих должна иметь один (или более) сайтов, где инициируется инактивация. После осуществления выбора хромосомы для инактивации конденсация этой хромосомы предупреждает экспрессию всех присутствующих в ней генов.

Определение пола у млекопитающих

Развитие пола у млекопитающих – процесс, состоящий из двух этапов (рис. 17.21). Прежде всего хромосомный состав ядра определяет половую дифференциацию гонад, которые развиваются либо в семенники (XY/2A), либо в яичники (2X/2A). Если образуются семенники, они выделяют гормон тестостерон, циркулирующий по эмбриону и вызывающий развитие соматических клеток по мужскому типу. Напротив, если образуются яичники, отсутствие тестостерона приводит к тому, что клетки развиваются по женскому типу.

Целый ряд данных указывает на то, что образование семенников является прямым результатом действия генов, расположенных в Y-хромосоме. Прежде всего как у мыши, так и у человека нерасхождение хромосом ведет к появлению зигот XO/2A (см. гл. 3), которые развиваются по женскому типу и образуют яичники (у человека в этом случае яичники недоразвиты, что будет обсуждаться ниже). С другой стороны, в результате нерасхождения образуются также зиготы XXU/2A, которые развиваются по мужскому типу и дают самцов, имеющих семенники

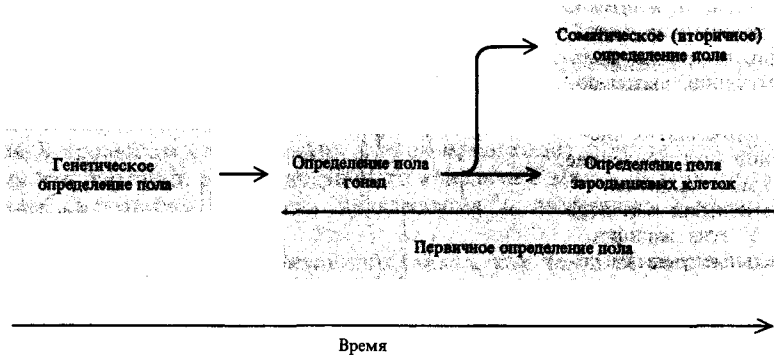


Рис. 17.21. Временная связь событий, связанных с определением пола у млекопитающих. (По *Mc Carrey J.R., Abbott U.K., 1979. Adv. in Genet. 20, 217.*)

(сперматогенез отсутствует). У человека описаны случаи появления кариотипа XXXXY, при этом развитие идет полностью по мужскому типу (происхождение подобных кариотипов является предметом обсуждения). Эти данные свидетельствуют о том, что у млекопитающих в отличие от дрозофилы пол не регулируется соотношением X/A; определяющую роль у них играет Y-хромосома.

Прямое доказательство того, что определяющие пол гены находятся в Y-хромосоме, получено путем изучения наследования доминантного признака *sex-reversed* (*Sxr*) у мышей. Наличие гена *Sxr* приводит к тому, что зиготы с двумя X-хромосомами развиваются по мужскому типу с образованием семенников (сперматогенез отсутствует). У таких самцов происходит инактивация одной X-хромосомы, и они являются мозаиками по генам, сцепленным с полом (рис. 17.22). Сначала предполагалось, что *Sxr* – аутосомный ген, поскольку он не сцеплен с X-хромосомой, а кариотип самцов *Sxr* включает две X-хромосомы и не имеет Y-хромосом. Однако целый ряд открытий, которые оказались возможными благодаря применению новых методов работы с ДНК, показали, что наследование мутации *Sxr* носит иной характер.

В отличие от млекопитающих, где гетерогаметный пол – самцы (XY), у многих видов пресмыкающихся и птиц гетерогаметным полом являются самки (ZW), а гомогаметным – самцы (ZZ). Взаимосвязь между этими двумя типами механизмов определения пола и пути эволюции каждого из них не выяснены.

Лалджи Сингх и Кеннет Джоунс показали, что ДНК самок змей содержит простую повторяющуюся последовательность, количество которой в ДНК самок гораздо больше, чем в ДНК самцов. Используя центрифугирование в градиенте CsCl, им удалось выделить фрагменты ДНК, содержащие эти повторы (и другие менее часто повторяющиеся последовательности, перемежающиеся с ними), идентифицировав их как минорную сателлитную ДНК по отношению к основной фракции геномной ДНК. Когда эти фрагменты ДНК поместили радиоактивной меткой и гибридизовали с препаратом митотических хромосом самок змей, положительный результат был получен только с W-хромосомой. Интересно, что эта сателлитная ДНК специфически связывается с ДНК особой гетерогаметного пола других рептилий, птиц и даже мышей



Рис. 17.22. Самец мыши генотипа XX *sex-reversed* (*sxr*). Неравномерность окраски обусловлена присутствием двух X-хромосом, несущих различные аллели, и инактивацией одного из них в различных участках кожи. (Courtesy of F. H. Rudle, J. W. Gordon, Yale University.)

и человека. Еще больший интерес представляет тот факт, что эта ДНК гибридизуется с политенными хромосомами *Drosophila*, маркируя соответствующий район X-хромосомы.

Использование методов генетической инженерии позволило клонировать нуклеотидные последовательности мыши, комплементарные сателлитной ДНК змеи. Сингх и Джоунс показали, что эти последовательности гибридизуются с околоцентромерным участком Y-хромосомы мыши и не гибридизуются с X-хромосомой из препаратов митотических хромосом нормальных мышей-самцов. Напротив, в митотических хромосомах мышей XX *Sxr* эти пробы гибридизуются с концом одной из X-хромосом. Следовательно, признак *Sxr* определяется X-хромосомой, несущей гены, которые детерминируют мужской пол и обычно находятся в Y-хромосоме.

Если аномальная X-хромосома, несущая гены, которые детерминируют мужской пол, действительно определяет фенотип *sex-reversed*, можно ожидать, что отцы мышей фенотипа *sex-reversed* также будут иметь аномальную X-хромосому. Однако в действительности дело обстоит иначе. Гибридизация пробы митотических хромосом самцов *Sxr* показывает, что они имеют нормальную X-хромосому и аномальную Y-хромосому. Эта аномальная Y-хромосома содержит два района, гибридизующихся с сателлитной ДНК змеи: один вблизи центромеры, как у нормальной Y-хромосомы, а другой у дистального конца.

Исследование хромосом в метафазе мейоза при сперматогенезе самцов *Sxr* показывает, что между аномальной Y-хромосомой и X-хромосомой иногда происходит нерасцепившийся кроссинговер, в результате чего возникает аномальная X-хромосома, присутствующая у самцов XX *Sxr* (рис. 17.23). Такой способ передачи свидетельствует о том, что опре-

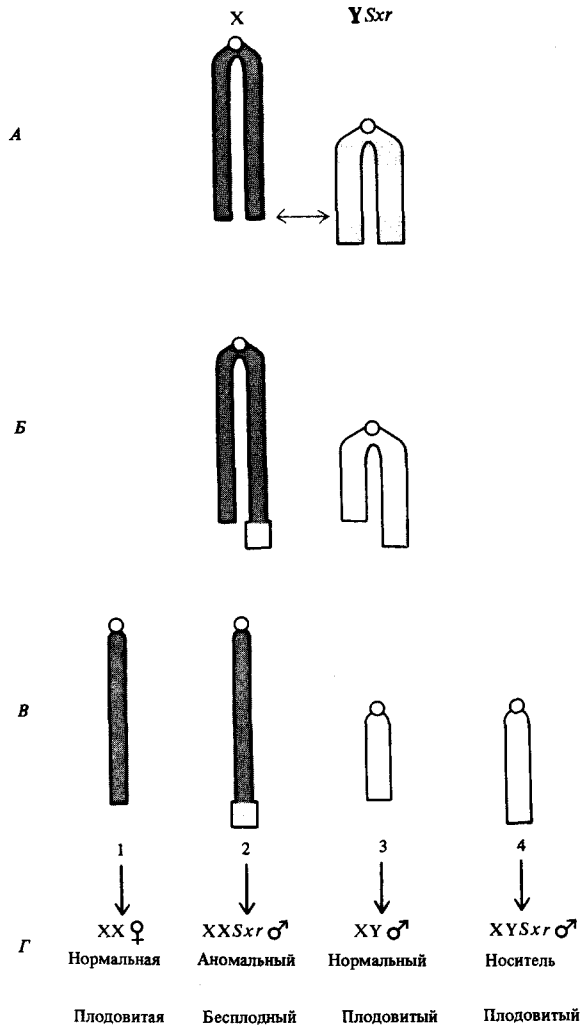


Рис. 17.23. Наследование гена *sex-reversed* у мышей. А. Профаза мейоза в сперматогенезе у самца мыши генотипа XY *sxr*. Аномальная Y-хромосома имеет последовательно, гибридузующиеся с сателлитной ДНК змей вблизи центромеры и у конца (выделены цветом). Концевое спаривание хроматид X и Y, вероятно, происходит нормально. В данном случае такое спаривание может привести к кроссинговеру, в результате которого терминальные гены, определяющие мужской пол,

будут перенесены в X-хромосому. Б. Метафаза первого деления мейоза. В. В результате второго деления мейоза образуются четыре типа сперматозоидов. Г. Зиготы, полученные при оплодотворении яйцеклеток, несущих X-хромосому. Поскольку в потомстве появляются самцы, несущие и не несущие мутацию *Sxr*, и самки с фенотипом *sex-reversed* и нормальные, вначале было высказано предположение об аутосомном доминантном наследовании этой мутации.

деление мужского пола является следствием наследования части Y-хромосомы, гибридирующей с сателлитной ДНК змеи.

Какова бы ни была природа находящихся в Y-хромосоме генов, определяющих мужской пол, они необходимы для того, чтобы недифференцированные гонады эмбриона развивались как семенники, что является первым шагом в развитии самца. В отсутствие процессов, вызывающих развитие семенников, недифференцированная гонада развивается как яичник.

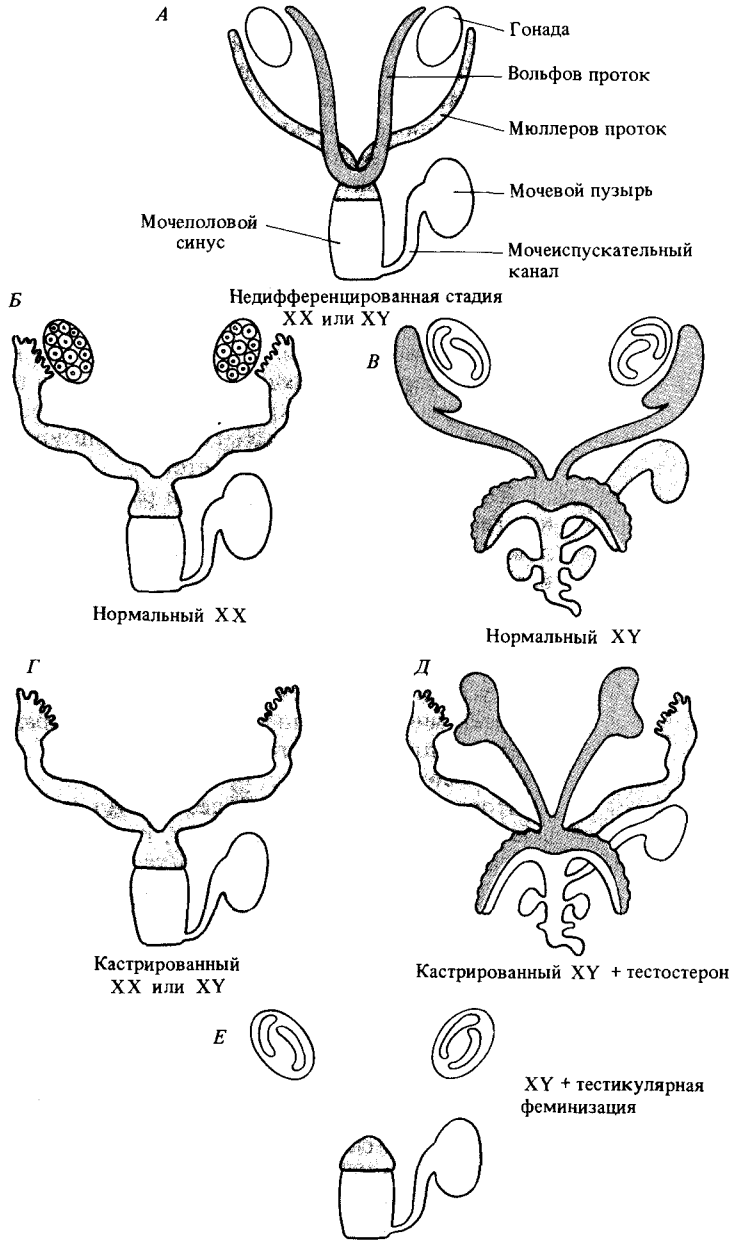
Зародышевые клетки возникают у раннего эмбриона в месте, удаленном от зачатка, который дает начало самостоятельной гонаде – половой складке. Во время раннего эмбриогенеза примордиальные клетки мигрируют к половой складке, где они участвуют в образовании недифференцированной гонады. После определения пола соматической гонады дифференцировка функциональных ооцитов или сперматоцитов зависит от набора половых хромосом самих зародышевых клеток. Хромосомный механизм дозовой компенсации играет важную роль в дифференцировке зародышевых клеток.

Как у человека, так и у мыши развитие нормального ооцита, вероятно, требует наличия двух активных X-хромосом. Либо в женских половых клетках не происходит инактивации X-хромосомы, либо инактивированная X-хромосома в ооцитах реактивируется. Как уже упоминалось, у человека зиготы XO развиваются по женскому типу, однако происходящий при этом аномальный оогенез приводит к дегенерации яичников. У мыши зиготы с генотипом XO также развиваются как самки, и у молодых особей сначала происходит нормальный оогенез, однако затем яичники дегенерируют. Таким образом, для поддержания нормальной плодовитости самок, вероятно, необходимы две активные X-хромосомы.

Нормальный сперматогенез требует инактивации одной из X-хромосом в первичных сперматоцитах, где цитологически эта хромосома обнаруживается в виде инертного тельца Барра. В сперматоцитах особей человека и мыши, имеющих генотип XXУ, или у мышей генотипа XX SxY инактивируется только одна из X-хромосом, поэтому функционально активная сперма не образуется. Очевидно, X-хромосома несет один или более генов, экспрессия которых при нормальном сперматогенезе должна отсутствовать.

Как отмечалось ранее и показано на рис. 17.21, развитие вторичных, или соматических, половых признаков является следствием половой дифференцировки гонад, что в свою очередь определяется набором половых хромосом. Развивающиеся семенники выделяют тестостерон, гормональный сигнал, вызывающий развитие по мужскому типу. В отсутствие этого сигнала развитие происходит по женскому типу. Развитие по мужскому типу находится под контролем единственного сцепленного с X-хромосомой гена (Tfm^+), обуславливающего образование связывающегося с тестостероном белка, который присутствует в цитоплазме всех клеток как у самцов, так и у самок. Этот белок выполняет функцию регулятора, который активируется, связывая тестостерон (молекулу-эффе́ктор). Затем комплекс белок–тестостерон входит в ядро и активирует гены, необходимые для дифференцировки по мужскому типу. У нескольких видов, включая человека, известна мутация гена Tfm , вызывающая синдром, называемый *тестикулярной феминизацией*. Клетки мутантных эмбрионов генотипа Tfm/Y совершенно нечувстви-

Рис. 17.24. Схема, показывающая роль тестостерона во вторичной половой детерминации репродуктивных органов человека. Вольфов проток (мужской) показан серым цветом, мюллеров проток (женский) — на рисунке имеет темный цвет; мочеполовой синус, включающий мочевой пузырь и мочеиспускательный канал — светлые. Два овальных образования — гонады: недифференцированные гонады (пустые), яичники (заполненные мелкими кружками) и семенники (содержащие канальца). (По Ohno S., 1971. Nature, 234, 134.)



тельны к маскулинизирующему действию тестостерона; вследствие этого все внешние вторичные половые признаки зародыша развиваются не по мужскому, а по женскому типу. Однако вместо яичников у таких особей развиваются семенники, которые подавляют развитие фаллопиевых труб и матки, секретирруя другой мужской половой гормон, известный как χ -фактор, что приводит к появлению слепого влагалища (рис. 17.24).

Как и клетки ХУ, клетки ХХ продуцируют рецептор тестостерона и способны реагировать на присутствие этого гормона. Введение тестостерона в зародыши генотипа ХХ или кастрированные зародыши ХУ вызывает развитие всех внешних вторичных половых признаков самца. Однако вследствие отсутствия χ -фактора у таких эмбрионов развиваются как женские, так и мужские половые пути, что приводит к гермафродитизму.

Таким образом, сейчас начинает складываться связанная картина полового развития у млекопитающих. Благодаря изучению фенотипического проявления мутаций *Sxr* и *Tfm* этот процесс стал понятен в общих чертах. Однако для полного понимания этого процесса предстоит выяснить еще многие детали.

Механизмы генетической регуляции

Молекулярные механизмы, лежащие в основе примеров генетической регуляции, описанной в этой главе, в основном неизвестны. Однако генетический анализ сложных процессов развития позволил идентифицировать гены, играющие важную – возможно, даже главную – роль в процессах развития, как, например, гены *VX-C* у дрозофилы или *T*-локус у мыши. Генетические исследования помогают понять сложность генетических регуляторных механизмов, управляющих процессами развития, и сформулировать гипотезы, касающиеся их функций. Методики, использующие рекомбинантную ДНК, в настоящее время применяются для клонирования генов, играющих важную роль в процессе развития. С помощью этих методов изучают структуру генов и транскрипцию в отдельных клетках развивающегося зародыша. Первые результаты таких исследований мы обсуждали в гл. 16 при рассмотрении генов глобина человека. Вскоре появятся новые результаты.

Дополнение 17.1. Митотическая рекомбинация

Митотическую рекомбинацию между не-сестринскими хроматидами можно индуцировать путем рентгеновского облучения клеток на стадии G2 клеточного цикла (см. гл. 1). Индуцированная митотическая рекомбинация обычно происходит как обмен центромерного гетерохроматина, что в следующем митозе может привести (в половине случаев) к появлению двух дочерних клеток, гомозиготных по тем плечам хромосомы, по которым материнская клетка была гетерозиготной. Если материнская клетка гетерозиготна по ауто-

сомным рецессивным мутациям, влияющим на развитие признаков взрослого организма – таким, как, например, для дрозофилы, форма щетинок, цвет кутикулы, или цвет глаз, – на фоне гетерозиготных клеток появляются клоны, полученные от гомозиготных дочерних клеток. Как показано на рис. 17.25, митотическая рекомбинация, индуцированная в глазном имагинальном диске, гетерозиготном по двум различным аллелям локуса *white*, приводит у имаго к образованию глаза, состоящего из двух клонов (располо-

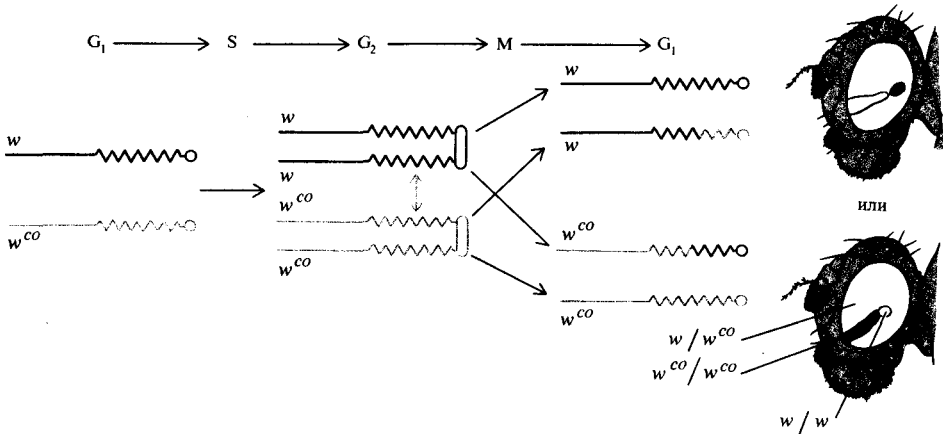


Рис. 17.25. Митотическая рекомбинация в X-хромосоме дрозофилы. Когда митотическая рекомбинация происходит в клетке глазного имагинального диска, нормальное расхождение хромосом в митозе приводит к развитию глаза с «парными пятнами». Аллели w и w^{co} принадлежат локусу *white*; глаза особи w/w^{co} имеют темно-красный цвет.

Заметные различия в форме и размере пятен в задней и передней части глаза свидетельствуют о влиянии положения клеток на их пролиферацию в процессе развития. (По Nöthinger R., 1972. In: *Biology of Imaginal Discs*, ed. by H. Ursprung, R. Nöthinger, Springer-Verlag, New York.)

женных рядом пятен), каждый из которых гомозиготен по одному из этих аллелей *white*.

Индукированная рентгеновским облучением митотическая рекомбинация дает исследователям удобный метод изучения действия генов в процессе развития. Время облучения в процессе развития можно контролировать таким образом, что по эффекту митотической рекомбинации на признак взрослого организма определяется момент времени, когда было произведено изменение генотипа клетки. Митотическая рекомбинация, возникающая вследствие рентгеновского облучения, происходит в клетках развивающегося организма случайным образом, поэтому для того, чтобы найти клоны в интересующих исследователя органах (например, в глазах — см. рис. 17.25), необходимо проанализировать большое количество особей.

Митотическая рекомбинация была использована для того, чтобы установить, требуется ли ген Pc^+ только на стадии эмбриогенеза для определения экспрессии генов ВХ-С или же он необходим и на

более поздних стадиях развития для поддержания уровня экспрессии этих генов.

Эмбрионы, гомозиготные по X-хромосоме, несущей ген *yellow* (y), который определяет образование желтой кутикулы и щетинок, и гетерозиготные по третьей хромосоме, имеющей в левом плече Pc^+ и транслоцированный ген y^+ , подвергаются облучению на стадии личинки (рис. 17.26). Клоны гомозиготных по Pc клеток легко идентифицировать у имаго по желтой кутикуле и щетинкам. Если такие клоны появляются на голове, тораксе или абдоминальных сегментах, их клетки дифференцируются как клетки анальной пластинки-структуры, принадлежащей эмбриональному сегменту А8. Однако при возникновении клонов в анальных пластинках их клетки дифференцируются как клетки нормальной анальной пластинки. Таким образом, удаление Pc^+ из клеток имагинального диска во время развития личинки приводит к активации всех генов комплекса ВХ-С, что указывает на необходимость присутствия продукта гена Pc^+ в имагинальных клетках для поддержания

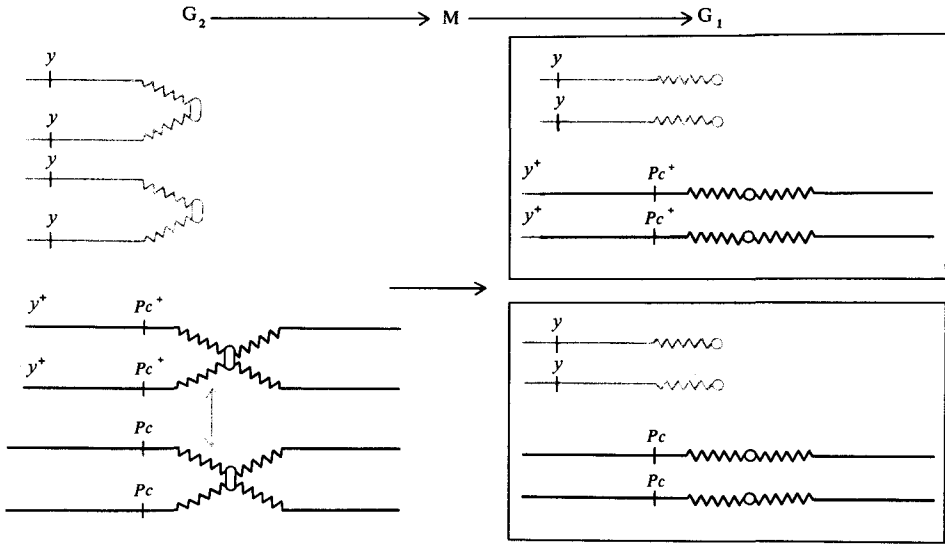


Рис. 17.26. Зиготический генотип (слева) клетки, гетерозиготной по *Polyscomb*⁺, можно изменить путем индуцированной рентгеновским облучением митотической рекомбинации, в результате чего возникает клон клеток, гомозиготных по мутантному аллелю *Pc*

(справа внизу). Такой клон клеток идентифицируется у имаго по желтой кутикуле и щетинкам (фенотип *yellow*); эффект утраты *Pc*⁺ устанавливается путем анализа типа имагинальных структур, производимых клетками клона.

необходимого уровня экспрессии генов ВХ-С.

Проведенные подобным образом эксперименты по митотической рекомбинации, в которых клоны гомозиготных по мутациям генов ВХ-С клеток получены путем облучения гетерозиготных личинок на разных стадиях их развития, показывают, что гены ВХ-С необходимы для поддержания нормального состояния клеточной детерминации непосредственно перед окукливанием. Дифференцировка клонов, индуцированных задолго до окукливания, происходит в соответствии с их мутантным генотипом. Клоны, индуциро-

ванные незадолго до окукливания, дифференцируются нормально, что свидетельствует о присутствии во время окукливания нормальных продуктов генов ВХ-С, которые направляют дифференцировку по правильному пути вопреки мутантному генотипу клеток. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что гены ВХ-С управляют процессами развития путем выбора и поддержания в клетках специфических путей развития. Выбор этих путей развития происходит в раннем эмбриогенезе в соответствии с местом расположения клеток бластодермы.

Литература

- Bennett D. (1975). The T-locus of the mouse, *Cell*, **6**, 441–454.
- Duncan I., Lewis E. B., 1982. Genetic control of body segment differentiation in *Drosophila*. In: Developmental Order: Its Origin and Regulation, ed. by S. Subtelny and P. B. Green, Alan R. Liss, New York, pp. 533–554.
- Evans E. P., Burtenshaw M. D., Cattanaeh B. M. (1982). Meiotic crossing-over between the X and Y chromosomes of male mice carrying the sex-reversing (*Sxr*) factor, *Nature*, **300**, 443–445.
- Gardner R. L. Analysis of determination and differentiation in the early mammalian embryo using intra- and interspecific chimeras. In: The Developmental Biology of Reproduction, ed. by C. Markert and J. Papaconstantinou, Academic Press, New York, 1975, pp. 207–236.
- Gehring W. Control of determination in the *Drosophila* embryo. In: Genetic Mechanisms of Development, ed. by F. H. Ruddle, Academic Press, New York, 1973, pp. 103–128.
- Gordon J., Ruddle F. (1981). Mammalian gonadal determination and gametogenesis, *Science*, **211**, 1265–1271.
- Gurdon J. B., 1974. The Control of Gene Expression in Animal Development, Clarendon Press, Oxford.
- Hansmann I. (1982). Sex reversal in the mouse, *Cell*, **30**, 331–332.
- Hotta Y., Benzer S. Mapping of behavior in *Drosophila* mosaics. In: Genetic Mechanisms of Development, ed. by F. H. Ruddle, Academic Press, New York, 1973, pp. 129–167.
- Lewis E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, *Nature*, **276**, 565–570.
- Lewis E. B. Developmental genetics of the bithorax complex in *Drosophila*. In: Developmental Biology Using Purified Genes, ed. by D. D. Brown, Academic Press, New York, 1981, pp. 189–208.
- Lewis E. B. Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex. In: Embryonic Development, part A: Genetic Aspects, Alan R. Liss, New York, 1982, pp. 269–288.
- Mahowald A. et al. Germ plasm and pole cells in *Drosophila*. In: Determinants of Spatial Organization, ed. by S. Subtelny and I. R. Konigsberg, Academic Press, New York, 1979, pp. 127–146.
- Morata G., Lawrence P. (1977). Homoeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*, *Nature*, **265**, 211–216.
- Nüsslein-Volhard C. Maternal effect mutations that alter the spatial coordinates of the embryo of *Drosophila melanogaster*. In: Determinants of Spatial Organization, ed. by S. Subtelny and I. R. Konigsberg, Academic Press, New York, 1979, 185–211.
- Ohno S. (1976). Major regulatory genes for mammalian sexual development, *Cell*, **7**, 315–321.
- Postlethwait J. H., Schneiderman H. A. (1973). Developmental genetics of *Drosophila* imaginal discs, *Annu. Rev. Genet.*, **7**, 381–433.
- Singh L., Jones K. (1982). Sex reversal in the mouse is caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the X and an aberrant Y chromosome, *Cell*, **28**, 205–216.
- Struhl G. (1981). A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*, *Nature*, **293**, 36–41.
- Struhl G., Brower D. (1982). Early role of the *esc*⁺ gene product in the determination of segments of *Drosophila*, *Cell*, **31**, 285–292.

Ключевые слова и понятия

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Бластоциста | Комплекс генов |
| Внутренняя клеточная масса (ВКМ) | Мозаики |
| Гинандроморф | Морула |
| Гомеозисные мутации | Мутации с материнским эффектом |
| Детерминация клеток | Определение пола |
| Дифференциальная экспрессия генов | Позиционная информация |
| Дозовая компенсация | Стерт |
| Имагинальный диск | Тельца Барра |
| Инактивация X-хромосомы | Тотипотентность |
| Карта зачатков | Трофобласт |

Задачи

17.1. У некоторых женщин, носительниц гена дальтонизма (неспособность различать красный и зеленый цвет), этот дефект зрения в какой-то степени проявляется. Почему?

17.2. Самки дрозофилы, гомозиготные по мутации *grandchildless*, дают в потомстве стерильных самцов и самок. Как объяснить происхождение этой стерильности? Каким образом вы могли бы проверить вашу гипотезу?

17.3. Половые органы самцов и самок дрозофилы, расположенные на конце брюшка, резко различаются по морфологии. Внимательное изучение 200 гинандроморфов показало, что у многих из них половые органы представляют собой комбинации женских и мужских генитальных структур. Например, левая часть брюшка которых имеет генотип XO, а правая – генотип XX, левая половина половых органов соответствует самке, а правая – самцу. Около 1% этих 200 гинандроморфов были лишены половых органов; еще у 1% гинандроморфов имелись и мужские, и женские полностью развитые половые органы. Как бы вы объяснили эти наблюдения, исходя из организации бластодермы?

17.4. В потомстве от скрещивания самок дрозофилы, гомозиготных по мутациям *yellow*, *vermillion*, *singed*, с самцами дикого типа с низкой частотой (около 2 на 10^4 зигот XX) встречаются гинандроморфы. У некоторых гинандроморфов все ткани головы имеют генотип XO, что видно по желтому цвету кутикулы (фенотип *yellow*) и «опаленным» щетинкам (фенотип *singed*); однако цвет глаз у этих мух дикого типа, а не *vermillion*. Как вы объясните эти результаты? (См. рис. 10.9.)

17.5. Путешественник, вернувшийся из отдаленной страны, рассказал, что видел там семью, в которой мать и две из трех ее дочерей страдали врожденным отсутствием зубов в различных участках челюстей. У третьей дочери, однако, все зубы были целы. С этой семьей жил также старший сын и его жена. Сын имел тот же на-

следственный недостаток, что мать и две его младшие сестры; на его жену постоянно сыпались упреки со стороны своих родственников из-за того, что после пяти лет брака она так и не имела детей. Объясните, почему у этой женщины не было детей.

17.6. Было высказано утверждение, что несколько лет назад в некоей секретной лаборатории клонирован человек путем трансплантации диплоидного ядра соматической клетки в человеческую яйцеклетку, лишённую ядра. Утверждалось, что после того, как началось развитие, эмбрион был имплантирован в матку приемной матери, у которой через девять месяцев родился здоровый ребенок. Этот клонированный ребенок якобы хорошо развивается и получает прекрасное воспитание. Исходя из ваших знаний о процессах развития, какова вероятность того, что некий богатый эгоист мог получить свою точную копию путем клонирования?

17.7. Путем слияния двух и более восьмиклеточных эмбрионов различных генотипов можно получить мышей-химер. Клетки перестраиваются и формируют аномально крупную морулу, которая при развитии дает зародыш обычного размера, а затем новорожденного мышонка нормального размера, состоящего из клеток разных генотипов. Были проведены эксперименты по слиянию четырех генетически маркированных зародышей; маркерами служили гены, определяющие белую, черную, желтую и светло-коричневую окраску шерсти. В результате получены мыши, имеющие шерсть с пятнами двух или трех этих цветов, однако химер, которые имели бы пятна всех четырех цветов, получить никогда не удавалось. Как можно объяснить эти наблюдения?

17.8. При выращивании при 17°C эмбрионов *D. melanogaster*, гомозиготных по гомеозисной мутации *ophthalmoptera*, взрослые особи имеют нормальные глаза; однако если личинок выращивать при 29°C, большая часть тканей глаза заменяется на ткань крыла. Когда яйца таких

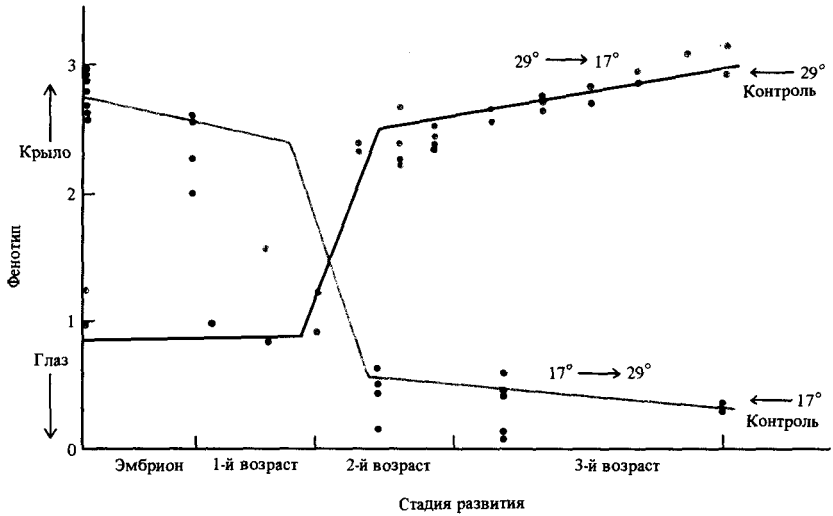


Рис. 17.27. Эффект смены температуры на определенных стадиях развития на гомеозисную трансформацию структур глаза в структуры крыла у *D. melanogaster*. Средний фенотип особей имаго, которые в течение всего времени развития находились при температуре 17 или 27°C,

показан уровнем стрелок с надписью «Контроль». Каждая точка показывает средний фенотип популяции мух, перенесенных в другую температуру на указанной стадии развития. (По Postlewait J. H., 1974. *Develop. Biol.*, 36, 212.)

дрозофил собраны при 17°C, а личинки переводятся в температурные условия 29°C на разных стадиях развития, фенотип имаго соответствует показанному на рис. 17.27. На этом рисунке также приведены результаты реципрокного эксперимента — яйца собраны при 29°C и перене-

сены в 17°C. Какова ваша интерпретация этих данных?

17.9. Данные, представленные в таблице, взяты из оригинальной работы Стертеванта, посвященной исследованию гинандроморфов *D. simulans*. В них отражено число случаев, когда клетки следующих

	Hu	W	2t	2s	3t	3s	4t	4s	5t	5s	6
Hu	—	111	176	202	182	216	200	229	227	241	322
W			171	171	178	178	196	197	217	216	304
2t				60	22	78	48	99	77	120	209
2s					64	20	72	47	95	76	210
3t						70	33	89	69	111	232
3s							72	35	95	66	187
4t								79	43	96	220
4s									96	39	180
5t										97	213
5s											165
G											—

Данные из Garcia-Bellido A., Merriam J. (1969). *J. Exp. Zool.*, 170, 61.

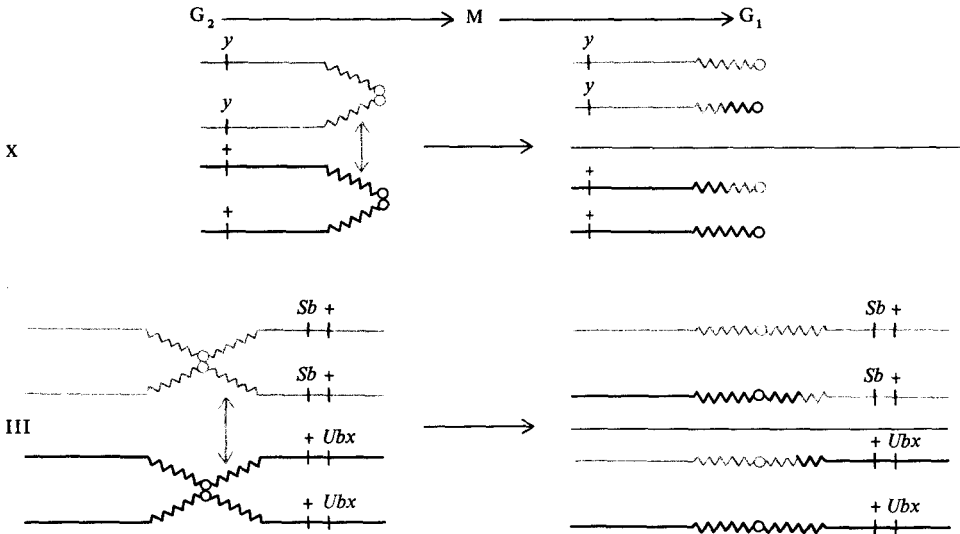


Рис. 17.28. Митотическая рекомбинация клеток генотипа *y/y; Sb Ubx*⁺/*Sb*⁺ *Ubx* выявляется в обоих X-хромосомах и в правом плече третьей хромосомы. При низкой дозе рентгеновского облучения рекомбинация про-

исходит только в нескольких клетках личинки, и вероятность того, что оба события произойдут в одной и той же клетке, очень низка.

органов-хоботка (Hu), крыла (W), абдоминальных тергитов (t), абдоминальных стернитов (s) и гениталий – различались по полу у 758 гинандроморфных половин мух (поскольку мухи билатерально симметричны, анализ одной мухи дает два набора данных относительно частоты, с которой разделительная граница проходит между двумя зачатками). Используя компас и линейку, как можно точнее постройте на основе этих данных карту зачатков. Расстояние приводите в стертах. Не забудьте о том, что, как и в генетических картах хромосом, аддитивность лучше всего проявляется в случае малых расстояний.

17.10. Митотическая рекомбинация может быть индуцирована путем рентгеновского облучения развивающегося организма. Если хромосомы несут соответствующие генетические маркеры, клональные потомки клетки, в которой произошла митотическая рекомбинация, могут быть идентифицированы, как показано на рис. 17.25. Возможные результаты митотической рекомбинации в клетках дрозофилы генотипа *y/y*⁺,

Sb Ubx⁺/*Sb*⁺ *Ubx* приведены на рис. 17.28. X-хромосома гетерозиготна по мутации *yellow*, вызывающей желтый цвет кутикулы и щетинок; третья хромосома гетерозиготна по мутации *Stubble* (*Sb*), вызывающей появление коротких щетинок, и по мутации *Ultrabithorax* (*Ubx*). В гомозиготном состоянии мутация *Ubx* приводит к превращению метаторакса (T3) в мезоторакс (T2) (рис. 17.14), а также и другим трансформациям, вызывающим гибель особи перед ее выходом из куколки. Клоны клеток *Ubx/Ubx* идентифицируют по наличию у имаго нормальных щетинок вместо коротких и по появлению в метатораксе имаго некоторых структур мезоторакса, например клеток крыла и крупных щетинок (в нормальном метатораксе крупные щетинки полностью отсутствуют). Как вы используете эту генетическую систему и рентгеновское облучение, чтобы установить, в какое время в процессе развития происходит действие гена *Ubx*⁺, которое вызывает выбор клетками пути развития метаторакса, а не мезоторакса?

Генетика соматических клеток: картирование генома человека

Традиционные методы генетического анализа, разработанные Менделем, основаны на переходе из диплоидного состояния в гаплоидное в процессе мейоза. Восстановление диплоидности происходит при оплодотворении. Изменения пloidности обеспечивают сегрегацию генов, то есть их распределение в потомстве. Несколько десятилетий назад было показано, что соматические клетки эукариот можно размножать *in vitro*, т. е. поддерживать в виде так называемых клеточных культур (рис. 18.1). У этих культивируемых *in vitro* клеток в норме не происходит смены диплоидной и гаплоидной фаз. Тем не менее существуют различные способы, позволяющие изучать определенные генетические феномены на культурах клеток. Существенным преимуществом клеточных культур является то, что возникновение новой клеточной генерации занимает несколько часов, тогда как появление нового поколения на уровне целой особи — это месяцы или годы. Дополнительное преимущество для изучения генетики человека — это возможность комбинировать наследственные детерминанты клеток в культуре, поскольку проведение направленных скрещиваний между людьми, естественно, невозможно. Недавно были разработаны способы получения гибридных клеток, содержащих наследственную информацию различных видов организма, например человека и мыши. Такие гибриды нельзя получить другими способами, т. е. на уровне целых организмов.

Распределение хромосом при размножении клеток культуры происходит по механизму митоза. Обычно *клеточная линия* является потомком одной клетки (и, таким образом, представляет собой *клон*) или нескольких клеток ткани определенного типа. В лабораторных условиях растительные и животные клетки чаще всего проходят лишь ограничен-

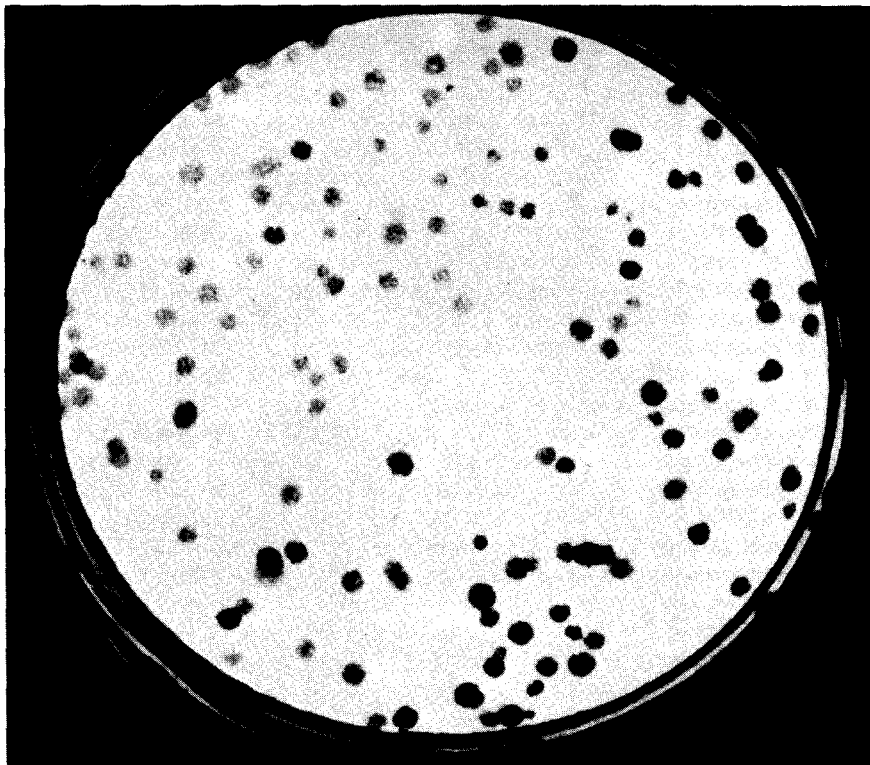


Рис. 18.1. Клоны клеток человека, растущие на поверхности агара в чашке Петри. (Courtesy of Prof. T. T. Puck, University of Colorado Medical School.)

ное число делений, а затем гибнут. Однако в распоряжении исследователей есть и линии, клетки которых способны расти неограниченно долго. Такие линии обычно получают из раковых клеток. Способность к длительному размножению этих клеток в культуре несомненно связана с неограниченной пролиферативной способностью раковых клеток в живом организме.

Клетки прокариот, например *E. coli*, гаплоидны, для соматических клеток эукариот характерна диплоидность. Это ограничивает возможности генетического анализа, так как рецессивные аллели не выявляются в гетерозиготе. Растительные клеточные линии, состоящие из гаплоидных клеток, можно получить при культивировании клеток гаметофитов. Это позволяет отбирать ауксотрофные мутанты и производить другие манипуляции подобно тому, как это делается для гаплоидных микроорганизмов. Клеточные линии животных могут стать «функционально» гаплоидными при утере целых хромосом или их частей. К этому же приводит инактивация генов с помощью транслокаций или других хромосомных перестроек. Например, в линии клеток яичника китайского хомячка один из двух аллельных генов в целом ряде локусов инактивирован в результате хромосомных перестроек. Хромосомный набор длительно поддерживающихся культур клеток отличается от набора нормальных клеток. При культивировании часто

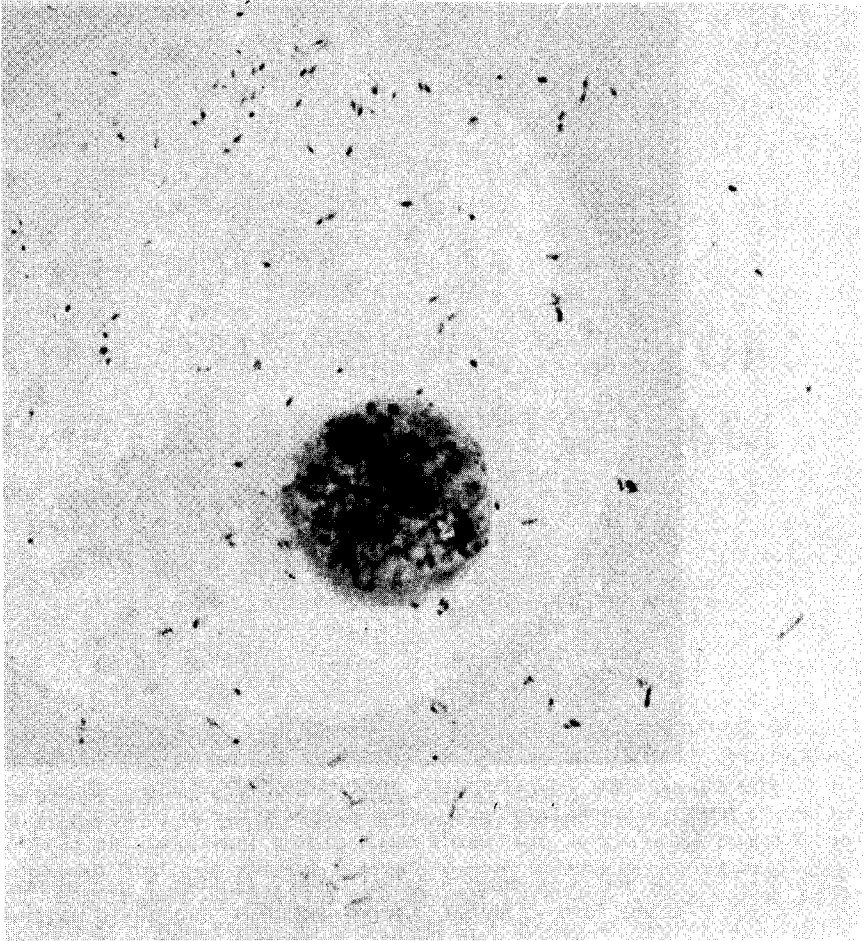


Рис. 18.2. Различия в размерах между клетками человека и бактериями. На микрофотографии показано ядро эукариотической клетки в окружении множества бактерий. Ввиду сильных

различий в размере число человеческих клеток в лабораторной культуре значительно меньше числа клеток в культуре бактерий. (Courtesy of W. R. Breg, Yale University.)

происходят потери хромосом, некоторые сегменты хромосом могут дуплицироваться, дуплицироваться или перемещаться. Возникающие аномалии можно использовать для картирования генов и других генетических исследований.

Наиболее очевидные успехи генетики соматических клеток связаны с картированием генов человека. Этой теме посвящена основная часть данной главы. Некоторые примеры применения генетики соматических клеток к растительным клеткам приведены в последнем разделе главы.

Геном человека

Гаплоидный геном человека содержит $3 \cdot 10^9$ п.н. Повторяющиеся последовательности ДНК составляют около 30%. Количество копий этих последовательностей в геноме человека варьирует от единиц до нескольких тысяч. Остальные 70%, т.е. приблизительно $2 \cdot 10^9$ п.н., представляют собой «уникальные» последовательности, присутствующие в виде одной или единичных копий. Около 90% РНК, транскрибируемой с уникальной ДНК (гяРНК), не покидает ядро клетки. Только 10%, что соответствует в хромосоме $2 \cdot 10^8$ п.н., транспортируется в цитоплазму, где происходит трансляция. Исходя из того, что процессированная мРНК, кодирующая белок, состоит в среднем из 1500 нуклеотидов, можно подсчитать, что человеческий геном содержит информацию для кодирования около 130 000 белков ($2 \cdot 10^8 : 1500 = 130\,000$). Часто структурные гены, кодирующие те или иные полипептиды, содержатся в геноме человека в виде нескольких копий. Нет точного способа определения доли таких генов или степени их повторяемости. Тем не менее есть основания полагать, что число различных полипептидов, кодируемых геномом человека, находится в диапазоне от 30 000 до 100 000.

Для оценки числа структурных генов в геноме человека можно предложить следующий подход. Известна нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК величиной 60 000 п.н., содержащего гены β -глобинового семейства (рис. 18.3). Этот фрагмент ДНК входит в состав одиннадцатой хромосомы и содержит пять функциональных структурных генов: β , δ , $A\gamma$, $G\gamma$ и ϵ , которые кодируют четыре различных полипептида (два гена γ кодируют идентичные белки). Таким образом, на каждый белок приходится по 15 000 ($60\,000 : 4$) пар нуклеотидов. Сходные данные получены при изучении генов α -глобинового семейства. Фрагмент ДНК величиной 30 000 п.н., расположенный в шестнадцатой хромосоме, содер-

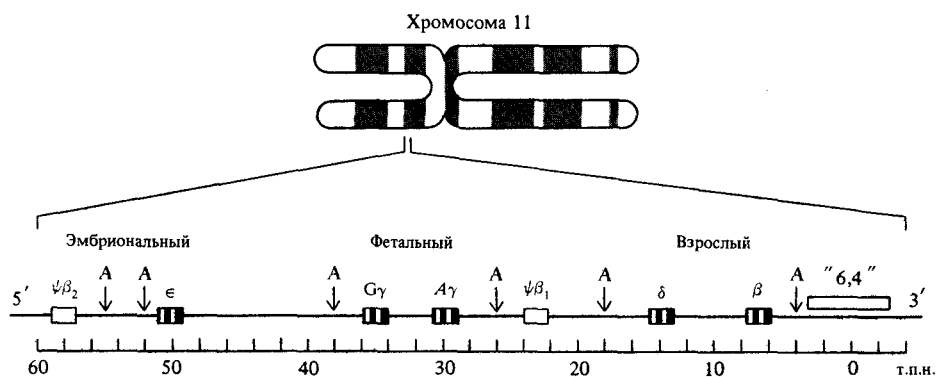


Рис. 18.3. Семейство β -глобиновых генов человека расположено в хромосоме 11. Величина представленного фрагмента хромосомы около 60 т.п.н. Он содержит пять функционально активных генов (ϵ , γ , $A\gamma$, δ и β) и два псевдогена ($\psi\beta 2$ и $\psi\beta 1$). Обозначение «6,4» на рисунке указывает положение повто-

ряющейся последовательности 6,4 т.п.н., число копий которой составляет 3000 на геном. Буквой А помечены положения *Alu*-повторов – последовательностей, повторенных в геноме человека около 300 000 раз. (По Dover G. A., Flavell R. B., eds., 1982. *Genome Evolution* Academic Press, London, p. 337.)

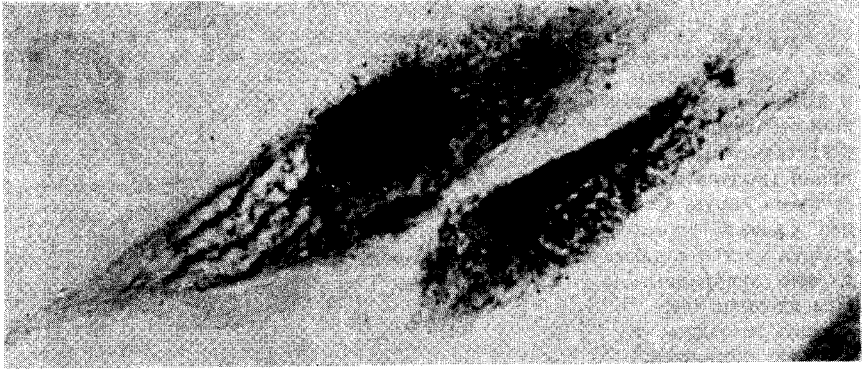
жит три функциональных гена: $\alpha 1$, $\alpha 2$ и ζ , которые кодируют два белка, α и ζ . И в этом случае получается то же соотношение — 15 000 п.н. на индивидуальный белок. Если принять эту цифру за среднее количество ДНК человеческого генома, приходящееся на один белок, то можно заключить, что гаплоидный геном кодирует $2 \cdot 10^9 : 1,5 \cdot 10^4 = 130\,000$ индивидуальных полипептидов. Число различных структурных генов может быть несколько меньше в том случае, если средний уровень повторяемости по геному в целом окажется выше, чем у генов глобинового семейства.

Картирование десятков тысяч генов представляет собой чрезвычайно трудную задачу, хотя ее и облегчает то, что некоторые гены собраны в группы, так называемые кластеры. Кластеризованное расположение имеют гены глобинов, белков главного комплекса гистосовместимости, иммуноглобулинов. Трудности изучения генетики человека обусловлены тем, что анализируемое потомство малочисленно, поколения сменяются медленно, а подбор пар, естественно, не поддается планированию. Задача картирования человеческого генома оказалась существенно облегченной благодаря освоению методов работы с соматическими клетками.

Ген, ответственный за цветовую слепоту (дальтонизм), был локализован в X-хромосоме в 1911 году. Особенности наследования генов, сцепленных с X-хромосомой, позволили отнести к этой группе сцепления более чем 100 локусов. Хромосомная локализация аутосомных генов была впервые проведена в 1968 году. Определено расположение локуса, кодирующего антигены групп крови Даффи, которые, подобно антигенам группы АВО и другим антигенам крови, находятся на поверхности эритроцитов. Сравнение наследования изучаемого гена с распределением аберрантной хромосомы 1 показало, что он локализован в этой хромосоме. С тех пор на основании анализа родословных определены группы сцепления для 70 генов человека. Картирование многих из этих генов стало возможным после того, как было показано их сцепление с другими генами, локализацию которых удалось установить методами генетики соматических клеток. Примером этого служит картирование гена резус-фактора, впервые открытого в 1939 году. В 1971 г. изучение родословных показало, что ген *Rh* сегрегирует сцепленно с геном *PEPC*, кодирующим пептидазу С. Годом позже при изучении соматических клеток ген *PEPC* был локализован в хромосоме 1. Таким образом, стала известной группа сцепления и для гена *Rh*, кодирующего резус-фактор. В настоящее время картировано около 500 аутосомных генов, причем 100 из них картировано за последние 12 месяцев. Подавляющее большинство этих генов локализовано методами генетики соматических клеток.

Гибридизация клеток в культуре

В 1960 г. было показано, что при совместном культивировании клеток двух различных линий они могут сливаться, образуя гибриды, содержащие геномы обеих родительских форм. Первые гибридные клетки были получены при слиянии культивируемых клеток разных линий мышей. Кроме внутривидовых получены и межвидовые гибриды, например,



А



Б

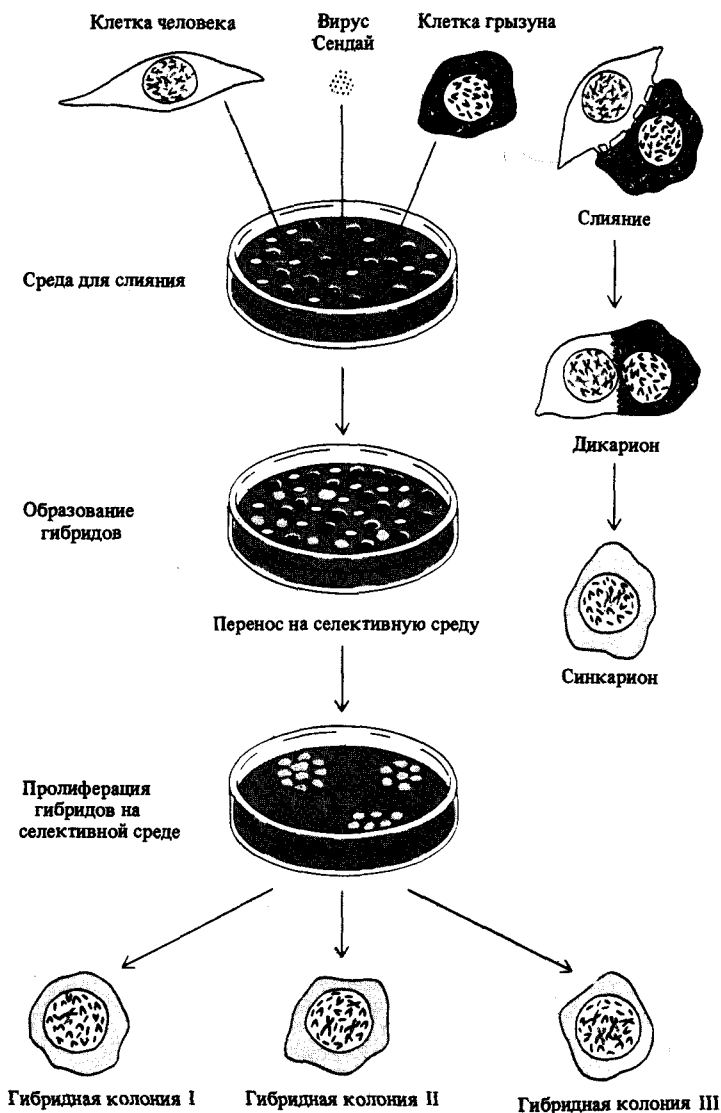
Рис. 18.4. Дикарион, образовавшийся при слиянии двух клеток. Родительские клетки относятся к двум линиям фибробластов: TSD и SJD. Первые взяты от больного амавротической идиотией (синдром Тэя—Сакса). Ядро такой клетки окрашено черным, что отражает включение радиоактивного ^3H -тимидина. Фибро-

бласты линии SJD взяты у больного с синдромом Сэндхофа—Яцкевича. Неслившиеся клетки двух родительских линий показаны сверху, дикарион, образовавшийся после обработки вирусом Сендай, — внизу. (По Ratazzy M. C. et al., 1976. Am. J. Hum. Genet., 28, 143–154.)

между клетками человека и мыши, мыши и хомячка и даже мыши и цыпленка.

Образование гибридных клеток происходит гораздо чаще, если в культуру добавлены некоторые вещества, например полиэтиленгликоль или инактивированные вирусы. Для этой цели часто используют вирус Сендай. У вирусов обычно имеются один и более специфических участков, благодаря которым они могут связываться с рецепторами клетки-хозяина. На поверхности вируса Сендай таких участков несколько. Таким образом, одна вирусная частица способна образовать мостик, соединившись сразу с двумя клетками. Вследствие очень малого размера вирусной частицы клетки окажутся чрезвычайно тесно сближены. При этом может произойти слияние плазматических мембран клеток и образоваться дикарион — клетка с двумя ядрами (рис. 18.4). Затем ядра

Рис. 18.5. Получение гибридной клеточной линии человек—грызун. Человеческие клетки, в данном случае лейкоциты, смешиваются с клетками выбранной линии грызуна в присутствии вируса Сендай. Сначала формируются клетки с двумя ядрами, дикарионы. При слиянии ядер образуются одноядерные гибридные клетки, синкарионы. Если клетки переносятся на селективную среду, то вырастают только гибридные линии. Например, если реципиентная линия клеток грызуна несет ауксотрофность по глицину, используют селективную среду, не содержащую этой аминокислоты. Неслившиеся лейкоциты человека также неспособны пролиферировать в культуре клеток. Каждая выросшая колония клеток содержит полный геном реципиентной клеточной линии грызуна и несколько донорских хромосом человека.



также могут слиться с образованием *синкариона*, содержащего хромосомы обоих родителей. По непонятным причинам в течение нескольких первых делений гибридной клетки происходит быстрая потеря хромосом одного из объединяемых видов. У клеточных гибридов мышь—хомячок происходит утрата хромосом мыши. У гибридов клеток мыши и человека утрачиваются хромосомы человека. Обычно через 30 поколений гибридная клеточная линия мышь—человек содержит полный хромосомный набор мыши и только семь человеческих хромосом. Эта цифра является средней, некоторые клетки содержат только одну-две пары человеческих хромосом, тогда как другие—до 20 (рис. 18.5). Одна клеточная линия, хромосомы которой утрачиваются после слияния, называется *донорной*, а другая—*реципиентной*.

Таблица 18.1. Схема, иллюстрирующая процесс соотнесения генов и хромосом человека; «+» и «-» отражают присутствие или отсутствие исследуемого фермента (верхние три ряда) или хромосомы (нижние четыре ряда)

	Гибридные линии клеток					
	I	II	III	IV	V	VI
Экспрессирующиеся гены						
LDHA	+	+	-	+	+	-
GALK	-	+	+	+	-	-
TK	-	+	+	+	-	-
Присутствующие хромосомы						
11	+	+	-	+	+	-
15	+	-	+	-	+	-
16	+	+	-	-	-	+
17	-	+	+	+	-	-

Вариабельность потери хромосом человека у клеточных гибридов мышь—человек облегчает картирование человеческих генов. Для картирования генов мыши используют клеточные гибриды мышь—хомячок. Если присутствие продукта изучаемого гена коррелирует с наличием какой-либо одной хромосомы в гибриде, то этот ген, скорее всего, локализован в этой хромосоме. Должны соблюдаться два условия. Во-первых, исследуемый признак, кодируемый хромосомами человека, должен четко (на клеточном уровне) отличаться от аналогичного признака мыши. Например, исследуемая линия клеток человека содержит мутантную лактатдегидрогеназу А (LDH-A). Этот фермент отличается от белка, кодируемого соответствующим мышинным геном. Эти две формы легко разделяются при гель-электрофорезе. Второе условие, необходимое для картирования, — возможность идентификации данной человеческой хромосомы, присутствующей в исследуемой клеточной линии.

Способ отнесения изучаемого локуса к определенной хромосоме проиллюстрирован данными табл. 18.1. Лактатдегидрогеназа человеческого типа присутствовала в клетках гибридных линий I, II, IV и V. Во всех этих линиях была только одна общая человеческая хромосома, хромосома II. Таким образом, очевидно, что локус дегидрогеназы расположен на этой хромосоме.

Сцепление генов в соматических клетках предложено называть *синтенией*, от греческого «син» — совместно, «тени» — поддерживать. Этот термин введен для того, чтобы отличать данные о хромосомной локализации, полученные в опытах с соматическими клетками, от результатов по сцеплению генов, полученных при анализе родословных. Если два гена присутствуют или оба отсутствуют в гибридных клеточных линиях, то они называются синтеничными. Из результатов, приведенных в табл. 18.1, следует, что гены TK и GALK синтеничны. Оба этих гена локализованы в семнадцатой хромосоме.

Отбор клеточных гибридов с помощью метода НАТ

Потеря хромосом у гибридов между клетками мыши и человека — это случайный процесс. То, какая хромосома сохранится и стабилизируется в гибридной линии, — дело случая. Однако из всей популяции гибридных клеток можно отобрать стабильные линии, содержащие желаемые гены и хромосомы, используя селекционные методы. Эти процедуры аналогичны тем, которые используются для отбора определенных классов рекомбинантов, образующихся при скрещиваниях бактерий или дрожжей.

Отсутствие у родительской линии мышиных клеток какой-либо существенной функции, например способности синтезировать необходимый метаболит, может быть супрессировано при внесении элементов генома человека. Из такой гибридной линии могут постепенно утрачиваться все человеческие хромосомы, кроме той, которая содержит ген, отвечающий за незаменимую функцию. Таким образом, можно отобрать гибридные клоны, содержащие конкретные человеческие хромосомы. Такой предварительный отбор облегчает картирование генов, расположенных в этой хромосоме.

Один очень широко используемый метод отбора гибридных клеток называется НАТ-селекцией. Это название — аббревиатура английских на-

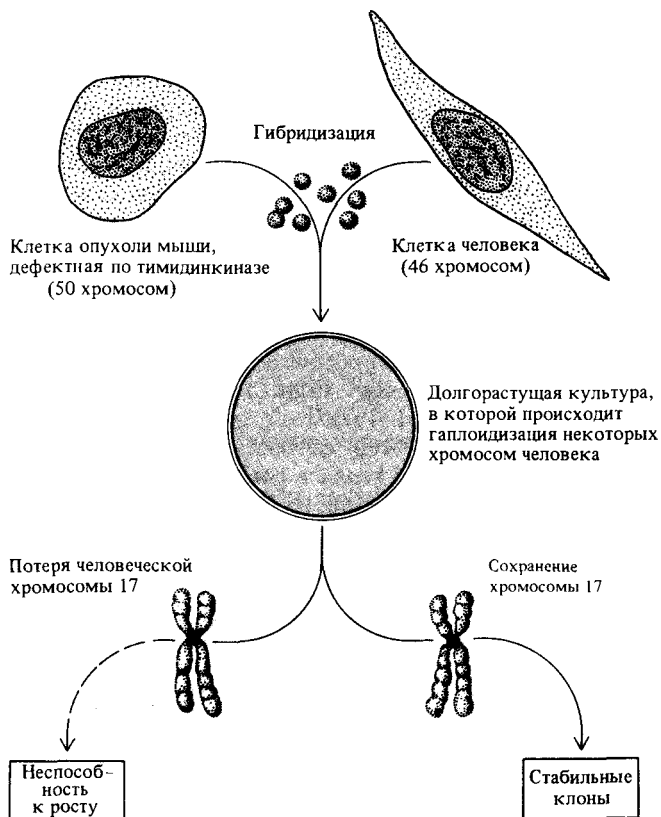


Рис. 18.6. Отбор стабильных гибридных клеточных клонов по методу НАТ. В том случае, если родительская линия клеток мыши лишена тимидинкиназной активности, на селективной среде НАТ будут образовывать колонии только гибридные клетки, содержащие хромосому человека 17. В этой хромосоме расположен ген *TK* человека.

званий веществ: гипоксантина, аминоптерина и тимидина, присутствующих в селективной среде. Аминоптерин блокирует синтез пуринов и пиримидинов. Для того чтобы синтезировать ДНК, клетки должны реутилизировать пурины и пиримидины, образующиеся при деградации полинуклеотидов. В обмене нуклеотидов принимает участие большое количество ферментов. Один из этих ферментов — тимидинкиназа (ТК), осуществляющая превращение тимидина в тимидинмонофосфат. Если в используемой мутантной линии клеток мышцы отсутствует этот фермент, то на селективной среде НАТ, в которой отсутствует тимидинмонофосфат, могут расти клетки, получившие хотя бы одну из гомологичных хромосом человека, содержащих ген *ТК*. Цитологические исследования показали, что все отбираемые клеточные линии содержат хромосому человека 17 (рис. 18.6). С помощью таких клеточных линий могут быть картированы и другие гены человека (помимо гена *ТК*), локализованные на семнадцатой хромосоме. Задача сводится к идентификации продуктов генов человека, которые нарабатываются в отобранных гибридных линиях.

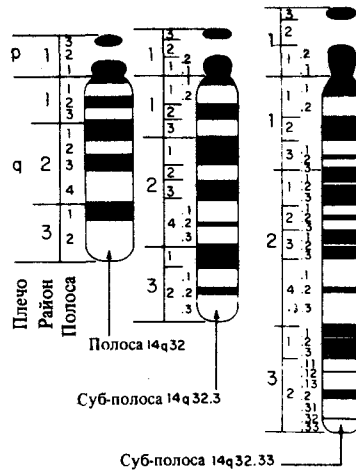
Селективная среда НАТ может быть использована для отбора клонов, содержащих и другие хромосомы. Например, фермент фосфорибозил-гипоксантин—трансфераза (*HPRT*) участвует в синтезе пуринов. Если линия клеток мышцы утрачивает способность синтезировать *HPRT*, то этот дефект может быть возмещен присутствием соответствующего гена человека. Показано, что все гибридные клоны, отобранные по этому признаку, содержат человеческую *X*-хромосому, в составе которой находится ген *HPRT*. Разработаны другие селективные схемы, позволяющие проводить картирование генов, локализованных и на других хромосомах, кроме *X* и 17.

Дополнение 18.1. Дифференциальное окрашивание хромосом человека

Поздние профазные и метафазные хромосомы человека после инкубирования в лимонной кислоте и окрашивания красителем Гимза покрываются темными и светлыми поперечными полосами разной ширины (*G*-полосы). Характер распределения этих полос различен для большинства хромосом и является строго воспроизводимым. После инкубации с акрихинипритом при освещении ультрафиолетом выявляются флуоресцирующие *Q*-полосы. Распределение выявляемых полос при обоих типах окраски совпадает. Это свидетельствует о том, что такое окрашивание визуализирует какие-то реально существующие структуры хромосом. На парижской конференции 1971 г. была разработана номенклатура для

обозначения *G*-полос. Для обозначения короткого и длинного плеч хромосомы используют буквы *p* и *q*. Каждое хромосомное плечо разделяется на районы, нумеруемые по порядку от центромеры к теломерной области. В некоторых плечах выделяют один такой район, тогда как в других — 2–4 района. Полосы внутри районов также нумеруются по порядку от центромеры. Запись 1р36 означает, что рассматривается шестая полоса района 3 короткого плеча первой хромосомы, наиболее заметная полоса в этой хромосоме. На рисунке 18.20 изображены полосы на хромосомах человека и соответствующая нумерация. Полосы могут иногда быть разделенными на суб-полосы, видимые в поздней профазе. Эти

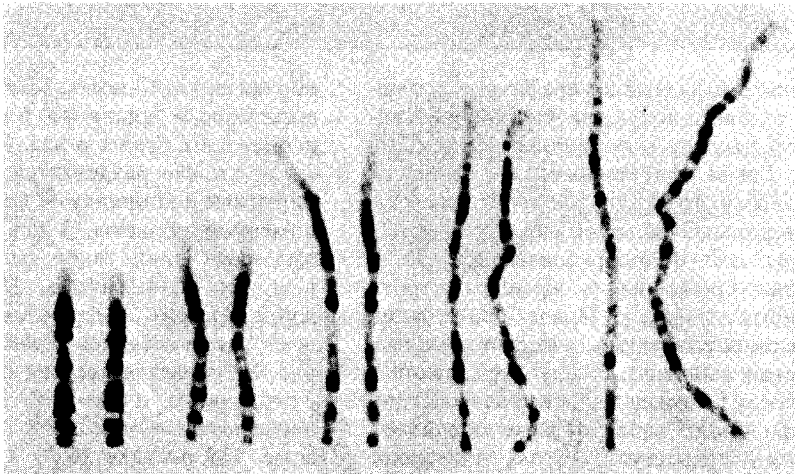
Схема хромосомы 14 на стадиях 400 (слева), 550 (в центре) и 850 (справа) полос, иллюстрирующая использование парижской номенклатуры для обозначения плеч хромосом, районов, полос и суб-полос. (По Yunis I.I., 1981. Chromosomes and cancer: new nomenclature and future directions, Hum. Path. 12, 494–503.)



суб-полосы сливаются в единые полосы на метафазных хромосомах. Для обозначения этих суб-полос в номенклатурный индекс вводится точка. Нумерация суб-полос также идет от центромеры к теломере, например 1p36.1 и 1.36.2.

В том случае, если локализация гена внутри хромосомы известна, для ее обозначения используют индекс полосы. Например, локализация гена *ESD*, кодирующего эстеразу D, обозначается 13p14 – четвертая полоса первого района короткого плеча тринадцатой хромосомы. Локали-

зация генов не всегда известна с точностью до полосы. Так, «адрес» гена *Rb1* (ретинобластома-1) – 13q, что означает расположение в длинном плече тринадцатой хромосомы. Стрелка, объединяющая два участка хромосомы, используется в тех случаях, когда ген нельзя локализовать более точно. Так, расположение гена *MANA*, кодирующего α -маннозидазу-A, обозначается 15q11 → qter. Это означает, что ген находится в длинном плече пятнадцатой хромосомы между полосой 11 и терминальным районом.



Слева направо, дифференциальная сегментация G-типа пары хромосом 1 на стадиях 400, 550, 850, 1000 и 1200 полос. (Courtesy Jorge I. Yunis of Minnesota.)

Внутрихромосомное картирование генов с помощью хромосомных перестроек

Идентификация индивидуальной хромосомы, в которой находится исследуемый ген,—это только первый этап картирования. Основной задачей являются установление порядка генов и их точная локализация. В некоторых случаях метод анализа родословных позволяет расположить на генетической карте хромосомы три и более маркеров. Использование более эффективных методов генетики соматических клеток может дать более точную информацию. Существенную помощь в таких исследованиях оказывают хромосомные перестройки (см. гл. 21). Далее мы рассмотрим примеры использования делеций, транслокаций или дупликаций для картирования генов.

Ген, кодирующий кислотную фосфатазу 1 (ACP1) эритроцитов, расположен на второй хромосоме. При цитологическом изучении кариотипов двух детей (из двух разных семей), которые обладали множественными врожденными аномалиями, удалось показать наличие делеции терминальной области короткого плеча второй хромосомы. У одного из детей делеция хромосомы начиналась с терминального района полосы 2p23 (рис. 18.7). Культура клеток, полученных от этого ребенка, обладала ACP1-активностью. Эти клетки несли аллель *A* в одной из гомологичных хромосом и аллель *B* в другой. У второго ребенка делеция захватывала и проксимальный район полосы 2p33. Клетки, содержащие такую хромосому, были лишены активности этого фермента. Таким образом, можно заключить, что ген *ACP1* локализован в полосе 2p23 (рис. 18.8).

У культивируемых клеток часто обнаруживаются хромосомные перестройки, отсутствующие у индивидуумов, которые служили донорами исходных клеток. В других случаях перестройки, например трансло-

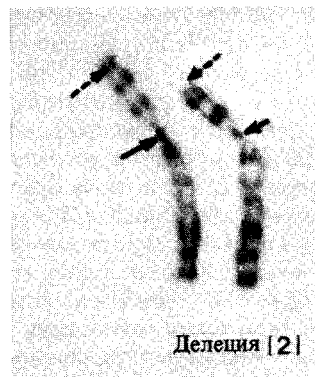


Рис. 18.7. Вторая хромосома ребенка, несущая делецию терминального фрагмента короткого плеча. Сплошная стрелка указывает положение центромеры. Пунктирная стрелка—место разрыва в полосе 2p23. В эритроцитах этого ребенка присутствует фосфатаза 1 (По *Emmanuel B.S. et al.*, 1979. *Am. J. Med. Genet.*, 4, 167–172.)

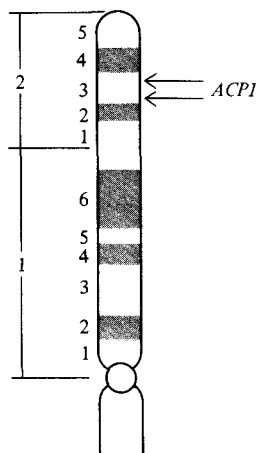


Рис. 18.8. Расположение гена *ACPI* в полосе 2p23. Верхняя стрелка указывает место разрыва при делеции, в результате которой сохраняется активность фосфатазы I (см. рис. 18.7). Нижняя стрелка указывает место разрыва, при котором большой утрачивает эту активность. Лocus *ACPI* расположен между этими двумя точками разрывов.

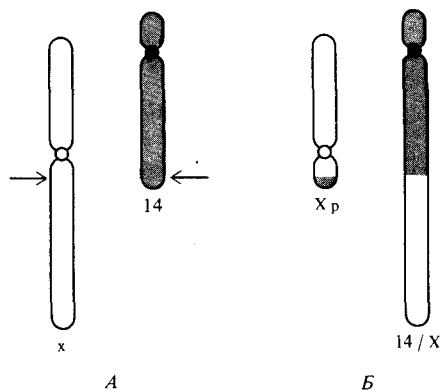


Рис. 18.9. Транслокация между хромосомами человека X и 14. А. Две нормальные хромосомы. Б. Транслоцированные хромосомы. (По Rudde F. H., Creagan R. P., 1975. Annu. Rev. Genet., 9, 407–486.)

кации, уже присутствуют в мутантных организмах. На рис. 18.9 изображена транслокация, произошедшая между хромосомой 14 и X-хромосомой. Эта транслокация была исследована цитологическими методами. В гибридной линии клеток произошла утрата всех человеческих хромосом. Сохранилась только хромосома 14, несущая транслоцированное длинное плечо X-хромосомы. У этих клеток обнаруживается экспрессия трех генов, локализованных в X-хромосоме. Это *HPRT*, кодирующий фосфорибозил-гипоксантин—трансферазу, *PGK*, кодирующий фосфоглицераткиназу, и *G6PD*, кодирующий глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназу. Таким образом, если транслоцированный сегмент хромосомы начинается с полосы Xq12, то можно считать, что все три гена располагаются между этой полосой и терминальной областью. В этой же клеточной линии показана экспрессия аутосомного гена, кодирующего нуклеозидфосфотрансферазу (*NP*) и локализованного, таким образом, в составе четырнадцатой хромосомы. Обнаружение двух дополнительных транслокаций, в которые были вовлечены более короткие фрагменты X-хромосомы, позволило определить порядок изучаемых генов. Этот порядок — *HPRT*—*PGK*—*G6PD*— в направлении к терминальной области Xq.

Изменение уровня накопления фермента может помочь картировать соответствующий дублированный ген. Ген *GOT1*, кодирующий растворимую глутамат-оксалацетат—трансаминазу, расположен в хромосоме 10. Как показано на рис. 18.10, были идентифицированы две клеточные линии, у которых фрагмент хромосомы 10 был транслоцирован на хромосому 17 или 21. Кроме того, у исследуемых клеток была сохранена и исходная хромосома 10. Линия с транслокацией 10/21 характеризуется уровнем активности *GOT*, сравнимым с таковым в контрольной

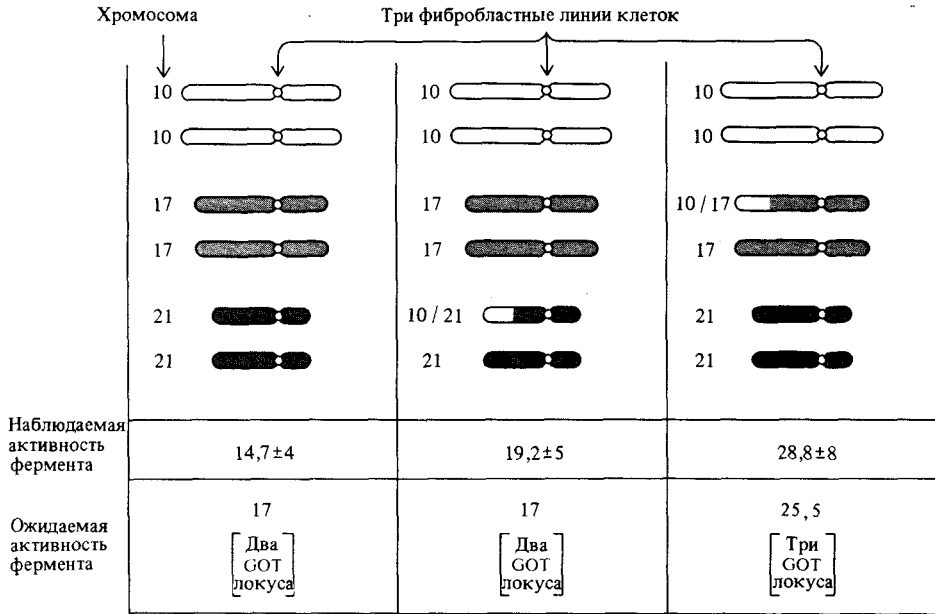
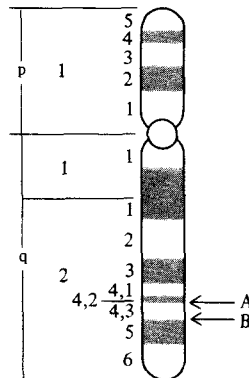


Рис. 18.10. Хромосомный состав трех клеточных линий. Ожидаемая ферментативная активность в линиях, изображенных в левом и среднем столбцах совпала со средними экспериментальными значениями. У линии,

изображенной в правом столбце, уровень активности превышал значения, полученные для других линий на 50%. На этом основании можно предположить, что данная клеточная линия содержит три гена *GOT*.

линии, которая имеет две нормальные хромосомы и не имеет дублированных сегментов. Линия с транслокацией 10/17 характеризуется уровнем активности *GOT*, примерно на 50% бóльшим, чем у других линий. Вот почему предполагают, что линия с транслокацией 10/17 содержит три копии гена *GOT*. Этот ген должен быть локализован на сегменте хромосомы 10, присутствующем в транслокации 10/17, но не 10/21 (рис. 18.11).

Рис. 18.11. Расположение гена *GOT* в полосе 10q24.3 десятой хромосомы. Места разрыва при транслокациях показаны стрелками. Верхняя стрелка указывает место транслокации 10/17, а нижняя — 10/21 (см. рис. 18.10). Локус *GOT* расположен между этими двумя точками разрыва.



Микроклетки и изолированные хромосомы

Селекция по типу НАТ и другие способы позволяют получать стабильные клеточные линии, несущие индивидуальные человеческие хромосомы. Существуют более прямые методы, позволяющие получать гибридные клеточные линии, содержащие определенные компоненты генома человека. Это гибридизация клеток мыши с микроклетками человека, несущими неполный геном, и эндоцитоз мышинными клетками изолированных хромосом человека.

Микроклетки представляют собой хромосомы, окруженные участками ядерной и плазматической мембран. При росте клеток в присутствии коллемеда через несколько дней ядро распадается на несколько микронуклеусов, каждый из которых содержит только одну или несколько хромосом (рис. 18.12). Эти клетки обрабатывают цитохалазином и центрифугируют. Таким образом, отделяется фракция микроклеток, которые представляют собой микронуклеусы, окруженные тонким слоем цитоплазмы, заключенной между ядерной и плазматической мембранами. Цитологические методы позволяют определить, какие именно хромосомы содержат полученные микроклетки. Плазматическая мембрана сохраняет рецепторы для вируса Сендай, что позволяет проводить гибридизацию клеток мыши с полученными микроклетками, используя этот вирус. Образующиеся в результате гибридизации линии клеток несут определенные человеческие хромосомы. Гены человека, экспрессирующиеся в полученных гибридных линиях, могут быть, таким образом, отнесены к определенным хромосомам.

Препарат хромосом человека, не содержащий примеси клеток, может быть получен при соответствующей обработке, вскрывающей плазматическую и ядерную мембраны клетки. В семидесятых годах были разработаны методы фракционирования и проточной микрофлуориметрии, позволяющие осуществлять сортировку хромосом на фракции, содержащие индивидуальные хромосомы человека высокой чистоты (рис. 18.13). Когда свободные хромосомы добавляют к культивируемым клеткам мыши, то эти клетки могут захватывать целые хромосомы в процессе эндоцитоза. Внутри реципиентной клетки захваченные хромосомы обычно деградируют, распавшись на фрагменты. Если такие фрагменты содержат центромерные области, то они могут поддерживаться как единое целое. Фрагменты, лишенные центромеры, могут транслоцироваться на мышинные хромосомы. В том и другом случае определенные человеческие гены будут экспрессироваться в гибридных клетках (рис. 18.14). Встраивание фрагментов в хромосому мыши происходит с очень низкими частотами, от 10^{-4} до 10^{-7} на клетку. Встраиваемые фрагменты могут быть как очень мелкими, не видимыми в световой микроскоп, так и достаточно крупными, включая плечи хромосом и даже целые хромосомы. Такой перенос генетического материала от донора, сопровождающийся встраиванием в хромосому реципиента, называется *трансформацией* (как у бактерий) или *трансфекцией*.

Картирование генов в определенных областях хромосом может быть произведено в том случае, если экспрессию изучаемого гена можно тестировать в трансформированной клетке, а встроенный фрагмент хромосомы идентифицируется цитологически. При анализе трансфициро-

Рис. 18.12. А. Клетки фибробластов человека, содержащие микронуклеусы. Б. Смесь клеток, микроклеток (яркие) и фрагментов цитоплазмы. В. Нуклеусы, включающие одну или несколько хромосом, окруженные тонким слоем цитоплазмы и плазматической мембраной. При фильтрации смеси, показанной на фото Б, через трехмикронный фильтр самые мелкие микроклетки вместе с небольшими фрагментами (В) цитоплазмы удается отделить от более крупных микроклеток и целых клеток. (По McNeil C. A., Brown R. L., 1980, PNAS, USA, 77, 5394–5398.)

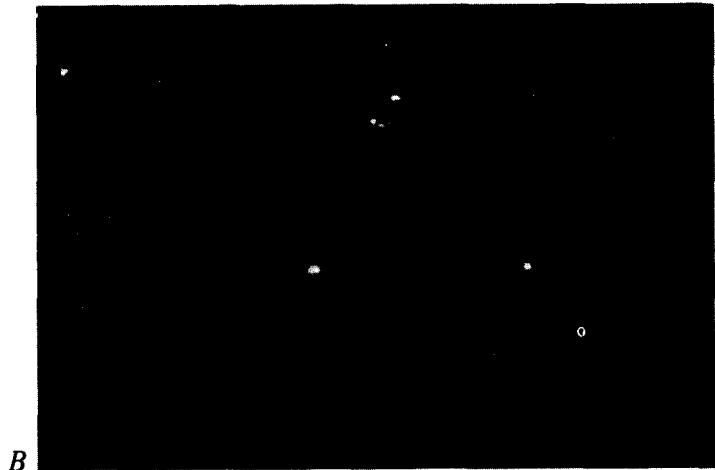
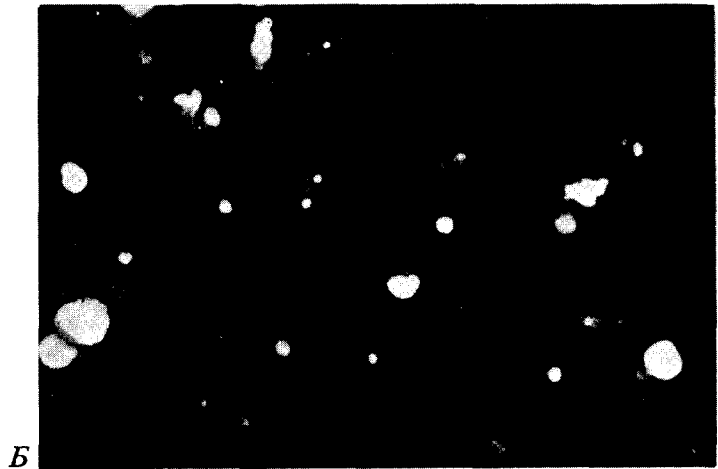


Рис. 18.13. Распределение флуоресценции нормальных хромосом человека, полученное с помощью прибора, позволяющего разделить хромосомы на основе различий в уровне флуоресценции. Числа над пиками обозначают номера хромосом человека. Удаётся получить фракции, содержащие одну-две индивидуальные хромосомы. (По Zebo R. V. et al., 1979. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 76, 5804-5808.)

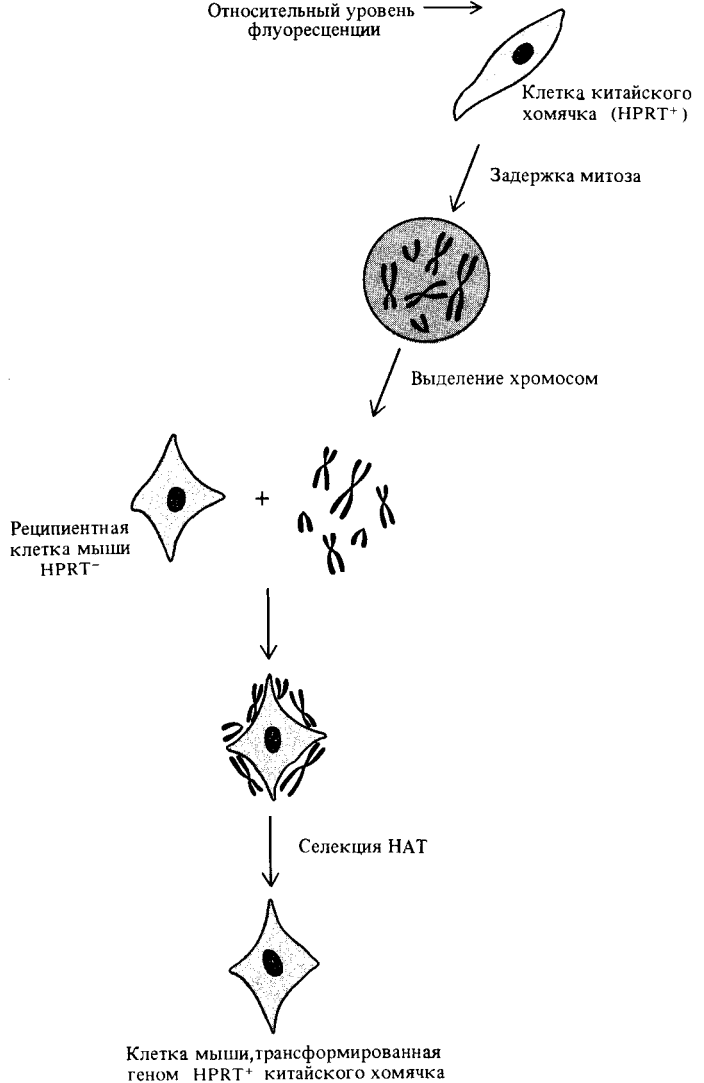
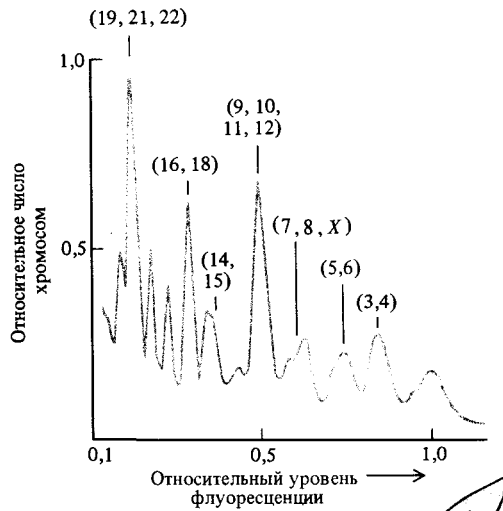


Рис. 18.14. Впервые перенос генов с помощью целых хромосом был использован для встраивания генетического материала китайского хомячка в клетки мыши. На рисунке клетки мыши содержат дефект в гене *HPRT*. Трансформированные клетки мыши, выросшие на среде НАТ, должны содержать ген *HPRT* хомячка. (По Klobutcher Z. A., Rudd F. H., 1981. Annu. Rev. Biochem., 50, 533-554.)

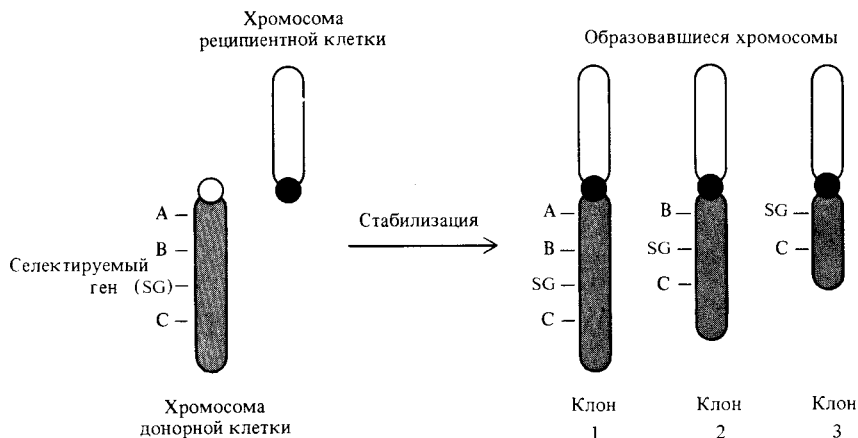


Рис. 18.15. Для картирования генов после трансфекции необходима цитологическая идентификация перенесенного фрагмента хромосомы в клетках, отобранных по активности исследуемых генов. В различных клеточных линиях могут находиться фрагменты разной длины.

ванных фрагментов данной хромосомы, различающихся по величине, можно определить синтению и порядок генов. Естественно, это возможно тогда, когда гены, отсутствующие в малых фрагментах, выявляются при встраивании фрагментов большего размера (рис. 18.15).

Кроме такого прямого подхода, порядок генов и их относительное сцепление можно изучать по частотам *котрансформации* этих генов. Такие эксперименты сводятся к измерению частот совместного встраивания в геном одной клетки двух разных генов. Гены, кодирующие галактокиназу (*GALK*), растворимую тимидинкиназу (*TK1*), и проколлаген 1 (*COLM*), расположены в длинном плече хромосомы 17 (рис. 18.16). При исследовании линий, трансформированных по маркеру *TK1*, определено, что частота котрансформации для *GALK* равна 19% (5 из 27 трансформантов). Для *COLM* частота котрансформации с *TK1* равна 74% (20 из 27). Отсюда следует, что ген *TK1* расположен на хромосоме 17 ближе к гену *COLM*, чем к *GALK*. Расстояния между генами могут быть рассчитаны в единицах переноса генов, опосредованного хромосо-



Рис. 18.16. Карта сегмента хромосомы 17 человека, построенная по результатам переноса генов в составе транслоцированных фрагментов хромосомы. (По *Klobutcher Z. A., Ruddle E. H.*, 1981. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 533–534.) Дополнительные данные указывают на то, что локус *COLM* находится вне фрагмента *GALK—TK1*.

мами (ПГОХ). Расстояние в одну единицу соответствует частоте ко-трансформации в 99%. Тогда в этих единицах расстояние между генами *TK1* и *COLM* равно $100 - 74 = 26$, а между *TK1* и *GALK* — $100 - 19 = 81$. Сами по себе эти цифры ничего не говорят о взаимном расположении исследуемых генов, но данные о том, что *TK1* иногда ко-трансформируется с *GALK*, не захватывая *COLM*, указывают на то, что порядок этих генов следующий: *GALK-TK1-COLM*.

Картирование генов с помощью ДНК-зондов

Методы картирования генов, обсуждавшиеся в предыдущих разделах, были основаны на экспрессии изучаемых генов в культурах клеток. Гены, кодирующие ферменты клеточного метаболизма, (табл. 18.2) и гены, кодирующие поверхностные антигены, такие, как белки главного комплекса гистосовместимости или антигены группы крови, удовлетворяют этому условию. Гены, не обладающие подобным фенотипическим проявлением, не могут быть картированы лишь с использованием описанных методов. Это ограничение удается преодолеть с помощью методов геной инженерии. При этом становится возможным картирование любых последовательностей ДНК, для которых можно получить соответствующий ДНК-зонд. Эти методы внесли поистине революционный переворот в генетический анализ гибридов соматических клеток.

Первое применение методов работы с рекомбинантными ДНК для картирования генов человека включало ДНК-гибридизацию в растворе. Таким образом, удалось картировать гены α - и β -глобинов. Зонды, представляющие собой комплементарные ДНК (кДНК) этих генов, были получены с помощью обратной транскрипции очищенных α - и β -глобиновых мРНК. Эти зонды в определенных условиях не взаимодействуют друг с другом или с глобиновыми генами мыши, но образуют стабильные дуплексы при отжиге с соответствующими последовательностями ДНК человека. Глобиновые кДНК-зонды использовали для тестирования в растворе препаратов ДНК, выделенных из различных гибридных клонов. Образование стабильного дуплекса между кДНК-зондом и ДНК исследуемого препарата свидетельствовало о присутствии человеческих глобиновых генов в геноме соответствующей гибридной линии. Кариологический анализ выявленных таким образом гибридных клонов позволил заключить, что гены β -глобинового семейства расположены в хромосоме 11, а α -глобиновые гены — в хромосоме 16.

Для проведения гибридационного анализа в растворе требуется большое количество ДНК. Дополнительные затруднения связаны также с возможностью перекрестной гибридации между гомологичными генами человека и мыши. Многие из этих трудностей могут быть преодолены с помощью блот-гибридизации по Саузерну. На первом этапе соответствующий ДНК-зонд метят радиоактивными изотопами (такими, как ^{32}P или ^3H) с помощью ник-трансляции. Затем из гибридных линий клеток, несущих определенные хромосомы человека, выделяют препараты тотальной ДНК. Как показано на рис. 18.17, эти препараты ДНК

Таблица 18.2. Ферментные маркеры, используемые для определения групп сцепления генов человека при работах с культурами клеток

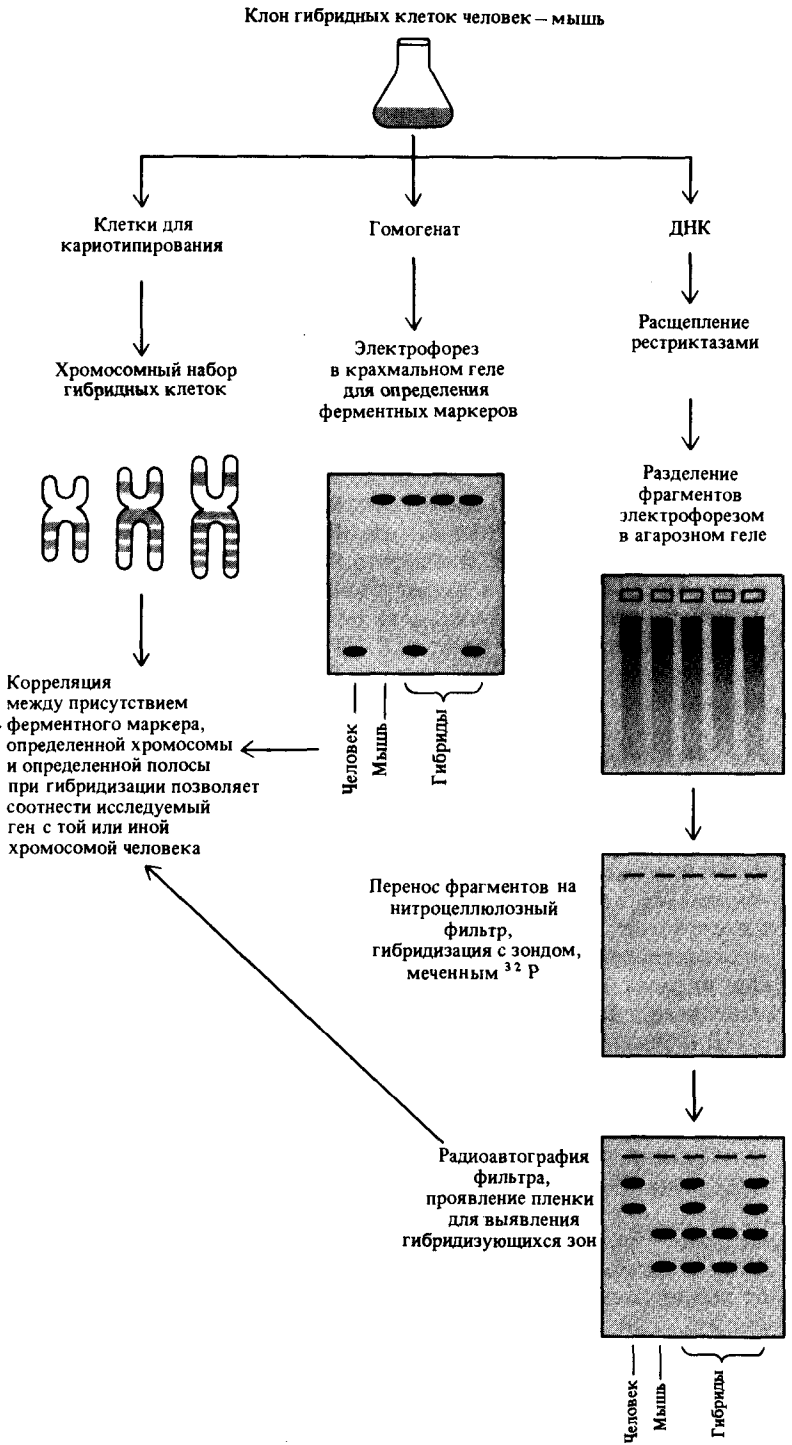
Хромосома	Плечо	Фермент (символ гена)
1	p	Енолаза 1 (<i>ENO1</i>)
	p	Фосфоглюкомутаза-1 (<i>PGM1</i>)
	q	Пептидаза-С (<i>PEPC</i>)
	q	Фумаратгидратаза (<i>FH</i>)
2	p	Малатдегидрогеназа-1 (<i>MDH1</i>)
	q	Изоцитратдегидрогеназа-1 (<i>IDH1</i>)
3	p	Аминоацилаза-1 (<i>ACY1</i>)
4	?	Пептидаза (<i>PEPS</i>)
	p?	Фосфоглюкомутаза-2 (<i>PGM2</i>)
5	q	β -гексозаминидаза-В (<i>HEXB</i>)
6	p	Глиоксалаза 1 (<i>GLO</i>)
	q	Супероксиддисмутаза-2 (<i>SOD2</i>)
	q	Малатдегидрогеназа-1 (<i>ME1</i>)
7	q	β -глюкуронидаза (<i>GUSB</i>)
8	p	Глутатионредуктаза (<i>GSR</i>)
9	p	Аконитаза-1 (<i>ACO1</i>)
	q	Аденилаткиназа-1 (<i>AK1</i>)
10	q	Глутамат-оксалоацетат—трансаминаза-1 (<i>GOT1</i>)
11	p	Лактатдегидрогеназа-А (<i>LDHA</i>)
12	p	Триозофосфатизомераза-1 (<i>TR11</i>)
	q	Пептидаза-В (<i>PEPB</i>)
13	q	Эстераза-Д (<i>ESD</i>)
14	q	Нуклеотидфосфорилаза (<i>NP</i>)
15	q	Маннозофосфатизомераза (<i>MPI</i>)
	q	Пируваткиназа-М2 (<i>PKM2</i>)
16	q	Аденозинфосфорибозилтрансфераза (<i>APRT</i>)
	q	Галактокиназа (<i>GALK</i>)
18	q	Пептидаза-А (<i>PEPA</i>)
19	?	Глюкозофосфат-изомераза (<i>GPI</i>)
	?	Пептидаза (<i>PEPD</i>)
20	q	Аденозиндезаминаза (<i>ADA</i>)
21	q	Супероксиддисмутаза (<i>SOD1</i>)
22	q	Аконитаза-2 (<i>ACO2</i>)
X	q	Глюкозо-фосфатдегидрогеназа (<i>GGPD</i>)
	q	Фосфоглицерокиназа (<i>PGK</i>)

По Shous T.B. (1982). Adv. Human Genetics, 12, 341–452.

обрабатывают рестрицирующими эндонуклеазами, а полученные фрагменты ДНК разделяют гель-электрофорезом, денатурируют и переносят на нитроцеллюлозные мембранные фильтры. На фильтрах осуществляется гибридизация с тем или иным меченым ДНК-зондом. Для большей эффективности можно разделять амплифицированные фрагменты хромосомной ДНК. Для этого используют их предварительное клонирование на фаговых векторах.

После гибридизации фильтры накладывают на рентгеновскую пленку, на которой после проявления обнаруживаются полосы, соответ-

Рис. 18.17. Картирование клонированных генов человека при использовании гибридов соматических клеток мыши и человека с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Присутствие хромосом человека определяется при цитологическом изучении гибридных клеток. Ферменты, служащие маркерами данных хромосом, выявляются с помощью гель-электрофореза. Рестрикционные фрагменты ДНК, выделенной из гибридной линии, разделяют электрофорезом в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозный фильтр. На этом фильтре проводят их гибридизацию с зондом, меченным радиоактивными изотопами. (По Shows T. B. et al., 1982. Adv. Hum. Genet., 12, 341-452.)



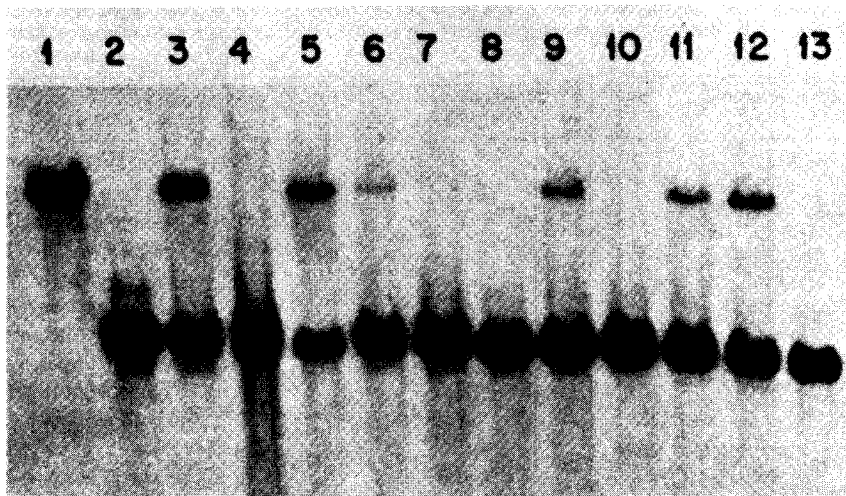


Рис. 18.18. Анализ гибридных клеток по методу Саузерна. ДНК гибридных клеток мышь-человек обрабатывали рестриктазой *Hin*dIII и гибридизовали с зондом протяженностью 900 п.н., содержащим вирусный онкоген *тус*. На первой дорожке электрофореграммы гибридизуется полоса, соответствующая по-

зиции фрагмента ДНК человека, на второй – фрагмента ДНК мыши. На дорожках 3–13 фракционированы фрагменты ДНК из гибридных линий. Последовательности человека, гомологичные *тус*, присутствуют в клонах 3, 5, 6, 9, 11 и 12. (По *Sakaguchi A. Y. et al.* 1983. *Somatic Cell Genetics*, 9, 391–405.)

стующие рестрикционным фрагментам, содержащим последовательности ДНК, гомологичные данному зонду (рис. 18.18). Гены соотносят с определенными хромосомами человека на основании корреляции между присутствием данной хромосомы в гибридной клеточной линии и наличием гибридизующегося фрагмента человеческой ДНК на радиоавтограмме. Данный метод более чувствителен, чем гибридизация ДНК в растворе и, главное, более специфичен.

Результаты эксперимента по картированию гена химотрипсिनогена В (СТРВ) приведены в таблице 18.3. «Плюсы» и «минусы» во втором столбце таблицы отражают результаты гибридизации по Саузерну. Следующие столбцы таблицы указывают на присутствие тех или иных хромосом человека в гибридных линиях. Единственная хромосома, которая имеется во всех гибридных клеточных линиях, дающих положительный ответ в блот-гибридизации, и отсутствует в линиях, дающих отрицательный ответ, – это хромосома 16.

Метод гибридизации по Саузерну, соединенный с подходами, разработанными для генетического анализа соматических клеток, с успехом применялся не только для картирования определенных генов (табл. 18.4), но и для локализации последовательностей ДНК с неизвестными функциями, найденными в библиотеках генов человека.

Таблица 18.3. Локализация гена химотрипсиногена в хромосоме 16

Линия клеток	Экспрессия химотрипси- ногена В	Хромосомы, присутствующие в клеточной линии																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X
1. TSL-2	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
2. ICL-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
3. XER-11	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4. XER-7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
5. EXR-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
6. XER-9	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
7. EXR-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8. MAR-2	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
9. DUA-5 BSAgA	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
10. XTR-22	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
11. REX-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12. ALR-1BSH6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+

Таблица 18.4. Человеческие гены и их семейства, картированные с помощью рестрикционного анализа (некоторые из этих последовательностей ДНК полиморфны)

Гены	Хромосомная локализация	Тип*	Полиморфизм ДНК
Гомолог <i>C-fos</i> (<i>CFOS</i>)	2	S	—
Легкая цепь <i>IgM</i> (<i>IGK</i>)	2	C	—
Проопиокортин (<i>POC</i>)	2p		—
Гомолог <i>C-myb</i> (<i>CMYB</i>)	6	S	—
Пролактин (<i>PRL</i>)	6	C	—
Коллаген, тип I, $\alpha 2$ (<i>COL1A2</i>)	7		—
Гомолог <i>C-mos</i> (<i>CMOS</i>)	8	S	—
Гомолог <i>C-myc</i> (<i>CMYC</i>)	8	S	—
α -интерферон (<i>IFL</i>)	9pter—12	C	—
β -интерферон (<i>IFF</i>)	9pter—12	S	—
Гомолог <i>C-abl</i> (<i>CABL</i>)	9	S	—
Гомолог <i>C-ras</i> H (<i>CRASH</i>)	11p13	S	+
Инсулин (<i>INS</i>)	11p15.5—p13	S	+
β -глобин (<i>HBB</i>)	11p1208—p1205	C	+
Гомолог <i>C-ras</i> ^K (<i>CRASK</i>)	12	S	—
Тяжелая цепь <i>Ig</i> (<i>IGH</i>)	14q32.3	C	+
Гомолог <i>C-fes</i> (<i>CFES</i>)	15	S	—
α -глобин (<i>HBA</i>)	16pter—p11	C	+
Химотрипсинаген В (<i>CTRB</i>)	16		—
Гормон роста (<i>GH</i>)	17q21—qter	C	—
Хорионический соматотропин (<i>CSH</i>) и плацентарный лактоген (<i>PL</i>)			
Коллаген типа I, $\alpha 1$ (<i>COL1A1</i>)	17q21—qter	S	—
Гомолог <i>C-src</i> (<i>CSRC</i>)	20	S	—
Гомолог <i>C-sis</i> (<i>CSIC</i>)	22q11—qter	S	—
Аргининосукцинатсинтетаза (<i>ASS</i>)	6, 9, X, Y**	D	+
Легкая цепь λ иммуноглобулина (<i>IGL</i>)	22**	D	+
β -тубулин	**	D	—

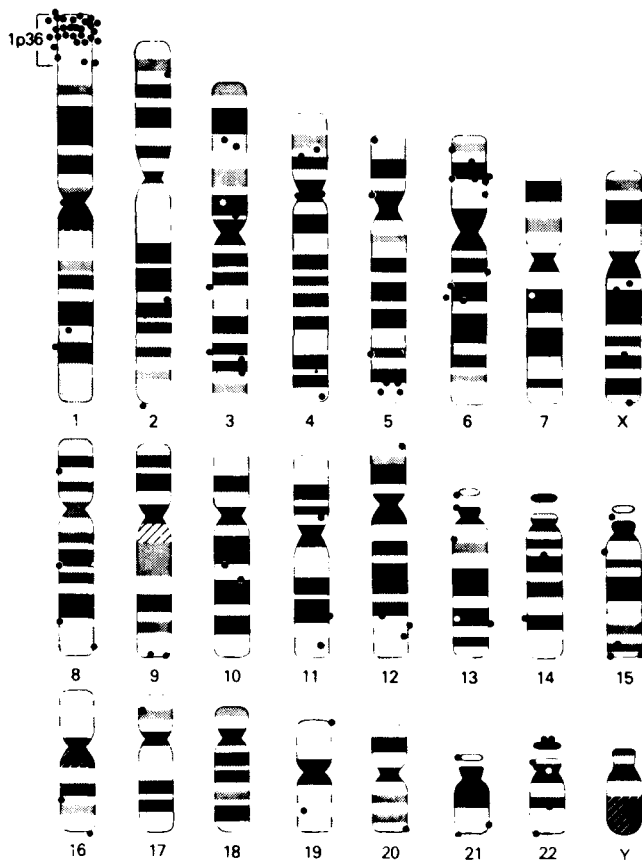
* S—Однокопийные гены, C—компактно расположенные семейства генов, D—диспергированные семейства генов.

** Семейства генов, представители которых расположены дополнительно на каких-либо еще хромосомах помимо идентифицированных. (Составлено по Eustachio P. D., Ruddle F. H. (1983). Science, 230, 919–924.)

Гибридизация in situ

Вышеописанная процедура определения хромосомной локализации генов включает в себя два основных этапа. Первый этап заключается в цитогенетической идентификации хромосом или фрагментов хромосом, присутствующих в гибридной линии клеток. На втором этапе с помощью гибридизации ДНК, в растворе или по методу Саузерна устанавливают наличие искомым последовательностей. Более прямой

Рис. 18.19. Распределение метки среди хромосом человека после гибридизации *in situ* метафазных хромосом с клонированным фрагментом ДНК величиной 14,9 т.п.н., меченным тритием. Большая часть метки связывается с концевой областью короткого плеча хромосомы 1. (По Harper M. E., Saunders G. F., 1981 Chromosoma, 83, 431–439.)



способ картирования генов заключается в непосредственной гибридизации между радиоактивными зондами и метафазными хромосомами. Этот метод гибридизации *in situ* был разработан для дрозофилы, большие политенные хромосомы которой, несущие много копий каждого гена, значительно облегчали этот процесс. С середины семидесятых годов методы гибридизации *in situ* были распространены на геном человека. Первоначально этот метод использовали для картирования тандемных повторяющихся последовательностей ДНК, например для генов рибосомной РНК. В последнее время гибридизацию *in situ* удалось применить и для картирования уникальных генов человека.

Принцип этого метода прост. Рассмотрим его на конкретном примере картирования некоего фрагмента ДНК человека величиной 14,9 т.п.н., клонированного на фаговом векторе. Функция этого фрагмента ДНК не ясна. Известно, что он присутствует в количестве не более одной-двух копий на гаплоидный геном. Метафазные хромосомы человека, распределенные на стандартном предметном стекле, обрабатывали с целью удаления примесей связанной РНК и денатурации хромосомной ДНК. В качестве зонда использовали клонированный фрагмент ДНК, радиоактивно меченный (^3H) с помощью ник-трансляции. Пред-

Таблица 18.5. Результаты гибридизации фрагмента человеческой ДНК (14,9 т.п.н.) с метафазными хромосомами человека

Конкурирующая ДНК (или РНК*)	Концентрация зонда (мкг/мл)	Число исследованных клеток	Клетки в гибри- дизующейся 1р36	Общее число точек на хромосоме	Число точек на 1р36
Повторяющаяся ДНК	1	21	7(33%)	38	8(21%)
—	1	13	8(62%)	61	8(13%)
тРНК <i>E. coli</i>	5	20	12(60%)	66	18(27%)
Повторяющаяся ДНК	5	17	9(53%)	53	13(25%)
Повторяющаяся ДНК	5	10	7(70%)	31	7(23%)

* Конкурирующая ДНК (или РНК) добавлена в тысячекратном избытке по отношению к зонду. (По Harper M. E., Saunders G. F., 1981. Chromosoma, 83, 431-439.)

метные стекла с метафазными хромосомами инкубировали с зондом в течение 16 часов, затем удаляли избыток меченой ДНК, не связанной с денатурированной ДНК метафазных хромосом. Распределение гибридизующихся зон на хромосомах выявляли методом радиоавтографии. Таким образом, в рассматриваемом случае было найдено, что искомая последовательность расположена в теломерной области короткого плеча хромосомы 1, в полосе 1р36 (рис. 18.19).

Часто при гибридизации к меченому зонду добавляют большой избыток (тысячекратный) немеченой конкурирующей ДНК (табл. 18.5). Этот прием уменьшает неспецифическое связывание зонда. В рассматриваемом примере в отсутствие конкурирующей ДНК (второй ряд табл. 18.5) в большей части клеток гибридизация с фрагментом 14,9 т.п.н. происходит в области 1р36, однако значительная часть черных точек на автографе, обозначающих гибридизацию, оказывается распределена и по многим другим хромосомным локусам. В этом случае могут выявляться последовательности человеческой ДНК, гибридизующиеся с зондом менее специфично. В таблице 18,6 приведены гены человека, картированные с помощью гибридизации *in situ*.

Таблица 18.6. Гены человека, картированные с помощью гибридизации *in situ*

Гены	Хромосомы
Легкая цепь иммуноглобулина κ (<i>IGK</i>)	2p
Гистоны (<i>H1, H2A, H2B, H3, H4</i>)	7q21 → 36
Гомолог <i>c-mos</i> (<i>CMOS</i>)	8q22
Гомолог <i>c-myc</i> (<i>CMYC</i>)	8q24
Интерфероны α и β (<i>IFL, IFF</i>)	9p21 → p ter
Инсулин (<i>INS</i>)	11p15
γ -Интерферон	12q24.1
Тяжелая цепь иммуноглобулина (<i>IGH</i>)	14q32
α -Глобин (<i>HBA</i>)	16
Коллаген, тип 1, $\alpha 1$ (<i>COL1A1</i>)	17q21 → q22
Кластер генов гормона роста (<i>GH</i>)	17q22 → q24

По Eustachio R. D., Ruddle F. H. (1983). Science, 230, 919-924.

Генетическая карта человека

Достоверно идентифицировано около 1500 генов человека. Это составляет 1–5% от их общего числа. Существование этих генов в большинстве случаев подтверждено обнаружением альтернативных аллельных форм. Для приблизительно 1000 известных генов один из альтернативных аллелей соответствует какому-либо заболеванию или аномалии. Другие известные гены кодируют белки группы крови, различные антигены, иммуноглобулины, ферменты и т. д.

В течение долгих лет картирование человеческого генома продвигалось очень медленно. Появление методов генетики соматических клеток положило начало новой эры. Дополнительное ускорение в решении этой задачи было достигнуто благодаря применению генно-инженерных подходов. В настоящее время не существует принципиальных технических препятствий для получения полной карты генома человека. Однако вследствие огромного размера изучаемой ДНК этот процесс, конечно, займет многие годы. Установление функции всех последовательностей и понимание принципов организации генома видится в отдаленном будущем (см. табл. 18.7).

Более 500 генов распределено по конкретным аутосомам. В каждой хромосоме, включая Y-хромосому, локализовано не менее 3 генов. Более 100 генов идентифицировано в X-хромосоме и более 30 в больших хромосомах 1–6. На рис. 18.20 приведены все хромосомы человека и указана локализация некоторых генов.

Перечень генов, локализованных в хромосоме 1, дан в таблице 18.8. Эта хромосома – самая крупная и самая изученная в геноме человека. В ее составе обнаружены гены, кодирующие белки различных классов. Это и ферменты, и белки группы крови, и факторы свертываемости крови. Мутации в некоторых из этих генов вызывают характерные генетические заболевания. Ряд генов связан с образованием легкотестируемых молекулярных маркеров. Определено значительное число последовательностей ДНК генов первой хромосомы. В популяциях людей отмечен полиморфизм генов этой хромосомы, хотя в ряде случаев его проявление существенно ограничено. Некоторые из генов хромосомы 1 можно тестировать у отдельных индивидуумов и, таким образом, использовать для генетического семейного анализа. Это гены *AMY*, *GDH*, *PGD*, *PGM1*, *Rh UMPK*. Другие гены, такие, как *AK2*, *DIS1*, *ENO1*, *FH*, *FUCA*, *GALE*, *PEPC*, *PGD*, *PGM1*, *UMPK*, эффективно используются в генетике соматических клеток.

Степень разрешения, достигаемая при картировании, определяется используемыми методами. Наиболее современные методы окрашивания позволяли выявить до 1000 полос на всех 23 хромосомах человека. В среднем на хромосому при этом приходится 50 полос, хотя на некоторых хромосомах их можно обнаружить в несколько раз больше, чем на других (сравни хромосомы 1 и 22 в табл. 18.9). Гаплоидный геном человека состоит из $3 \cdot 10^9$ п. н. Каждая полоса содержит $3 \cdot 10^6$ п. н., что соответствует нескольким сотням генов. Таким образом, пределом разрешения картирования с привлечением цитогенетических методов являются расстояния, соответствующие сотням генов.

Величина генома человека, выраженная в единицах рекомбинации, составляет 3000 сантиморган (сМ), то есть 130 сМ в среднем на хромо-

Таблица 18.7. Типы генетических маркеров, используемые в различных методах картирования генов человека

Классический семейный анализ	Генетика соматических клеток	Гибридизация <i>in situ</i> и сортировка хромосом
<p>Антигены групп крови (<i>ABO</i>, <i>Rh</i>); гены, связанные с раковыми заболеваниями (ретинобластома); хромосомные маркеры (деспирализованные участки, делеции); факторы свертываемости крови (фактор XII); клонированные гены (инсулин); компоненты системы комплемента; маркеры стадий развития (фетальный гемоглобин); заболевания неизвестной природы (синдром Прадера-Вилли); полиморфизм ДНК; фрагменты ДНК (неидентифицированные); ферменты (аденозиндезаминаза, эстераза D); маркеры гистосовместимости (<i>HLA</i>); метаболические нарушения (фенилкетонурия); морфологические признаки (дерматоглифика); митохондриальные маркеры (ядерная глутаматоксалацетаттрансаминаза-M); сывороточные белки (альбумин, гаптоглобин); признаки, сцепленные с полом (далтонизм, дефект по <i>GPD</i>)</p>	<p>Активаторы (активатор плазмидогена); маркеры культур клеток (промогор поликарбонитозиса, температурочувствительные маркеры, транспортные мутации); клеточные рецепторы (рецептор эпидермического фактора роста); белки хромосом (гистоны); клонированные гены (<i>HBB</i>, <i>POC</i>, <i>GH</i>); цитоплазматические белки (маркеры димерного электрофореза); полиморфизм ДНК; фрагменты ДНК (неидентифицированные); чувствительность к лекарственным средствам; ферменты (лактатдегидрогеназа A); маркеры, влияющие на экспрессию генов; гормоны (<i>PRL</i>, <i>CSH</i>); иммуноглобулины; мембранные белки (поверхностные антигены); митохондриальные маркеры (ядерная супероксиддисмутазы-2); модификаторы (белок, связующийся с аденозиндезаминазой); маркеры аутоксотрофности (ген, комплементирующий отсутствие <i>Ghy</i>); маркеры органелл (лизосомные ферменты); рРНК; тРНК; повторяющиеся последовательности ДНК (<i>DXZ1</i>, сателлитная ДНК); рибосомные белки; видоспецифичные антигены; структурные белки (коллаген); чувствительность к токсину (дифтерийный токсин); маркеры, связанные с вирусами (чувствительность к коронавирусам)</p>	<p>Клонированные гены (<i>GH</i>, <i>INS</i>, <i>HBA</i>); полиморфизм ДНК; фрагменты ДНК (неидентифицированные); рРНК</p>

По Shows T.B. et al. (1982). Adv. Human Genet., 12, 341-452.

сому. Один сантиморган соответствует приблизительно 10^6 п.н. ($3 \cdot 10^9$ п.н. : $3000 \text{ сМ} = 10^6$ п.н./сМ). Таким образом, одна полоса, выявленная при окрашивании хромосом, соответствует 3 сМ.

Генно-инженерные методы обеспечивают значительно более высокое разрешение. Применяя эти методы, можно картировать последовательности ДНК протяженностью от нескольких десятков пар нуклеотидов до 100 т.п.н. (Например, изученный район, содержащий глобиновые гены, имеет размер 60 т.п.н.) Последовательность ДНК в 100 т.п.н. соответствует примерно 0,03 от величины полосы окрашивания или 0,1 сМ. До сих пор не существует методов, позволяющих заполнить пробел между картированием в пределах 0,1 сМ, осуществляемым генно-инженерными методами, и картированием на участках величиной от 3 сМ, осуществляемым цитогенетически.

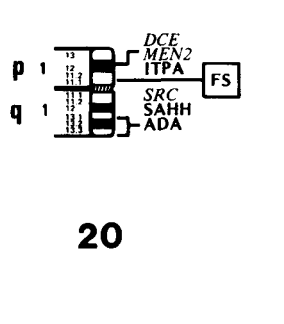
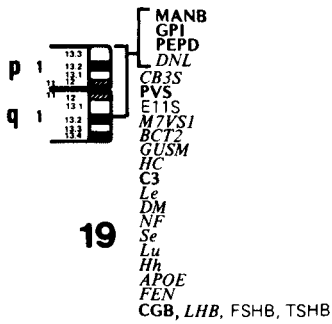
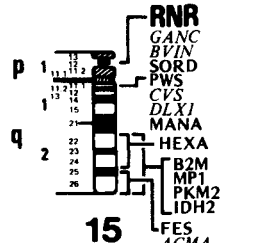
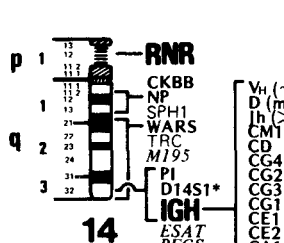
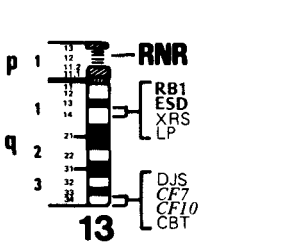
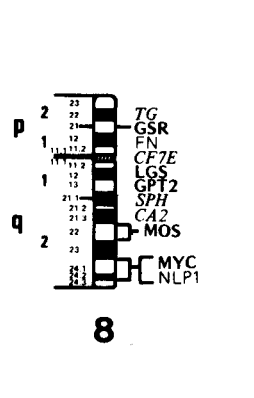
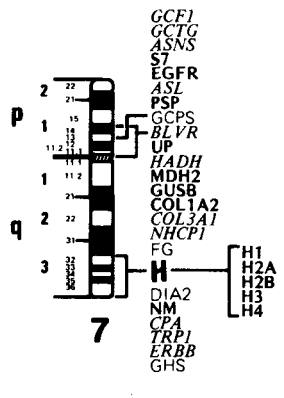
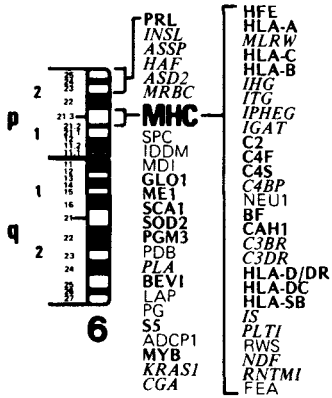
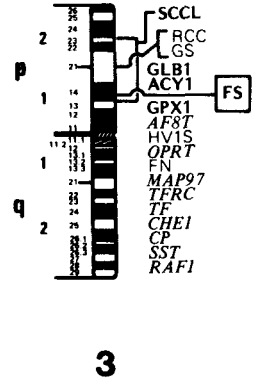
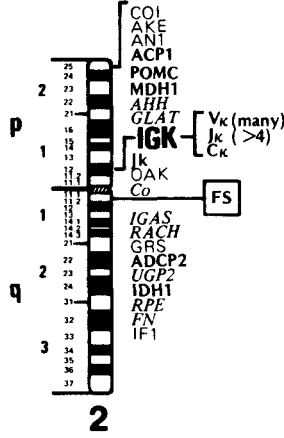
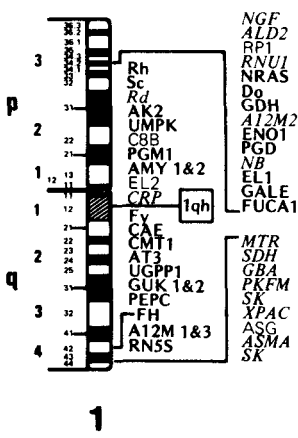


Рис. 18.20. Генетическая карта человека. Центромера и концы каждой хромосомы отмечены горизонтальными линиями. Гены хромосомы 1 приведены в табл. 18.8. (Courtesy of Prof. V. A. McKusic.)

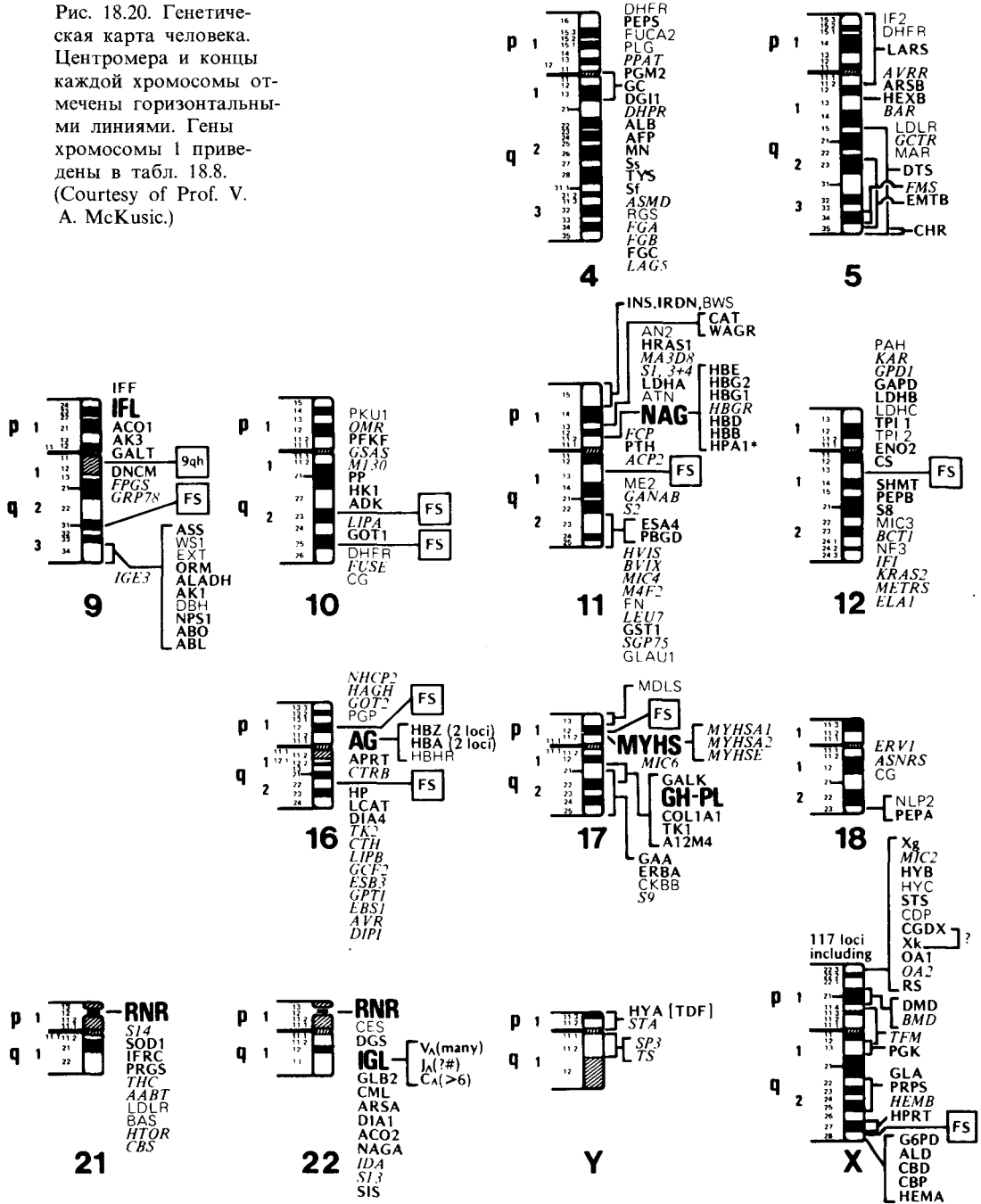


Таблица 18.8. Гены человека, картированные на хромосоме 1

Символ гена	Маркер	Полиморфизм	Район	Достоверность*
<i>A12M1</i>	Участок встраивания 1С аденовируса-12		q42 → q43	В
<i>A12M2</i>	Участок встраивания 1А аденовируса-12		p36	В
<i>A12M3</i>	Участок встраивания 1В аденовируса-12		21	В
<i>AK2</i>	Аденилаткиназа-2		pter → 32	Д
<i>AMY1</i>	α-Амилаза (слюнные железы)		p22.1 → q11	Д
<i>AMY2</i>	α-Амилаза (панкреатическая)	+	p22.1 → q11	Д
<i>AT3</i>	Антитромбин III		q23 → q25	В
<i>CAE</i>	Катаракта, помутнение периферических слоев хрусталика			Д
<i>CMT1</i>	Болезнь Шарко-Мари-Тут			Д
<i>D1S1</i>	Фрагмент ДНК		p36	В
<i>D1Z1</i>	Сателлитная ДНК 3		q12	В
<i>D_o</i>	Группа крови Домброк	+		Г
<i>EL1</i>	Эритроцитоз (сцепленный с Rh)		p	Д
<i>EL2</i>	Эритроцитоз (не сцепленный с Rh)			Г
<i>ENO1</i>	Енолаза-1		p36	Д
<i>FH</i>	Фумаратгидратаза		q42 → qter	Д
<i>FUCA</i>	α-L-Фукозидаза	+	p34 → p32	Д
<i>Fy</i>	Группа крови Даффи	+	pter → q21 или q32 → qter	Д
<i>GALE</i>	UDPGAL4-Эпимераза		pter → p32	Д
<i>GBA</i>	Кислая β-глюкозидаза		p11 → qter	В
<i>GDH</i>	Глюкозодегидрогеназа	+	pter → p21	Д
<i>GUK1</i>	Гуанилаткиназа-1		q32 → q42	Д
<i>GUK2</i>	Гуанилаткиназа-2			Д
<i>MTR</i>	Тетрагидроптерилглутамат-метилтрансфераза			В
<i>PEPC</i>	Пептидаза С	+	q25 или q42	Д
<i>PEKM</i>	Субъединица М фосфофруктокиназы		p32.1 → q32	В
<i>PGD</i>	Фосфоглюконатдегидрогеназа	+	pter → p34	Д
<i>PGM1</i>	Фосфоглюкомутаза-1	+	p22.1	Д
<i>PKU1</i>	Фенилкетонурия			П
<i>Rd</i>	Группа крови Радин		p34 → p22.1	В
<i>Rh</i>	Группа крови Резус	+	p36 → p32	Д
<i>RN5S</i>	5S РНК		q42 → q43	
<i>RP1</i>	Ретинит (пигментная дегенерация сетчатки)			Г
<i>Sc</i>	Группа крови Сианна	+	p34 → p32	Д
<i>SDH</i>	Сукцинатдегидрогеназа		p22.1 → qter	В
<i>UGP1</i>	UPD-глюкозопирофосфатаза-1		q21 → q22	Д
<i>UMPK</i>	Уридинмонофосфаткиназа	+	p32	Д

* Д—«доказано», данные получены независимо в двух лабораториях или при изучении двух семей; В—«вероятно», данные получены в одной лаборатории или по одной семье; Г—«гипотетически», данные менее однозначны, чем в случае В; П—«проблематично», экспериментальные данные противоречат друг другу. (По Cook P. Y. L., Hamerton J. L., 1982. Cytogenet. Cell. Genet., 32, 111–120 и Shows T. B., McAlpine P. Y., 1982. Cytogenet. Cell. Genet., 32, 221–245.)

Таблица 18.9. Количество ДНК, содержащейся в различных хромосомах человека

Хромосома	Доля ДНК от общего количества аутосомной ДНК, %	Длина ДНК (10^6 п.н.)
1	4,32	249
2	4,22	243
3	3,49	202
4	3,34	193
5	3,26	184
6	3,02	173
7	2,77	160
X	2,70	154
8	2,55	146
9	2,37	137
10	2,33	136
11	2,38	137
12	2,35	134
13	1,86	110
14	1,80	103
15	1,69	100
16	1,55	93
17	1,49	85
18	1,40	81
20	1,20	67
19	1,08	62
Y	0,92	53
22	0,86	52
21	0,82	48

По Southern E. M. (1982). Cytogenet. Cell. Genet., 32, 52–57.

Трансфекция и наследственные болезни

Методы переноса генов потенциально приложимы к лечению наследственных аномалий человека. Например, ген, кодирующий нормальный гемоглобин, мог бы быть передан человеку, страдающему серповидно-клеточной анемией, болезнью, вызванной присутствием аномальной β -глобиновой цепи. Если нормальный β -глобиновый ген будет введен в стволовые клетки, которые дают начало эритроцитам, то последние смогут синтезировать нормальный гемоглобин. Таким образом, индивидуум будет «вылечен». Устранение генетических дефектов генома с помощью трансфекции нормальными генами представляется делом отдаленного будущего. Одна из основных трудностей — это низкая эффективность трансфекции. Даже в наиболее удачных случаях доля трансформированных клеток очень мала. Более того, пока трансфекция проводится с культурами клеток, а не с целыми тканями живых организмов, что потребуется для исправления генетических дефектов.

Онкогены

Трансформация культур клеток с помощью ДНК недавно привела к открытию генов, участвующих в канцерогенезе. Эти гены называют *онкогенами*. Некоторые формы раковых заболеваний имеют явно выраженную генетическую природу. Характер наследования указывает на то, что заболевание может определяться одним геном. В качестве примера подобного заболевания можно привести ретинобластому, наследуемую по доминантному типу. Это заболевание проявляется в детстве как раковое поражение одного или двух глаз, которое быстро переходит на мозг, что при отсутствии лечения приводит к ранней смерти больного. Хотя известны многие виды раковых заболеваний, наследование которых подчиняется законам менделевского расщепления признаков, все они достаточно редки и охватывают лишь незначительную долю людей больных раком. Более распространенные формы рака не имеют такой четко выясненной генетической природы, хотя предрасположенность к ним, вероятно, наследуется.

На клеточном уровне рак, однако, является определенно генетическим заболеванием. Раковая клетка передает свои неопластические свойства дочерним клеткам. Этим можно объяснить высокую пролиферативную активность раковых тканей. Таким образом, превращение нормальной клетки в раковую связано с какими-то генетическими изменениями. Это подтверждается экспериментами, в которых раковые клетки передавали свои свойства нормальным клеткам в культуре при трансформации последних хромосомной ДНК из раковых клеток (рис. 18.21). Другим подтверждением генетической природы рака более общего порядка служит тот факт, что онкогенные вирусы, вызывающие рак, при превращении клетки в раковую оказываются встроенными в ее геном. Такое превращение клетки или ткани называется *раковой трансформацией*. Этот термин не следует путать с термином «генетическая трансформация», которая обозначает включение ДНК в геном после попадания свободной ДНК в клетку.

Ретровирусы, вызывающие раковую трансформацию, это РНК-содержащие вирусы. С помощью фермента ревертазы они способны синтезировать ДНК-копии в ходе так называемой *обратной транскрипции*. Эти ДНК-копии способны встроиться в геном клетки. Интегрированная копия называется провирусом. Некоторые ретровирусы, известные как активно трансформирующие вирусы, высоко онкогенны. Они вызывают неопластические заболевания у зараженных ими животных. В культуре клеток эти вирусы вызывают трансформацию клеток, протекающую с высокой эффективностью. Около 20 таких вирусов было выделено из крыс, мышей, обезьян, кошек, цыплят и индюков (например, вирусы саркомы Харвея и саркомы Малони выделены из крыс и мышей соответственно). Кроме генетической информации, необходимой для своей собственной репликации, эти вирусы несут специфические гены, называемые онкогенами, ответственными за их способность вызывать раковую трансформацию. Сейчас известно около 15 генов *onc*, включая ген *src* вируса саркомы Рауса, поражающего кур, ген *mos* вируса саркомы мышей и ген *ras* вируса саркомы крыс.

Недавние исследования показали, что онкогены гомологичны по некоторым последовательностям ДНК нормальных клеток млекопитающих, не инфицированных ретровирусами. Это открытие лежит в основе

Рис. 18.21. Клетки, трансформированные ДНК из раковых клеток. Нормальные клетки мыши обрабатывали ДНК, выделенной из опухоли. Через две недели образовывался плотный очаг трансформированных клеток, видимый слева. Справа клетки остались не трансформированными. (Courtesy of Chiachio Shih, R. A. Weinberg, Massachusetts Institute of Technology.)



двух важных гипотез, относящихся к возникновению рака на клеточном уровне. По одной из этих гипотез онкогены произошли от гомологичных генов, присутствующих в нормальных клетках. В рамках другой гипотезы раковая трансформация является следствием аномальной экспрессии нормального гена. Последняя может наблюдаться не только в случае трансформации, вызванной вирусами, но и при других формах рака.

Дополнительным подтверждением гомологии между онкогенами и последовательностями нормальных клеток служит и тот факт, что они, как правило, кодируют аналогичные белки. Например, онкоген вируса саркомы Рауса кодирует тирозин-специфичную киназу, обозначаемую $pp60^{src}$. Этот белок представляет собой фосфопротеин молекулярной массы 60000. Такой же белок выделяется и из нормальных клеток цыпленка, хотя в этих клетках его количество в 100 раз меньше, чем в раковых. Использование клонированных фрагментов онкогенов в экспериментах по ДНК-гибридизации выявило гомологию между геном ras^H вируса саркомы Харви и геном из клеток карциномы мочевого

пузыря человека. Аналогичные результаты получены для гена *ras^K* вируса саркомы Кириштейна и соответствующего гена из клеток карциномы легкого. Сейчас считается общепризнанным, что онкогены произошли в результате встраивания мРНК некоторых клеточных генов в геном ретровирусов.

Трансфекция генов и рак

ДНК из клеток карцином мочевого пузыря и легкого (вызываемых генами, гомологичными вирусным онкогенам *ras*) способна сама по себе индуцировать неопластическую трансформацию в культуре клеток мыши. Наиболее часто в подобных экспериментах используется реципиентная линия клеток мыши, обозначаемая N1H3T3. При трансформации с помощью ДНК, выделенной из неопластических клеток, клетки N1H3T3 становятся раковыми с частотой 0,05–1 трансформантов на 1 мкг ДНК. Эту трансформацию вызывают препараты ДНК, выделенные лишь примерно из 50% опухолей, включая как спонтанные, так и индуцированные опухоли различных организмов (таблица 18.10).

Таблица 18.10. Гены неопластических клеток, вызывающие раковую трансформацию

Тип клеток	Виды животных, доноров ДНК	Фактор индукции исходной опухоли	Число индуцированных опухолей
Трансформированные фибробласты	Мышь	Химическая	5
Карцинома мочевого пузыря	Человек	Спонтанная	3
	Мышь	Химическая	1
	Кролик	»	1
Карцинома легкого	Человек	Спонтанная	4
	Мышь	»	1
	Человек	»	1
Карцинома молочной железы	Человек	»	1
	Мышь	Химическая или вирусная	6
Карцинома толстой кишки	Человек	Спонтанная	2
Промиелоцитарная лейкемия	»	»	1
Нефробластома	Цыпленок	Вирусная	1
Нейробластома	Человек	Спонтанная	1
Глиобластома	Крыса	Химическая	3
	Мышь	»	1
Опухолевые предшественники В-лимфоцитов	Человек	Спонтанная	4
Лимфома В-клеток	Цыпленок	Вирусная	6
	Человек	Спонтанная	6
	Мышь	»	3
Плазмацитома/миелома	Человек	»	2
	Мышь	Химическая	2
Лимфома Т-клеток	Человек	Спонтанная	1
	Мышь	Спонтанная или химическая, радиационная, вирусная	6
Опухолевые зрелые Т-хелперные клетки	Человек	Спонтанная	1
Саркома	Мышь	Вирусная	1
	Человек	Спонтанная	1
	Мышь	Химическая	1

Еще более важным обстоятельством представляется то, что неопластическая трансформация происходит и при трансфекции клеток линии ННЗТЗ с помощью ДНК из нормальных клеток. Причиной этого явления может быть аномальная экспрессия нормальных генов. Трансформирующая способность ДНК из нормальных клеток может быть показана в экспериментах двух типов. Во-первых, при использовании для трансформации последовательностей ДНК из нормальных клеток, гомологичных вирусным онкогенам *ras* и *mos*, которые способны индуцировать неопластическую трансформацию. Во-вторых, при трансфекции тотальной геномной ДНК, выделенной из различных нормальных клеток животных.

Из нормальных клеток мыши был выделен ген, гомологичный онкогену *mos*. Этот ген не обладал трансформирующей активностью в тех случаях, когда он был фланкирован последовательностями ДНК из нормальных клеток. Однако после соединения этого гена с вирусными последовательностями, обеспечивающими эффективную транскрипцию, была получена структура, обладающая трансформирующей активностью, не отличающейся от активности онкогена *mos*. Подобные результаты получены для гена, гомологичного *ras*, выделенного из нормальных клеток крысы. Далее было показано, что при удалении 5'-последовательности, фланкирующей ген мыши, гомологичный *mos*, этот ген приобретает трансформирующую активность. В этом случае трансформирующая активность оказывается в 1000 раз ниже, чем при трансформации тем же геном, но соединенным с регуляторными элементами вируса. Эта низкая, но все же достоверная трансформирующая активность, вероятно, объясняется встраиванием донорного гена под контроль некоего активного клеточного промотора. Эффективная экспрессия встроенного гена приводит к раковой трансформации клетки.

Более общее подтверждение присутствия потенциальных онкогенов в нормальных клетках были получены в опытах по трансформации ДНК, выделенной из нормальных клеток цыпленка, мыши и человека. Препараты ДНК со средним размером выше 30 т.п.н. неспособны вызывать трансформацию. При фрагментировании той же ДНК до размеров от 0,5 до 5 т.п.н. эффективность трансформации достигает уровня 0,003 трансформированных клеток на 1 мкг ДНК.

Эта эффективность на два порядка меньше, чем в случае трансформации ДНК из раковых клеток. Но когда для трансформации используют ДНК, выделенную из клеток, трансформированных «нормальной» ДНК, то эта вторичная трансформация позволяет получать уже от 0,1 до 1 трансформанта на 1 мкг ДНК. Данная величина не отличается от тех значений частоты трансформации, которую можно получить при работе с ДНК, выделенной из спонтанных или химически индуцированных опухолевых клеток. Эти результаты позволяют предположить, что потенциальные онкогены нормальных клеток активируются при перестройках ДНК, сопровождающих трансформацию. Фрагментирование ДНК нормальных клеток вызывает отделение структурных частей протоонкогенов от регуляторных элементов. При последующей интеграции с геномом реципиента протоонкогены могут попасть под контроль сильных промоторов или других регуляторных элементов, которые обеспечивают аномальную (высокую или просто некоординированную) экспрессию этих генов, вызывающую трансформацию клеток. После того как такая интеграция уже произошла, в экспериментах по

вторичной трансформации передача трансформирующих генов будет происходить с высокой эффективностью.

Имеются экспериментальные данные, подтверждающие гипотезу о том, что активация протоонкогенов происходит при перестройках генетического материала, приводящих к увеличению скорости транскрипции соответствующих генов. Как уже упоминалось, некоторые белки, кодируемые вирусными онкогенами, например $pp60^{src}$, найдены и в нормальных клетках, однако в гораздо меньших количествах, чем в раковых. Более того, показано, что возникновение ряда онкогенов связано с хромосомными перестройками. Ген человека *c-myc*, гомологичный вирусному онкогену, который вызывает опухоли цыплят и других птиц, картируется вблизи одного из концов хромосомы 8. Было найдено, что у больших лимфомой Беркитта налицо транслокация терминальной части восьмой хромосомы (обычно на хромосому 14). При этой транслокации точка разрыва приходится как раз на locus протоонкогена *c-myc*, который, таким образом, попадает под контроль регуляторных элементов хромосомы 14, ответственных за транскрипцию гена тяжелой цепи иммуноглобулина (рис. 18.22).

Альтернативная гипотеза, не исключая предыдущую, предполагает, что активация онкогенов происходит в кодирующей области структурных генов. Эта гипотеза подтверждается наблюдениями (см. Дополнение 20.1, опыты Эймса) о том, что такие канцерогенные факторы, как радиация и некоторые химические агенты, одновременно служат источниками возникновения различных мутаций. Сейчас известно, что активация некоторых онкогенов в ряде случаев вызывается мутациями в структурной части генов, тогда как в других случаях активация оказывается связанной с действием «чужих» регуляторных элементов.

Насколько верно представление о том, что разные типы рака вызываются разными онкогенами? Специфичность трансформирующих генов исследовали методами рестрикционного анализа. В этих опытах изучали, насколько определенный набор рестриктаз инактивирует трансформирующую способность онкогенных последовательностей ДНК. При этом инактивация означала, что последовательность нуклеотидов, необходимая для трансформации, содержит сайт узнавания для данной рестриктазы. Все трансформирующие последовательности, инактивируемые определенным (достаточно большим) набором рестриктаз и не затрагиваемые другими рестриктазами, считали идентичными.

Результаты таких исследований проиллюстрированы табл. 18.11, в которой виды раковых опухолей сгруппированы по тканям, которые они поражают. Видно, что канцерогенез определенной ткани вызывается одними и теми же трансформирующими генами вне зависимости от первичного индуцирующего агента и от того, экспрессируются ли они у человека или у мыши. Различные онкогены индуцируют трансформацию различных тканей. Например, из второй строки табл. 18.11 следует, что одни и те же рестриктазы расщепляют онкогены в ДНК всех семи исследованных карцином молочной железы. При этом некоторые опухоли были обнаружены у мыши, другие — у человека, некоторые из них были спонтанными, тогда как в других случаях их индуцировали химические соединения или вирусы. Профиль чувствительности онкогенов этих карцином к рестриктазам *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Xho* I и устойчивость к *Pvu* II и *Sac* I являются тканеспецифичными и не характерны для онкогенных ДНК других типов тканей.

Лимфома Беркитта, транслокация 8; 14 = c-мус; Ig

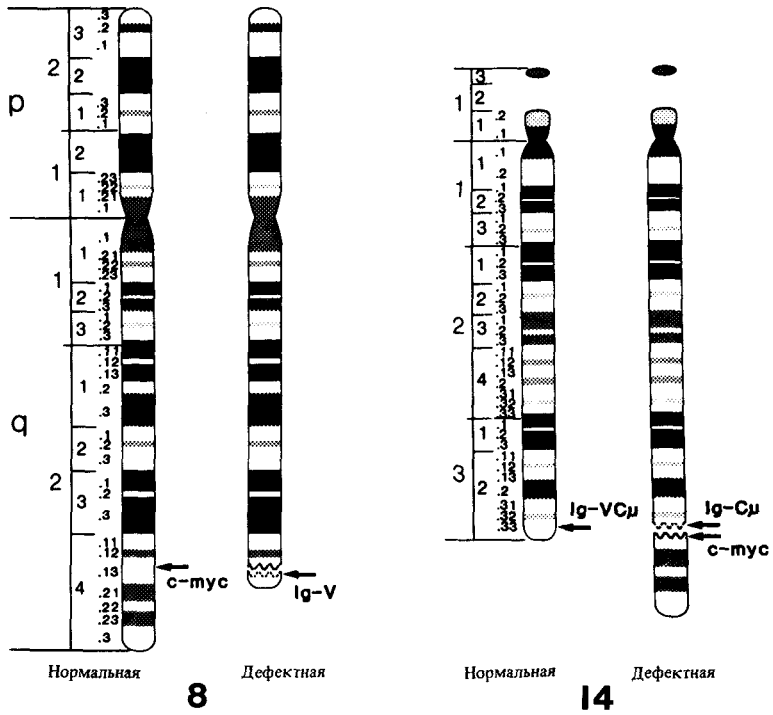


Рис. 18.22. Локализация онкогена *c-мус* и генов переменных и константных участков тяжелой цепи иммуноглобулинов в нормальных и дефектных хромосомах 8 и 14. Дефектные хромосомы обнаруживаются при лимфоме Беркитта. Дефектная хромосома 8 утрачивает *c-мус*

и приобретает переменный район иммуноглобулинов. Лocus *c-мус* транслоцируется на хромосому 14, где он располагается вблизи константного района c_{μ} иммуноглобулинов. Стрелками отмечено расположение этих генов. (По Yunis Y. Y., 1983. Science, 221, 227–236.)

Из данных шестой строки табл. 18.11 следует, что не все лимфомы Т-клеток обладают сходным типом инактивации. Рестриктаза *Xho I* инактивирует трансформирующую активность ДНК, выделенной из двух линий мышей, BALB/C и C57, но неспособна к инактивации трансформирующей активности ДНК четырех линий клеток человека. Вероятно, все эти клетки содержат общий онкоген, расщепляемый *Vam* III и *Hind* III, но не *Eco* RI. Таким образом, данный ген является полиморфным по устойчивости к рестриктазе *Xho I*.

Специфичность трансформирующих последовательностей многих человеческих карцином была подтверждена при исследовании повторяющихся последовательностей, сцепленных с этими онкогенами. Различные повторяющиеся последовательности ДНК фланкируют онкогены, которые способны индуцировать различные типы опухолей. Среди этих опухолей – ретинобластома, карцинома мочевого пузыря, карцинома ободочной кишки и промиелоцитарная лейкемия. Интересное исключе-

Таблица 18.11. Рестрикционный анализ трансформирующих последовательностей ДНК, активированных в неопластических клетках

Тип клеток	Вид	Индукция опухоли	Кол-во незав. трансформаций	Трансформирующая активность после обработки					
				<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Pvu</i> II	<i>Sac</i> I	<i>Xho</i> I
Трансформированные фибробласты	Мышь	Химическая	4	+	-	-	н.о.	н.о.	+
Карцинома молочной железы	Человек	Спонтанная	7	+	+	+	-	-	+
	Мышь	Химическая							
Опухолевые предшественники В-клеток	Человек	Спонтанная	4	-	+	+	н.о.	н.о.	-
	Мышь	Химическая							
Лимфома В-клеток	»	»	5	-	+	+	н.о.	н.о.	+
Опухолевые зрелые В-клетки (миелома, плазмацитома)	Человек	Спонтанная	4	+	+	+	+	-	+
	Мышь	Химическая							
Лимфома Т-клеток	Человек	Спонтанная	7	+	-	+	н.о.	н.о.	+-
	Мышь	Химическая							
Опухолевые зрелые Т-хелперные клетки	Человек	Спонтанная	2	+	+	-	н.о.	н.о.	-
	Мышь	Химическая							

н.о. — не определялось. (По Cooper G. H., 1982. Science, 218, 801-806.)

ние из этого правила представляют собой легочная карцинома и карцинома ободочной кишки, онкогены которых соседствуют с идентичными повторяющимися последовательностями. Характерно, что обе эти карциномы имеют также сходный тип рестрикционной инактивации в экспериментах по трансформации. Поскольку эти опухоли поражают разные виды эпителиальных тканей, то вполне возможно, что они индуцируются сходными онкогенами. Это предположение подтверждается тем фактом, что онкогены как легочной карциномы, так и карциномы мочевого пузыря (последняя также поражает эпителиальную ткань) у человека гомологичны вирусному онкогену *ras*.

Остается непонятным, по какой причине ДНК из примерно 50% исследованных опухолей оказываются неспособны вызвать раковое превращение клеток линии NIH3T3. Возможно, в этих случаях у исходных линий опухолевых клеток неоплазия обусловлена гомозиготным состоянием рецессивного онкогена. Альтернативная возможность заключается в том, что клетки NIH3T3 вообще не способны трансформироваться под действием некоторых онкогенов. Кроме этого, остается возможным объяснение, основанное на представлении о том, что некоторые формы рака имеют эпигенетическое происхождение, а не связаны непосредственно с генетическими изменениями. Согласно таким представлениям, ДНК подобных опухолей неспособна вызывать раковую трансформацию, поскольку она сама по себе не содержит каких-либо онкогенов.

Генетика соматических клеток растений

Существенное преимущество растений по сравнению с животными, важное для генетики соматических клеток, заключается в том, что гаплоидные клетки растений можно культивировать *in vitro*. В процессе онтогенеза всех растений происходит смена гаплоидных и диплоидных фаз. У мхов и печеночников доминирует гаплоидная фаза. Эта фаза, называемая *гаметофитом*, сохраняется и у высших растений, хотя у них она сильно редуцирована. В процессе мейоза образуются мужские и женские клетки, которые проходят несколько митотических делений. Диплоидность восстанавливается при оплодотворении. Клетки гаплоидной фазы можно поддерживать в культуре. В такой культуре клеток легко тестировать проявление рецессивных маркеров подобно тому, как это делается при работе с ауксотрофными маркерами бактерий. При использовании соответствующих селективных сред можно проводить скрининг больших популяций клеток, подбирая условия, при которых способность к пролиферации сохраняют только нужные мутанты.

На рис. 18.23 изображена схема получения диплоидного растения табака, несущего определенную комбинацию генов с использованием методов генетики соматических клеток. Важный этап в биосинтезе аминокислот *Nicotiana tabacum* осуществляет нитратредуктаза, превращающая нитраты в нитриты. Для синтеза этого фермента необходимы два гена. При использовании соответствующих селективных сред в культуре гаплоидных клеток табака, отобранные мутации *snx* и *nia*, затрагивающие оба гена. Ни одна из гаплоидных линий, несущих мутации в этих генах, не способна использовать нитрат в качестве источника азота. При слиянии комплементирующих линий образуется диплоид, имеющий генотип *snx/+* и *nia/+*, способный расти на нитрате как на единственном источнике азота.

Методы генетики соматических клеток растений имеют много важных приложений, поскольку растительные клетки в культуре в отличие от клеток животных обладают очень важным свойством – из одной растительной клетки можно получить целое растение. У животных линия клеток, которые затем образуют гаметы, отделяется от соматических клеток на ранних этапах индивидуального развития особи. По мере этого развития соматические клетки специализируются, при этом они теряют способность при делении восстановить целую особь. У растений генеративные клетки не существуют в виде отдельной клеточной субпопуляции: цветок формируется из неспециализированных соматических клеток. Тотипотентность растительных клеток, выращенных в культуре, была впервые показана в 1958 г. Одиночная клетка моркови при пролиферации давала массу недифференцированных клеток, так называемый каллус, которые на среде, содержащей растительные гормоны, подвергались дифференцировке, образуя корни и стебель. На стебле формировались цветы и затем семена. Из этих семян затем вырастали нормальные растения.

Потенциальные приложения этого явления очевидны. Клетки, которым при помощи методов генетики соматических клеток приданы желаемые наследственные признаки, можно использовать для получения целых растений. Так, целые растения были получены из диплоидных

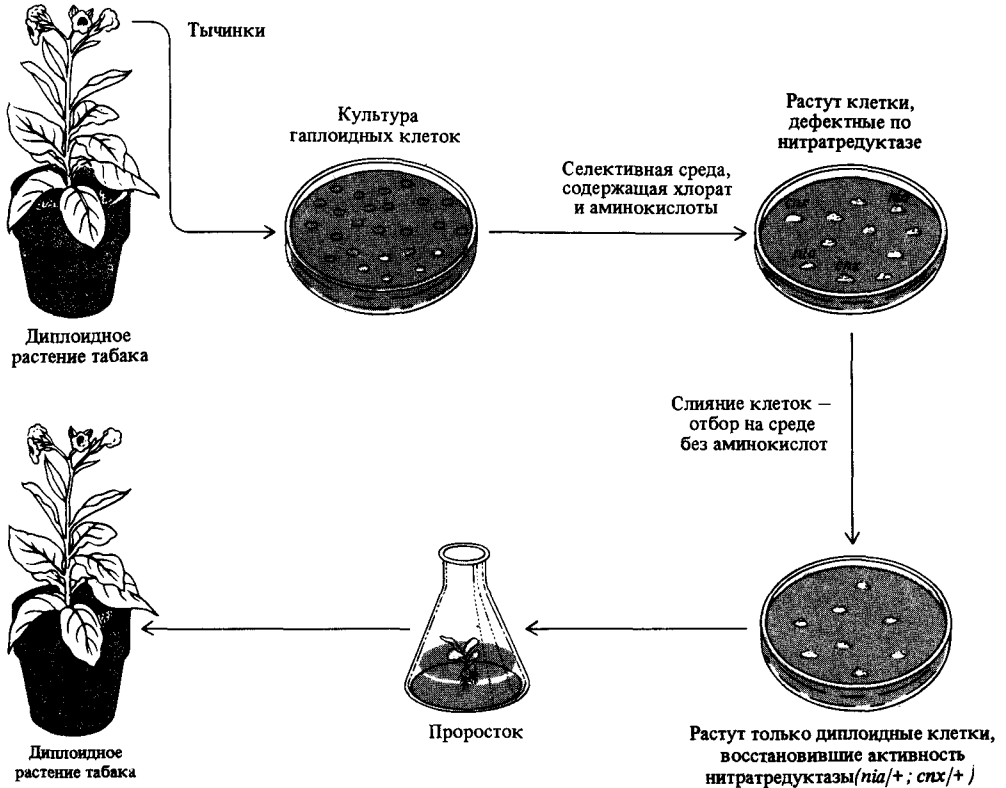


Рис. 18.23. Диплоидное растение табака, имеющее желаемую генетическую структуру, полученное методами генетики соматических клеток. Используемые мутации были отобраны предварительно в линиях гаплоидных

клеток. При слиянии двух гаплоидных линий образовались диплоидные клетки, из которых затем были получены целые растения. (По *Fristrom Y.W., Spieth P.T.*, 1980. *Principles of Genetics*, Chiron Press. New York.)

клеток, образовавшихся при слиянии гаплоидных клеток *N. tabacum*, несущих мутации *snx* и *nia*. Такой способ улучшения генотипа значительно быстрее традиционных методов, используемых в селекции растений и животных. Период генерации для отдельных клеток существенно короче, чем для целых растений. Кроме того, при скрининге клеток можно проанализировать значительно большие популяции, чем при анализе растений, выращенных в теплицах и на полях опытных станций. При этом можно получить растения, обладающие важными агрономическими и экономическими характеристиками, которые очень трудно или даже невозможно обеспечить другими методами. Так, из культуры клеток, отобранных по устойчивости к токсину грибка *Helminthosporium maydis*, получены целые растения, листья которых не подвержены поражению этим грибом.

Соматические клетки растений используют и для получения растительных гибридов. Клетки двух видов табака *N. glauca*, содержащего 24 хромосомы, и *N. langsdorfii*, содержащего 18 хромосом, могут сливаться, образуя гибриды с 42 хромосомами. При этом возникают каллусы, из

которых в присутствии растительных гормонов могут развиваться целые растения, дающие семена. Гибридные растения, образующиеся из этих семян, имеют хромосомный набор из 42 хромосом и не отличаются от гибридов, полученных обычным образом при скрещивании целых растений в теплицах.

Литература

- Berg K., Evans H.J., Hamerton J.L., Klinger H.P., eds., 1982. Human Gene Mapping 6, Sixth International Workshop on Human Gene Mapping, S. Karger, Basel.
- Cooper G.M. (1982). Cellular transforming genes, *Science*, **218**, 801–806.
- Doolittle R.F. et al. (1983). Simian sarcoma virus *onc* gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, *Science*, **221**, 275–277.
- Ege T., Ringertz N.R. (1974). Preparation of microcells by enucleation of micronucleate cells, *Exp. Cell. Res.*, **87**, 378–382.
- Emanuel B.S. et al. (1979). Deletion mapping: further evidence for the location of acid phosphatase (ACP₁) within 2p23, *Amer. J. Med. Gen.*, **4**, 167–172.
- Goldfarb M., Shimizu K., Perucho M., Wigler M. (1982). Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells, *Nature*, **296**, 404–409.
- Gray J.W. et al. (1975). Chromosome measurement and sorting by flow systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1231–1234.
- Harper M.E., Saunders G.F. (1981). Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by *in situ* hybridization, *Chromosoma*, **83**, 431–439.
- Klobutcher L.A., Ruddle F.H. (1981). Chromosome mediated gene transfer, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 533–554.
- Kosuge T., Meredith C.P., Hollaender A., 1983. Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective, Plenum Press, New York.
- Lebo R.V. et al. (1979). Assignment of human β -, γ - and δ -globin genes to the short arm of chromosome 11 by chromosome sorting and DNA restriction enzyme analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5804–5808.
- McBride O.W., Peterson J.L. (1980). Chromosome-mediated gene transfer in mammalian cells, *Annu. Rev. Genet.*, **14**, 321–345.
- McKusick V.A., 1982. Mendelian Inheritance in Man, 6th ed., Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Martin G.R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis, *Science*, **209**, 768–776.
- Miller C.K., Temin H.M. (1983). High-efficiency ligation and recombination of DNA fragments by vertebrate cells, *Science*, **220**, 606–609.
- Miller C.L., Ruddle F.H. (1978). Co-transfer of human X-linked markers into murine somatic cells via isolated metaphase chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3346–3350.
- Puck T.T., Kao F.-T. (1982). Somatic Cell genetics and its application to medicine, *Annu. Rev. Genetics*, **16**, 225–271.
- Robins D.M., Ripley S., Henderson A.S., Axel R. (1981). Transforming DNA integrates into the host chromosome, *Cell*, **23**, 29–39.
- Ruddle F.H. (1981). A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies, *Nature*, **294**, 115–120.
- Sakaguchi A.Y. et al. (1983). Human *c-Ki-ras*² protooncogene on chromosome 12, *Science*, **219**, 1081–1083.
- Shows T.B., Sakaguchi A.Y., Naylor S.L. (1982). Mapping the human genome, cloned genes, DNA polymorphism, and inherited disease, *Adv. Human. Genet.*, **12**, 341–452.
- Yunis J.J. (1983). The chromosomal basis of human neoplasia, *Science*, **221**, 227–236.

Ключевые слова и понятия

Генетика соматических клеток	Микроклетки
Гибридизация	Онкогены
Гибридизация клеток	Протоонкогены
Дикарион	Синкарион
Дифференциальное окрашивание хромосом	Синтения
Клеточная линия	Трансфекция
Котрансформация	Трансформация (термин имеет два значения)
Метод НАТ-селекции	

Задачи

18.1. В чем заключаются сходство и различия культур бактерий и соматических клеток, связанные с возможностью их использования в генетических исследованиях?

18.2. В чем заключаются особенности генетики соматических клеток, позволившие использовать ее методы для картирования генома человека?

18.3. Каковы необходимые этапы при картировании генов человека с помощью

гибридных линий клеток человека и мыши?

18.4. Ряд гибридных клеточных клонов (человек – мышь) исследовали для определения в них экспрессии определенных человеческих генов и присутствия тех или иных хромосом человека. Результаты приведены в таблице. Определите хромосомную локализацию каждого искомого гена.

	Гибридные клоны					
	A	B	C	D	E	F
Экспрессирующиеся гены <i>ENO1</i> (енолаза-1)	-	+	-	+	+	-
<i>NDH1</i> (малатдегидрогеназа-1)	+	+	-	+	-	+
<i>PEPS</i> (пептидаза S)	+	-	+	-	-	-
<i>PGM1</i> (фосфоглюкомутаза-1)	-	+	-	+	+	-
Присутствующие хромосомы						
1	-	+	-	+	+	-
2	+	+	-	+	-	+
3	+	+	-	-	+	-
4	+	-	+	-	-	-
5	-	+	+	+	+	+

18.5. Обычно гибридные клеточные линии используются для определения корреляции между экспрессирующимися генами и присутствующими в клетках хромосомами человека. Для того чтобы уменьшить количество анализируемых клонов, можно применить селекционные методы, позволяющие отобрать клоны, которые содержат лишь некоторые хромосомы исследуемого генома. Ограничимся хромосомами человека 1–8. Составьте таблицу, состоящую только из трех клонов (т.е. припишите каждому клону хромосомы, которые должны в нем присутствовать), таким образом, чтобы можно было определить хромосомную локализацию любого экспрессирующегося гена человека, расположенного в одной из этих восьми хромосом.

18.6. Используя результаты решения предыдущей задачи, определите минимальное число клонов, необходимое для картирования генов, расположенных в любой из хромосом человека.

18.7. Выделенными индивидуальными хромосомами человека трансформировали культуру клеток мыши. Присутствие

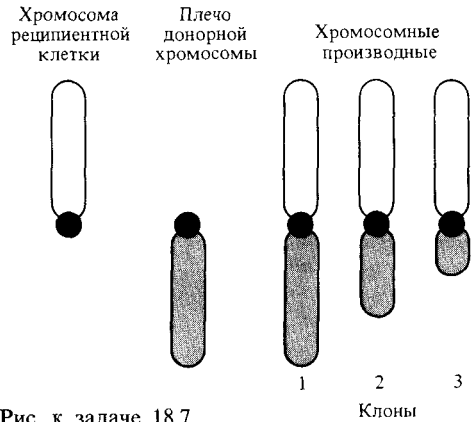


Рис. к задаче 18.7.

селектируемого гена (СГ) позволяет отбирать гибридные клоны, получившие хромосомный фрагмент, содержащий СГ. По данным бендинг-анализа, центромерный конец телоцентрической хромосомы человека и прилежащий к нему район делетированы в ряде клонов (см. рис.). В клоне 1 экспрессируются гены А, Б и В, в клоне 2 – гены А и В, в клоне 3 – только ген В. Определите положение этих генов по отношению к центромере и друг другу.

Количественные признаки

Открытие Менделем основных законов наследственности оказалось возможным благодаря тому, что он анализировал контрастирующие признаки, которые легко отличались друг от друга. Горошины были желтыми или зелеными, гладкими или морщинистыми, цветки – осевыми или верхушечными; растения – карликовыми или высокими и т. д. Каждый признак был представлен двумя альтернативными формами, определяемыми различными аллелями одного гена. Однако такие четко различимые альтернативные формы существуют не для всех признаков. Людей или сосны нельзя разделить только на два класса: высокие и низкие. Рост, вес, плодовитость, продолжительность жизни – вот несколько примеров многочисленных признаков, для которых в большей или меньшей степени характерна *непрерывная изменчивость*. Непрерывная изменчивость обусловлена (1) взаимодействием между различными генами и (2) взаимодействием между генами и окружающей средой.

Взаимодействие между генами и окружающей средой уже рассматривалось в гл. 2, где были дифференцированы понятия фенотип и генотип. Генотип организма – это генетическая информация, которую он получил по наследству; фенотип – это наблюдаемая нами совокупность его внешних признаков.

В главах 10–17 мы рассматривали способы действия генов – то, как генетическая информация, присутствующая в зиготе, направляет развитие организма и определяет его фенотип. Синтез белка, кодируемого структурным геном, и проявление признака обычно разделены длительной последовательностью процессов. Конечный результат фенотипического проявления гена зависит как от условий среды, так и от действия других генов. На действие гена оказывают влияние не только регуля-

торные гены, но также и другие структурные гены. Например, несмотря на нормальную работу гена, кодирующего ИГФ-синтазу, синтез триптофана может быть нарушен вследствие мутации какого-либо предыдущего гена в метаболическом пути, например гена, кодирующего антранилатсинтазу (см. рис. 10.8). Однако, если в среде обитания присутствует антралиловая кислота, синтез триптофана произойдет и в этом случае.

В этой главе мы введем некоторые понятия, описывающие различные типы взаимосвязей между генами и генотипами, возникающих вследствие взаимодействия между генами или между генами и окружающей средой. Большая часть главы посвящена признакам, для которых характерна непрерывная изменчивость; в ней сделана попытка разобраться, какую роль в определении этой изменчивости играют генетические и средовые факторы.

Пенетрантность и экспрессивность

Одни гены почти не проявляют изменчивости в своем фенотипическом выражении; для проявления других генов характерна высокая степень изменчивости. Изменчивость может быть обусловлена как тем, что не все особи, имеющие данный генотип, имеют соответствующий ему фенотип, так и тем, что степень проявления фенотипа различна у различных особей. *Пенетрантность* гена — это доля особей, у которых проявляется ожидаемый фенотип. *Экспрессивность* — это степень выраженности фенотипа (у тех особей, у которых он проявился). Доминантная мутация *Lobe* (*L*) у *D. melanogaster* характеризуется уменьшением размера глаза. Пенетрантность этого гена — 75%, т. е. только 75% особей, несущих ген *L*, имеют редуцированные глаза, тогда как у 25% таких особей глаза нормальные. Кроме того, для гена *L* характерна варьирующая экспрессивность, так как у 75% особей с редуцированными глазами степень этой редукции может быть разной (рис. 19.1).

Многие гены имеют полную пенетрантность и экспрессивность. В опытах Менделя все горошины, несущие доминантный аллель (опре-

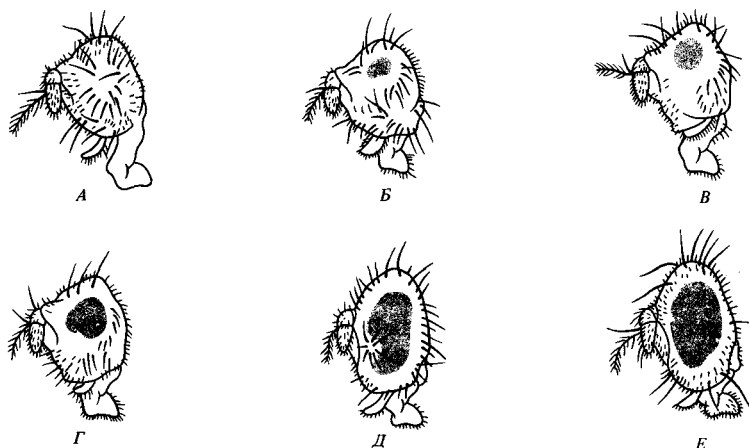


Рис. 19.1. Пенетрантность и экспрессивность гена *Lobe* у *D. melanogaster*. Для этого доминантного гена характерна варьирующая экспрессивность: размер глаза изменяется от нуля (А) до нормального (Е). Данный ген пенетрантен только у 75% носителей (А–Д).

Таблица 19.1. Возраст первого проявления симптомов хорей Гентингтона

Возраст	Число случаев	Процент	Накопленный процент
0–4	4	0,9	0,9
5–9	5	1,1	2,0
10–14	15	3,3	5,2
15–19	24	5,2	10,4
20–24	38	8,3	18,7
25–29	57	12,4	31,1
30–34	83	18,0	49,1
35–39	80	17,4	66,5
40–44	57	12,4	78,9
45–49	42	9,1	88,0
50–54	28	6,1	94,1
55–59	12	2,6	96,7
60–64	7	1,5	98,3
65–69	7	1,5	99,8
70–74	1	0,2	100
Сумма:	460	100,0	100,0

деляющий желтую окраску как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии), были желтыми, а все горошины, гомозиготные по аллелю, определяющему зеленую окраску, – зелеными. Все люди генотипа $I^A I^A$ или $I^A i$ имеют группу крови А, люди генотипа $I^B I^B$ или $I^B i$ – группу крови В. Генотип $I^A I^B$ определяет группу крови АВ; генотип ii соответствует группе крови О (гл. 2, табл. 2.4).

Примером неполной пенетрантности и варьирующей экспрессивности может служить проявление доминантного гена, вызывающего хорей Гентингтона у человека. Люди, несущие этот доминантный ген, заболевают в различном возрасте, некоторые из них остаются здоровыми в течение большей части своей жизни. Болезнь начинается с непроизвольных подергиваний головы, конечностей и туловища и, прогрессируя, приводит к дегенеративным изменениям нервной системы, потере физических и умственных сил и смерти. Возраст первого проявления хорей Гентингтона – от младенчества до старости (табл. 19.1). Данный ген имеет неполную пенетрантность, поскольку достоверно известно, что у некоторых носителей он так и не проявляется, т.е. они умирают от старости или других причин, не заболев хореей Гентингтона. Кроме того, этот ген имеет варьирующую экспрессивность: его носители заболевают в различном возрасте, т.е. он оказывает на их жизнь различное влияние.

Причинами, вследствие которых ген проявляется у одних особей и не проявляется у других, а также имеет варьирующую экспрессивность, могут быть влияние внешней среды и (или) генотипа. Роль среды в проявлении гена очевидна в случае ауксотрофных мутаций и других условных леталей. Сальмонелла, несущая мутацию гена, кодирующего ИГФ-синтазу, неспособна расти на минимальной среде, однако растет при добавлении в среду индола. Дрозофилы, несущие некоторые температурочувствительные летальные мутации, обладают нормальной жизнеспособностью при 20°C, но при 29°C они или теряют подвижность, или погибают. Внешняя среда также оказывает влияние на экспрессивность



Рис. 19.2. Различная экспрессивность полидактилии. Существует много форм полидактилии: дополнительный палец вырастает и рядом с большим пальцем, и рядом с мизинцем. По крайней мере в некоторых семьях полидактилия обусловлена наличием доминантного гена (D), контролирующего число лучистых костей, которые образуются в эмбриональных

зачатках кистей рук и стоп ног. Экспрессивность генотипа Dd варьирует иногда даже у одного и того же человека, который может иметь на одной руке пять пальцев, а на другой — шесть. В таких случаях варьирующая экспрессивность определяется внутренней средой развивающегося организма.

морфологических признаков. На рис. 19.2 приведен пример такого признака у человека. Все особи *D. melanogaster*, гомозиготные по гену *vestigial* (vg), имеют фенотип *vestigial* (зачаточные крылья), однако размер их крыльев зависит от температуры, при которой происходило развитие. На пенетрантность и экспрессивность гена также могут оказывать влияние другие гены данной особи, что особенно ярко выражено в случае генов-модификаторов и эпистатических генов, которые обсуждаются в следующем разделе.

Гены-модификаторы и гены, имеющие эпистатическое действие

Большинство основных взаимодействий между генами — это взаимодействие между аллелями одного локуса: доминантность, рецессивность и кодоминантность. В локусе АВО человека аллели I^A и I^B доминантны по отношению к аллелю i , который по отношению к ним рецессивен; между собой аллели I^A и I^B кодоминантны. Гены, имеющие аддитивное фенотипическое проявление, будут обсуждаться ниже в связи с проблемой непрерывной изменчивости. Сейчас мы рассмотрим два других типа взаимодействия, обусловленные генами-модификаторами и эпистатическими генами.

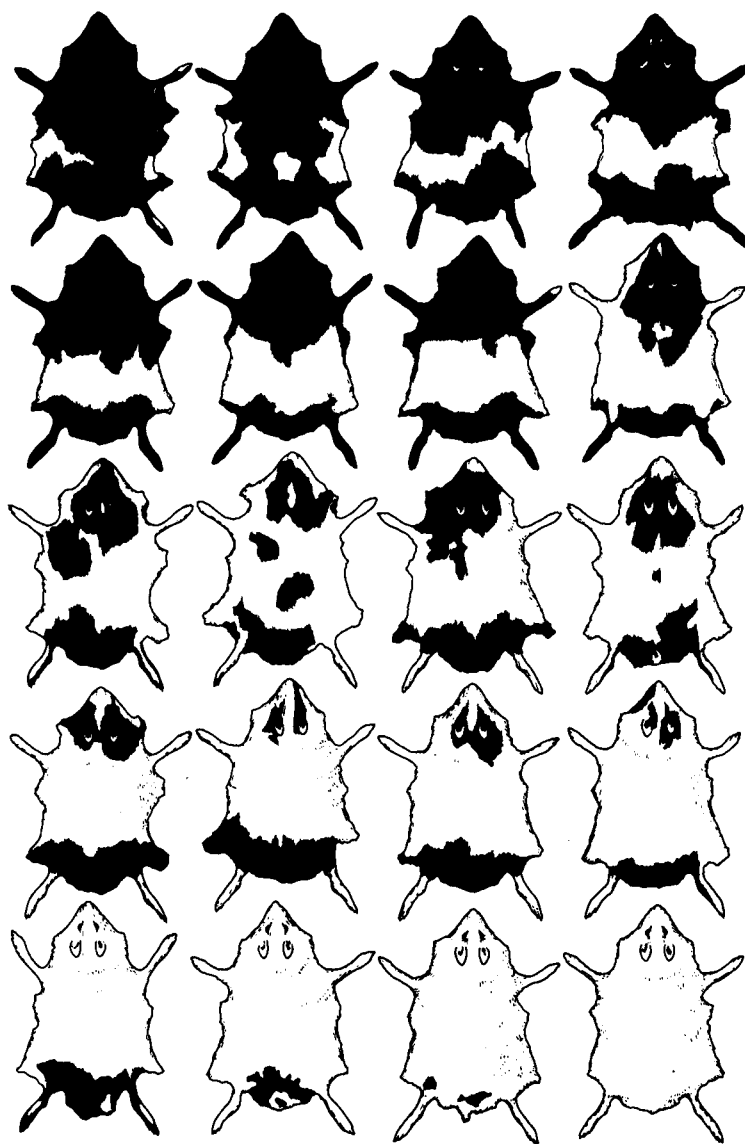


Рис. 19.3. Изменчивость пятнистой окраски в линиях мышей, гомозиготных по гену *s*. Площадь белого участка контролируется другими генами, взаимодействующими с *ss*.

Модификатор – это ген, влияющий на фенотипическое проявление гена другого локуса. У мышей ген пятнистой окраски (*s*) определяет присутствие на брюшке белой шерсти; площадь белого пятна варьирует от очень небольшой до занимающей всю шкурку (рис. 19.3). Методом искусственного отбора можно вывести как линии, где у всех особей белые пятна будут небольшими (линии с низким уровнем проявления признака, или «минус»-линии), так и линии, в которых все особи будут почти

Таблица 19.2. Наследование пятнистой окраски у мышей

Линии	Число особей, у которых белое пятно на спине занимает следующий процент площади:																			
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
«Минус»	7	89	35	2	1															
«Плюс»																	1	9	29	134
«Минус» × «плюс», F ₁				1	1	4	3	3	10	7	9	9	7	1	1					
«Минус» × «плюс», F ₂	1	2	6	15	10	12	14	19	27	29	28	19	34	21	14	2	3	2		
F ₁ × «плюс»												5	16	33	24	15	10	9	12	

целиком белыми (с высоким уровнем проявления признака, или «плюс»-линии). Результаты скрещивания между «плюс»-линией и «минус»-линией приведены в табл. 19.2. F₁ и F₂ имеют промежуточные по сравнению с родительскими значения признака, причем изменчивость F₂ выше, чем F₁. В потомстве от обратного скрещивания F₁ с особями из «плюс»-линии, родительский тип, соответствующий «плюс»-линии, встречается приблизительно с ожидаемой частотой (между 1/18 и 1/16), если предположить, что на проявление белых пятен влияют три или четыре несцепленных гена-модификатора.

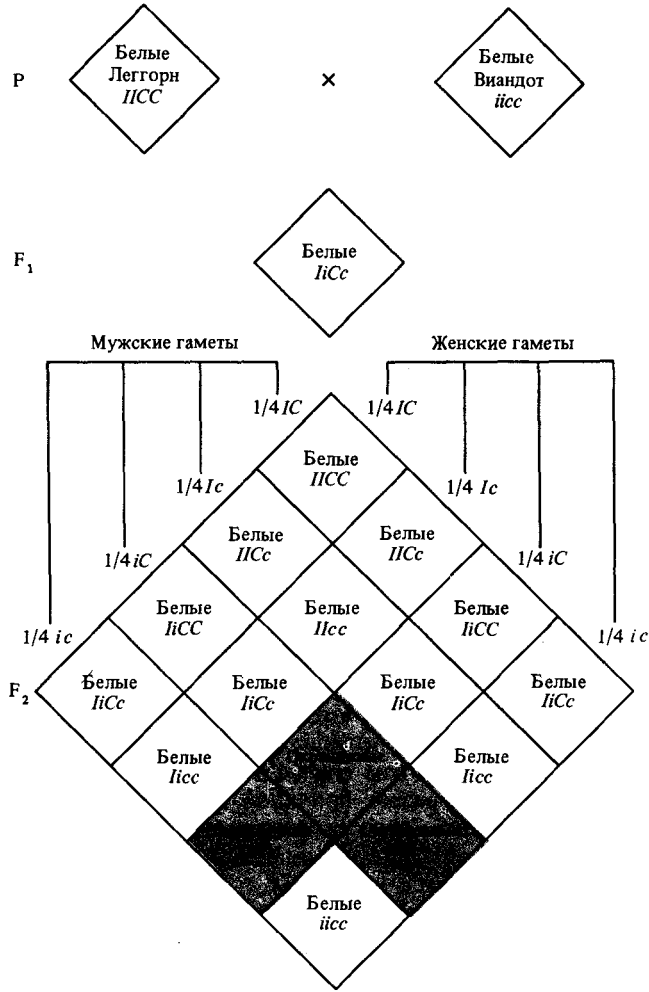
Эпистатический ген — это ген, который подавляет фенотипическое проявление гена другого локуса. Эпистаз аналогичен доминированию, так как в обоих случаях один ген подавляет проявление другого: в одном локусе при доминировании, в разных локусах — при эпистазе. У кур есть ген *I*, который проявляет эпистаз по отношению к гену окраски *C*. Особи, несущие доминантный аллель *I*, будут иметь белое оперение даже в том случае, если они также несут доминантный аллель *C*. Таким образом, причиной белой окраски оперения может являться наличие либо рецессивного гена окраски *c* в гомозиготном состоянии (генотип *cc*), либо доминантного аллеля *I* (генотип *Ii* или *Ii*) эпистатического локуса (рис. 19.4).

Куры породы Леггорн имеют белое оперение, поскольку их генотип — *IiCc*. Куры породы Виандот имеют белое оперение, так как их генотип — *iicc*. Потомки F₁ от скрещивания Леггорн × Виандот имеют генотип *IiCc* и такое же белое оперение (благодаря присутствию

		Генотип по локусу <i>I</i>	
		<i>I</i> или <i>Ii</i>	<i>ii</i>
Генотип по локусу <i>C</i>	<i>cc</i>	Белые	Белые
	<i>Cc</i>	Белые	Окрашенные
	или		
	<i>CC</i>		

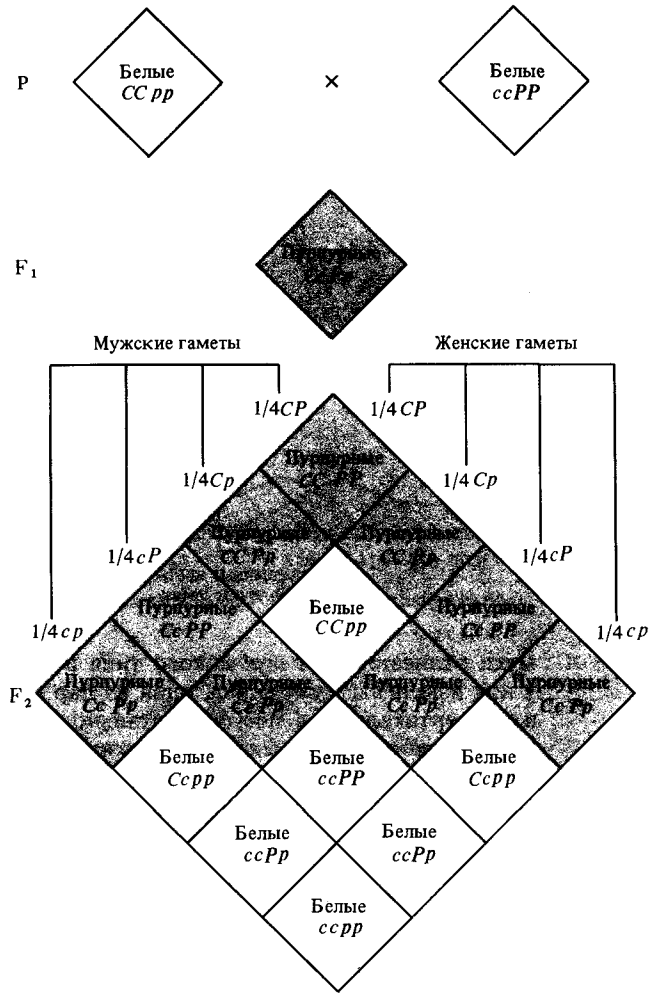
Рис. 19.4. Эпистаз у кур. Наличие окраски перьев связано с присутствием доминантного аллеля *C*, однако это условие не является достаточным. Признак окраски подавляется у особей, несущих доминантный аллель эпистатического локуса *I*.

Рис. 19.5. Соотношение 13:3, полученное в F₂ от скрещивания двух различных линий кур белого цвета. Полученное расщепление обусловлено взаимодействием между геном окраски С и эпистатическим по отношению к нему геном I. Если бы эти гены были сцеплены, частота родительских аллельных комбинаций была бы выше, чем частота рекомбинантных комбинаций. Соответственно изменилось бы и соотношение фенотипов в F₂.



доминантного гена I). Однако потомство F₂ состоит из белых и цветных особей в соотношении 13:3 (рис. 19.5). Это соотношение отклоняется от соотношения 9:3:3:1 [(два доминантных аллеля):(доминантный аллель в одном локусе):(доминантный аллель в другом локусе):(два рецессивных аллеля)], ожидаемого в F₂ от скрещивания особей, гомозиготных по различным аллелям двух локусов разных хромосом. Однако стандартное расщепление происходит, когда два локуса влияют на разные признаки; когда же оба локуса оказывают действие на один и тот же признак, следует ожидать других соотношений. В скрещивании, показанном на рис. 19.5, особи, имеющие два доминантных аллеля в двух локусах (9/16), один доминантный аллель в локусе I (3/16) и рецессивные по обоим локусам (1/16), все имеют белое оперение; окрашенное оперение имеют только особи (3/16), несущие доминантный аллель локуса C, но гомозиготные по рецессивному аллелю другого локуса (ii). Отсюда возникает расщепление 13:3. Скрещивание между двумя растениями гороха, имеющими белые цветы и являющимися

Рис. 19.6. Соотношение 9:7, полученное в F₂ от скрещивания между двумя растениями гороха, имеющими белые цветы. Для появления цветов пурпурной окраски необходимо присутствие доминантного аллеля Р, однако пурпурный цвет не проявляется у растений, гомозиготных по рецессивному аллелю эпистатического локуса С (два этих гена несцеплены).



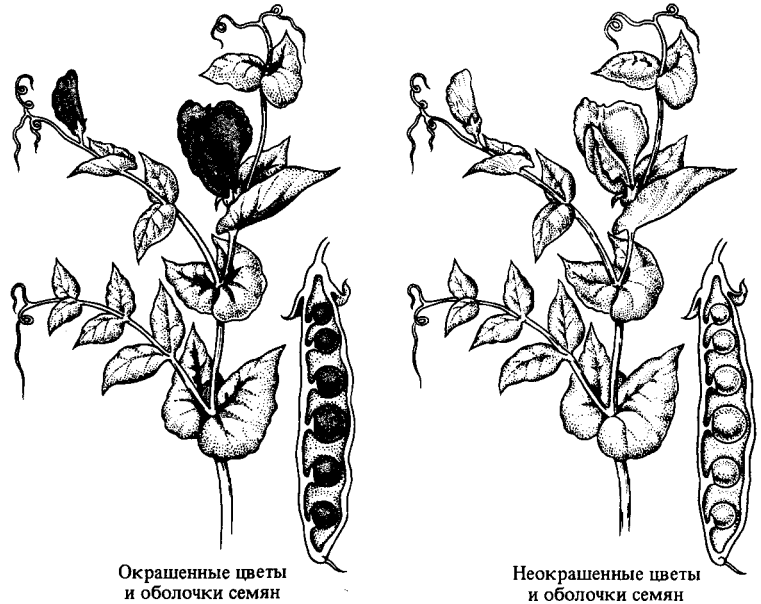
двойными гомозиготами, дает в F₂ расщепление 9:7 (рис. 19.6). Возможны и другие соотношения; они зависят от типа взаимодействия аллелей двух локусов.

Плейотропия

В предыдущем разделе мы рассматривали взаимодействия между локусами, влияющими на один признак. Обратная ситуация, когда один ген оказывает влияние на несколько признаков, называется *плейотропией*. Мендель отмечал, что один из изучаемых им генов воздействовал одновременно на окраску цветов (белая или красная), окраску семян (серая или коричневая) и окраску пазух листьев (наличие или отсутствие красноватых пятен) (рис. 19.7).

Дрозофилы, гомозиготные по аллелю *vg*, имеют зачаточные крылья. Это основное фенотипическое проявление данного гена. Однако такие

Рис. 19.7. Плейотропия в одном из экспериментов Менделя с горохом. Ген, определяющий окраску цветка, оказывает влияние также на окраску семян и пазух листьев.

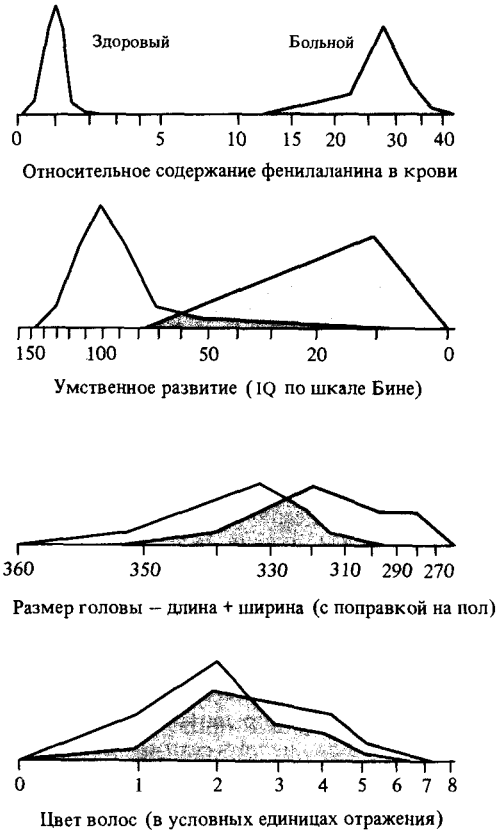


мухи отличаются от мух дикого типа и по многим другим признакам: у них изменены жужжальца, одна из пар дорзальных щетинок расположена вертикально, а не горизонтально, несколько изменены репродуктивные органы, снижена продолжительность жизни и плодовитость и т.д.

Примером плейотропного гена у человека служит рецессивный ген, определяющий фенилкетонурию — болезнь, приводящую к серьезным умственным нарушениям. Люди, гомозиготные по этому гену и не подвергавшиеся лечению, отличаются от нормальных по уровню содержания фенилаланина в крови, по коэффициенту умственного развития (IQ), размеру головы, цвету волос (рис. 19.8). На примере фенилкетонурии можно проследить влияние внешней среды на экспрессивность гена. У новорожденных это заболевание выявляется с помощью простого биохимического теста; в настоящее время скрининг новорожденных на фенилкетонурию в США и Великобритании является стандартной процедурой. Больные дети, которые с рождения находятся на диете с пониженным содержанием фенилаланина, становятся практически здоровыми людьми.

В гл. 10 мы рассматривали гипотезу «один ген — один полипептид». На уровне первичного действия гена каждый ген имеет единственную функцию: кодирование одного полипептида. Плейотропный эффект, таким образом, является отражением интегрированности процессов развития, в которых продукт одного биохимического пути может в конечном итоге оказывать влияние на множество путей развития. В примере с фенилкетонурией нормальный ген кодирует фермент, синтезирующий тирозин из фенилаланина. У страдающих фенилкетонурией этого фермента нет, поэтому у них фенилаланин накапливается в крови. В результате происходит нарушение развития мозга, что приводит к уменьшению размеров головы и снижению IQ. Кроме того, из тирозина образуется

Рис. 19.8. Плейотропия гена, определяющего фенилкетонурию у человека. Один и тот же ген оказывает влияние на несколько фенотипических признаков. В каждом случае левая кривая отражает изменчивость здоровых людей, а правая – изменчивость людей, страдающих фенилкетонурией. (Из Bodmer W.F., Cavalli-Sforza L. L. 1976, *Genetics, Evolution and Man*, Freeman, San Francisco, p. 441.)



пигмент волос; светлый цвет волос у больных фенилкетонурией обусловлен тем, что их организм неспособен синтезировать тирозин из фенилаланина.

Непрерывная изменчивость

У организмов одного и того же вида существует два вида изменчивости. Для некоторых признаков характерна дискретная, или *прерывистая*, изменчивость: по таким признакам особи разделяются на несколько ясно различимых групп. К этим признакам относятся признаки, изученные Менделем, а также многие другие, рассмотренные в этой книге: А, В, АВ и О группы крови у человека, нормальные или зачаточные крылья и белые или красные глаза у дрозофилы, красная или белая окраска цветков львиного зева, способность или неспособность сальмонелл синтезировать индол. Однако для других признаков характерна *непрерывная* изменчивость: эти признаки более или менее непрерывно изменяются в некотором диапазоне.

Рост большинства людей колеблется между 145 и 185 см; и хотя всю популяцию можно разбить на классы, отличающиеся, например, на 5 см, существуют люди и с промежуточными значениями роста. Самки дрозо-

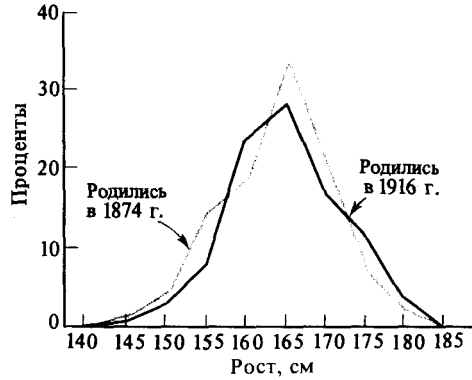


Рис. 19.9 Распределение по росту мужчин-итальянцев 20-летнего возраста. Исследованные мужчины были разделены на классы, различающиеся по росту на 5 см. Средний рост был равен 163,7 см. для мужчин 1874 г. рождения и 166,1 см для мужчин 1916 г. рождения. Каждая выборка

включала более 200 000 человек. Несколько человек были исключены из рассмотрения, поскольку их рост выходил за пределы, приведенные на данном рисунке (Из Bodmer W.F., Cavalli-Sforza L.L., 1976. Genetics, Evolution and Man, Freeman, San Francisco, p. 438.)

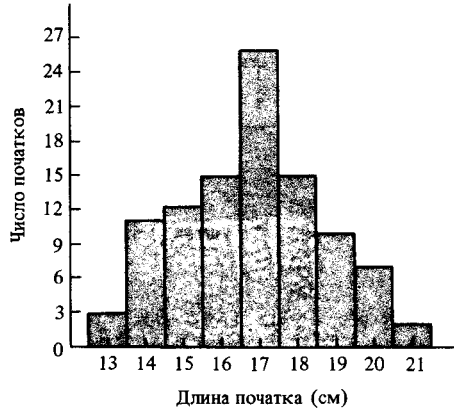
филы откладывают от нескольких штук до нескольких сотен яиц; в початках кукурузы может быть от нескольких семян до сотни. Признаки, проявляющие непрерывную изменчивость, иногда называют *количественными*, или *метрическими*, поскольку разница между особями по этим признакам невелика и требует точных измерений; в отличие от качественных признаков разница между некоторыми велика и видна просто при наблюдении.

Одной из особенностей количественных признаков является то, что распределение их численных значений представляет собой колоколообразную кривую, называемую *нормальным распределением* (рис. 19.9 и 19.10). Некоторые интересные особенности нормального распределения обсуждаются в приложении А.

В начале XX в. перед генетиками встал вопрос, имеет ли количественная изменчивость наследственную природу, и если имеет, то наследуется ли она согласно законам Менделя. Этот вопрос был вскоре решен — количественная изменчивость обусловлена отчасти влиянием внешней среды, а отчасти генетическими различиями, которые наследуются подобно другим генам. В 1903 г. датский генетик Вильгельм Иоганнсен показал, что непрерывная изменчивость имеет частично средовую, частично генетическую природу (впоследствии он ввел понятия фенотипа и генотипа). В 1906 г. математик Джордж Удни Юл высказал предположение, что количественная изменчивость обусловлена действием нескольких локусов, каждый из которых имеет небольшой эффект. Это предположение было через несколько лет экспериментально подтверждено двумя генетиками: шведом Германом Нильсоном-Эле и американцем М. Истом.

Иоганнсен обнаружил, что вес фасоли (*Phaseolus vulgaris*) в коммерческой партии семян варьирует от «легкого» (150 мг) до «тяжелого» (900 мг). Путем самоопыления на протяжении нескольких поколений он

Рис. 19.10. Распределение длины початков у сорта кукурузы, имеющего длинные початки. Это распределение, как и распределение, приведенное на рис. 19.9., является приблизительно колоколообразным; с наибольшей частотой встречаются средние значения, а у обоих краев распределения наблюдается падение частот.



вывел несколько высокогомозиготных линий фасоли. Затем он высаживал семена различного веса, принадлежащие одной линии, и взвешивал семена, полученные от каждого растения. Несмотря на разницу размеров высаженных семян, средний вес бобов у всех растений-потомков был одинаковым (табл. 19.3). Например, средний вес бобов, полученных от семян, весящих 575 мг, был равен 458 мг, что не намного отличается от 445 мг — среднего веса бобов, полученных от семян, весящих только 275 мг. Таким образом, Иоганнсен показал, что изменчивость по весу бобов одного растения обусловлена влиянием среды — как и должно было быть, поскольку каждая линия была гомозиготной и в ней отсутствовала генетическая изменчивость, которая могла бы расщепляться в потомстве.

Кроме того, Иоганнсен установил, что вес бобов определяется генетическими различиями, показав, что бобы из разных линий имеют различные средние размеры. В табл. 19.4 приведен средний вес семян из различных линий. Иоганнсен использовал семена различного веса из каждой линии: например, из линии 7 он использовал семена весом 200, 400 и 600 мг. Все потомство данной линии имело одинаковый средний вес независимо от веса родительских семян, подтверждая таким образом результаты, приведенные в табл. 19.3. Однако средний вес бобов из различных линий (последняя строчка табл. 19.4) был разным; например, средний вес всех семян из линии 19 и 1 был 351 и 642 мг соответственно.

Таблица 19.3. Число бобов различного веса в потомстве семян различного веса, принадлежавших чистой линии № 13 Иоганнсена

Вес родительских семян, мг	Число семян в потомстве, имеющих следующий вес, мг ¹									Средний вес семян в потомстве, мг
	225	275	325	375	425	475	525	575	625	
275		1	5	6	11	4	8	5		445
375	1	2	6	27	43	45	27	11	2	453
475		5	9	18	28	19	21	3		434
575		1	7	17	16	26	17	8	3	458

¹ Класс семян веса 225 мг включает все семена, имеющие вес между 200 и 250 мг; класс семян веса 275 мг включает все семена, имеющие вес между 200 и 300 мг, и т. д.

Таблица 19.4. Средний вес бобов из различных чистых линий Иоганнсена

Вес родительских семян (мг)	Средний вес (мг) в линии №:					
	19	18	13	7	2	1
200		410		459		
300	358	407	475			
400	348	408	450	495	572	
500			451		549	
600			458	482	565	631
700					555	649
Средний вес бобов всего по- томства в одной линии	351	408	454	492	558	642

Окраска семян у пшеницы

Эксперименты Иоганнсена показали, что в определение непрерывной изменчивости вносят вклад как наследственность, так и окружающая среда. Однако в этих экспериментах не было показано, что наследственные различия между чистыми линиями обусловлены действием менделевских генов. Можно было предположить, что количественные признаки передаются по наследству не так, как качественные, что и продолжали утверждать некоторые биологи. В 1909 г. Нильсон-Эле показал, что непрерывная изменчивость признака обусловлена действием нескольких генов, каждый из которых имеет небольшой эффект и наследуется, подчиняясь законам Менделя.

Нильсон-Эле исследовал несколько самоопыляющихся линий пшеницы, цвет колосьев которых изменялся от белого через различные оттенки красного до темно-красного. От скрещивания между белой и светло-красной разновидностями было получено потомство F_1 , имеющее промежуточную по отношению к родителям окраску колосьев. В F_2 соотношение белых, промежуточных и красных колосьев составляло приблизительно 1 : 2 : 1. При скрещивании белой и красной разновидностей цвет колосьев F_1 был светло-красным, а в F_2 наблюдалось 5 типов окраски колосьев, от белого до красного; доля белых колосьев в каждом из нескольких скрещиваний составляла приблизительно 1/16. В скрещиваниях между белой и темно-красной разновидностями потомство F_1 имело промежуточный по сравнению с родителями цвет колосьев; в F_2 было 7 классов окраски, от белого до темно-красного, причем промежуточный тип окраски встречался наиболее часто, а доля белых колосьев была равна приблизительно 1/64 от общего числа колосьев. Нильсон-Эле правильно интерпретировал полученные результаты: окраска колосьев пшеницы обусловлена тремя генами, каждый из которых имеет два аллеля: один аллель определяет красную, а другой — белую окраску, причем каждый из этих генов вносит в образование цвета небольшой вклад.

Обозначим аллели этих трех локусов *Aa*, *Bb* и *Cc*; пусть прописные буквы обозначают аллели, определяющие красный цвет, а строчные — аллели, определяющие белый цвет. Генотипы сортов тогда можно представить следующим образом: *aabbcc* (белый), *AAbbcc* — светло-

Рис. 19.11. Цвет зерен в F_2 от скрещивания растений пшеницы с белой и светло-красной окраской зерен. Аллели, определяющие светло-красный цвет, обозначены прописными буквами. Генотип Aa определяет светло-красный цвет зерен, у растений с генотипом aa окраска зерен промежуточная между белой и светло-красной.

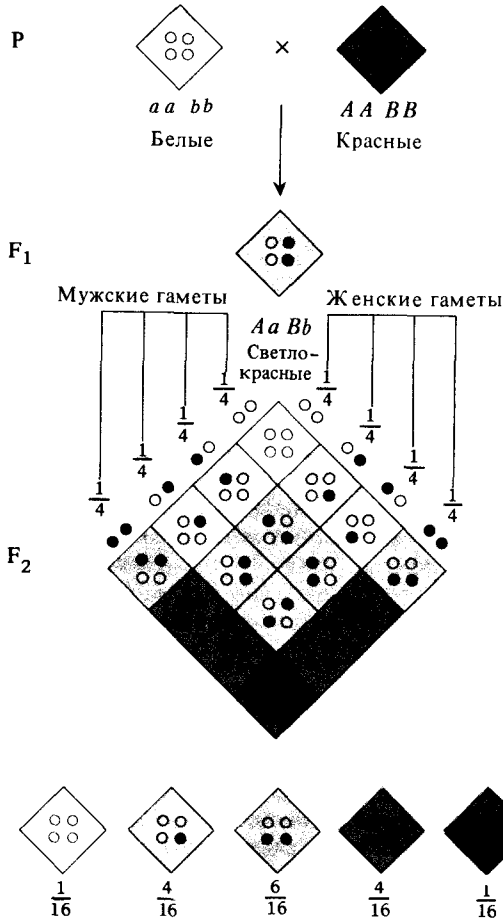
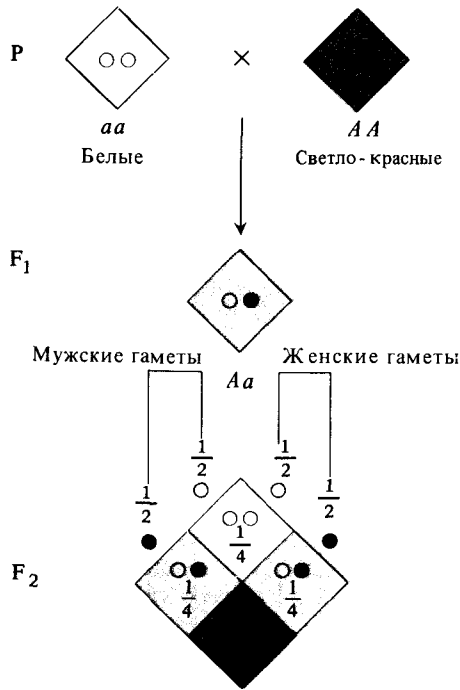


Рис. 19.12. Цвет зерен в F_2 от скрещивания растений пшеницы с белыми и красными зернами. Предполагают, что разница в цвете определяется двумя парами генов. Аллели, обуславливающие красный цвет, обозначены прописными буквами и черными кружками.

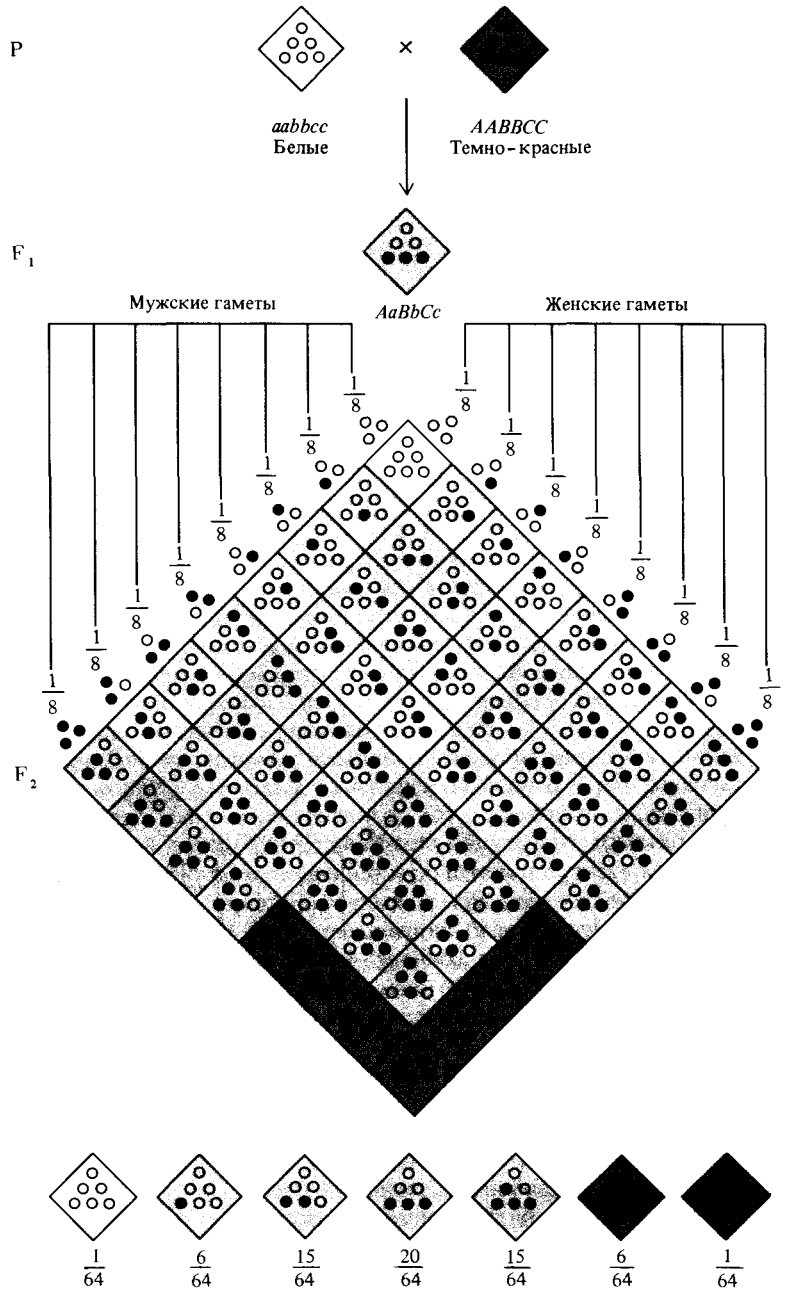


Рис. 19.13. Цвет зерен в F_2 от скрещивания растений пшеницы с белыми и темно-красными зернами. Предполагают, что разница в цвете определяется тремя парами генов. В F_2 наблюдается семь разных фенотипов в соотношении, указанном внизу рисунка. Аллели, определяющие красный цвет, обозначены прописными буквами.

красный, $AABVcc$ – красный, $AABVCC$ – темно-красный. Скрещивание между белым и светло-красным сортом обозначается $aabbcc \times AAbbcc$. Поскольку данные два сорта имеют одинаковый генотип по локусам V и c , мы можем рассматривать только локус A . Результаты скрещивания представлены на рис. 19.11. Потомство F_1 имеет цвет колосьев, промежуточный по отношению к родителям, поскольку оно имеет один ген красной окраски, а другой – белой. В F_2 наблюдается хорошо знакомое нам расщепление 1:2:1.

Результаты скрещивания между белым и красным сортами ($aabbcc \times AABVcc$) представлены на рис. 19.12, где локус C не рассматривается, поскольку сорта по нему не различаются. Если верно предположение, что каждый доминантный аллель (обозначаемый на рисунке в виде черного кружка) вносит одинаковый вклад в определение красного цвета, тогда цвет обусловлен только числом аллелей независимо от локуса, к которому они принадлежат. Поэтому, например генотипы $AAbb$, $aaBV$ и $AaBb$ все определяют светлокрасный цвет колосьев.

Наконец, скрещивание между белым и темно-красным сортами ($aabbcc \times AABVCC$) приведено на рис. 19.13. Как и в двух предыдущих скрещиваниях, колосья F_1 имеют промежуточный цвет. В F_2 наблюдается расщепление по цвету на 7 классов в соотношении 1:6:15:20:15:6:1, что приблизительно соответствует результатам Нильсона-Эле.

Полигенное наследование

Гены, каждый из которых вносит небольшой вклад в изменчивость количественного признака, называются *множественными факторами* или *полигенами* («многими генами»). В примере с колосьями пшеницы действие полигенов *аддитивно*, поскольку оно носит кумулятивный характер. Не всегда все аллели имеют одинаковый эффект на проявление признака – действие одних может быть больше, чем действие других аллелей того же самого или другого локуса. Кроме того, действие полигенов не всегда является аддитивным из-за доминирования или взаимодействия между локусами.

Результаты увеличения количества локусов, влияющих на количественный признак, представлены на рис. 19.14 и в табл. 19.5. Предположим, что в каждом локусе имеются только 2 аллеля, что их действие аддитивно и что эффект аллелей разных локусов одинаков. Кроме того, предположим, что некоторая часть изменчивости обусловлена влиянием внешней среды (нижняя строчка рис. 19.14). В эксперименте Нильсона-Эле влиянием внешней среды можно было пренебречь, поскольку в случае окраски колосьев у пшеницы оно действительно мало. Однако проявление большинства количественных признаков зависит от изменения внешней среды. К примеру, на вес человека, молочность коровы, размер початка кукурузы оказывают влияние негенетические факторы, такие, как питание, климат, болезни.

Принцип непрерывного наследования ясен. Чем больше число локусов, оказывающих кумулятивное влияние на признак, тем ближе к непрерывной будет изменчивость этого признака. Из рис. 19.14 видно, что число генетических классов в F_2 равно числу аллелей плюс 1, т.е. 3 класса в случае одного локуса (двух аллелей), 5 в случае двух локусов,

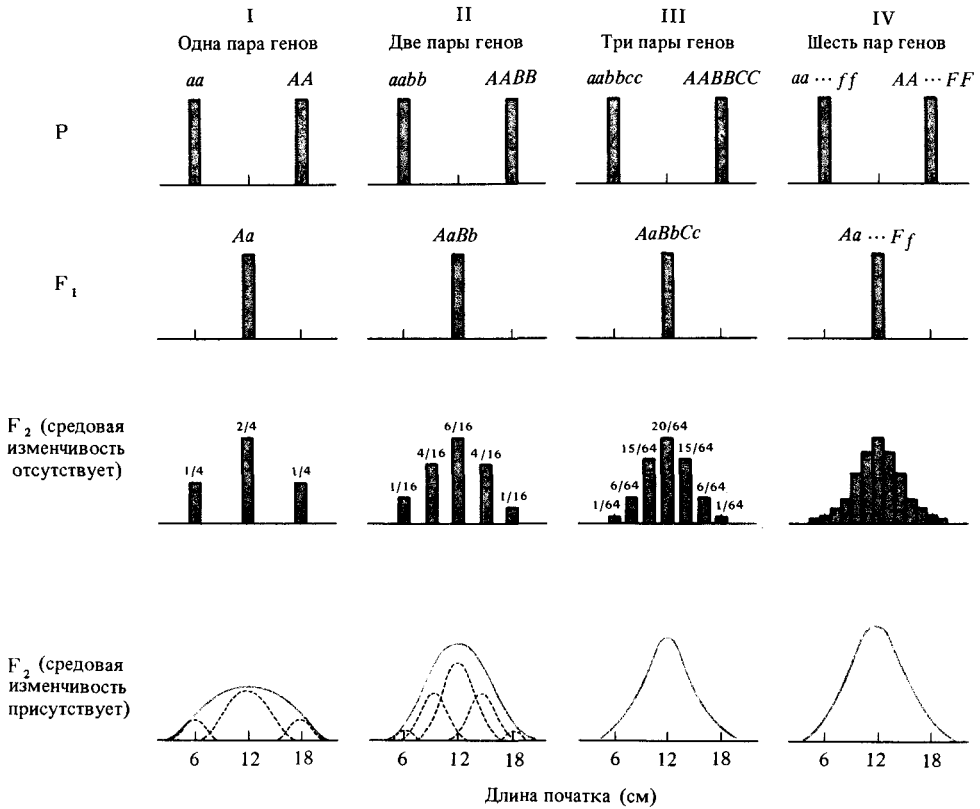


Рис. 19.14. Скрещивания между двумя линиями растений, различающихся по одному, двум, трем и шести локусам. В первых трех рядах показаны ожидаемые распределения у P, в F₁ и F₂ в отсутствие средовой изменчивости. В шестом ряду приведены распределения F₂, как они будут выглядеть, если условия среды вносят вклад в фенотипическую изменчивость. В этом гипотетическом примере в качестве родительских взяты растения с длиной початков 6 см (у родителя с короткими початками) и 18 см (у родителя с длинными початками). В примере I предполагается, что разница в длине обусловлена одной парой генов, так что аллель A в каждом случае приводит к увеличению длины початка на 6 см по сравнению с длиной 6 см, характерной для родительского

растения с короткими початками; в случае II каждый из аллелей A и B приводит к увеличению длины на 3 см; в случае III, аллели A, B, C каждый прибавляет к длине початка 2 см; в случае IV аллели A, B, C... прибавляют каждый 1 см. Доли особей, попадающих в каждый из фенотипических классов в F₂, в случае IV приведены в таблице 19.5. Отметим, что увеличение числа пар генов, определяющих одинаковые различия между двумя родительскими линиями, приводит к уменьшению дисперсии в распределении F₂, поскольку в промежуточные классы попадает большая доля особей. [По Bodmer W.F., Cavalli-Sforza L.L. (1976). Genetics. Evolution and Man, Freeman, San Francisco, p. 446.]

Таблица 19.5. Распределение частот в F_2 от гипотетических скрещиваний двух линий кукурузы, различающихся по длине початка на 12 см, при условии что эта разница определяется одним, двумя, тремя и шестью парами генов с одинаковым аддитивным действием

Пары генов	Частота початков следующей длины (в см) ¹ :													Сумма
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	$\frac{1}{4}$						$\frac{2}{4}$						$\frac{1}{4}$	1
2	$\frac{1}{16}$			$\frac{4}{16}$			$\frac{6}{16}$			$\frac{4}{16}$			$\frac{1}{16}$	1
3	$\frac{1}{64}$		$\frac{6}{64}$		$\frac{15}{64}$		$\frac{20}{64}$		$\frac{15}{64}$		$\frac{6}{64}$		$\frac{1}{64}$	1
6	$\frac{1}{4096}$	$\frac{12}{4096}$	$\frac{66}{4096}$	$\frac{220}{4096}$	$\frac{495}{4096}$	$\frac{792}{4096}$	$\frac{924}{4096}$	$\frac{792}{4096}$	$\frac{495}{4096}$	$\frac{220}{4096}$	$\frac{66}{4096}$	$\frac{12}{4096}$	$\frac{1}{4096}$	66

¹ Дроби — члены биномиального распределения $(1/2 + 1/2)^n$, где n — число аллелей (удвоенное число локусов, или пар генов). Знаменатель дроби равен 2^n .

7 в случае трех локусов, 13 в случае 6 локусов. Влияние факторов внешней среды также приближает распределение к непрерывному.

Распределение количественных признаков приближается к нормальному, поскольку доля генотипов в промежуточных классах выше, чем в крайних. Эта тенденция усиливается при увеличении числа локусов, влияющих на признак. Соответственно с увеличением числа генов уменьшается дисперсия (которая измеряет ширину распределения — см. приложение П. III). Из рис. 19.14 (и табл. 19.5) видно, что доля особей, попадающих в крайние классы, равна $(1/2)^2 = 1/4$ для одного локуса, $(1/2)^4 = 1/16$ для двух локусов, $(1/2)^6 = 1/64$ для трех локусов и т. д.

Присутствие средовой изменчивости приводит к тому, что количественные признаки не распадаются на классы, в точности соответствующие фенотипам. Поэтому часто оказывается невозможным определить число генов, детерминирующих данный количественный признак, при помощи метода, аналогичного тому, который использовал Нильсон-Эле. Однако число генов участвующих в формировании признака, можно определить исходя из доли особей F_2 , имеющих родительский фенотип.

Ист использовал полигенную модель наследования для того, чтобы интерпретировать изменчивость длины цветка *Nicotiana longiflora*. Он скрестил две разновидности, средняя длина цветков которых равнялась 40,5 и 93,3 мм. Как и ожидалось, потомки F_1 имели цветки промежуточной длины. Распределение признака у 444 потомков F_2 было шире по сравнению с F_1 , также согласно ожидаемому, но ни один из цветков F_2 не имел средней длины цветков родителей.

При 4 парах генов ожидаемая доля особей F_2 , попадающих в каждый родительский класс, равна $(1/2)^8 = 1/256$. Поскольку ни один из 444 цветков F_2 не оказался в родительском классе, можно сделать вывод, что различие по длине цветков двух родительских разновидностей определяется более чем четырьмя парами генов (рис. 19.15).

Пигментация кожи у человека варьирует от светлой до темной. Наиболее крайние случаи — европеоиды (белые) и африканские негры. Хотя внутри каждой группы существуют различия по цвету, они малы по

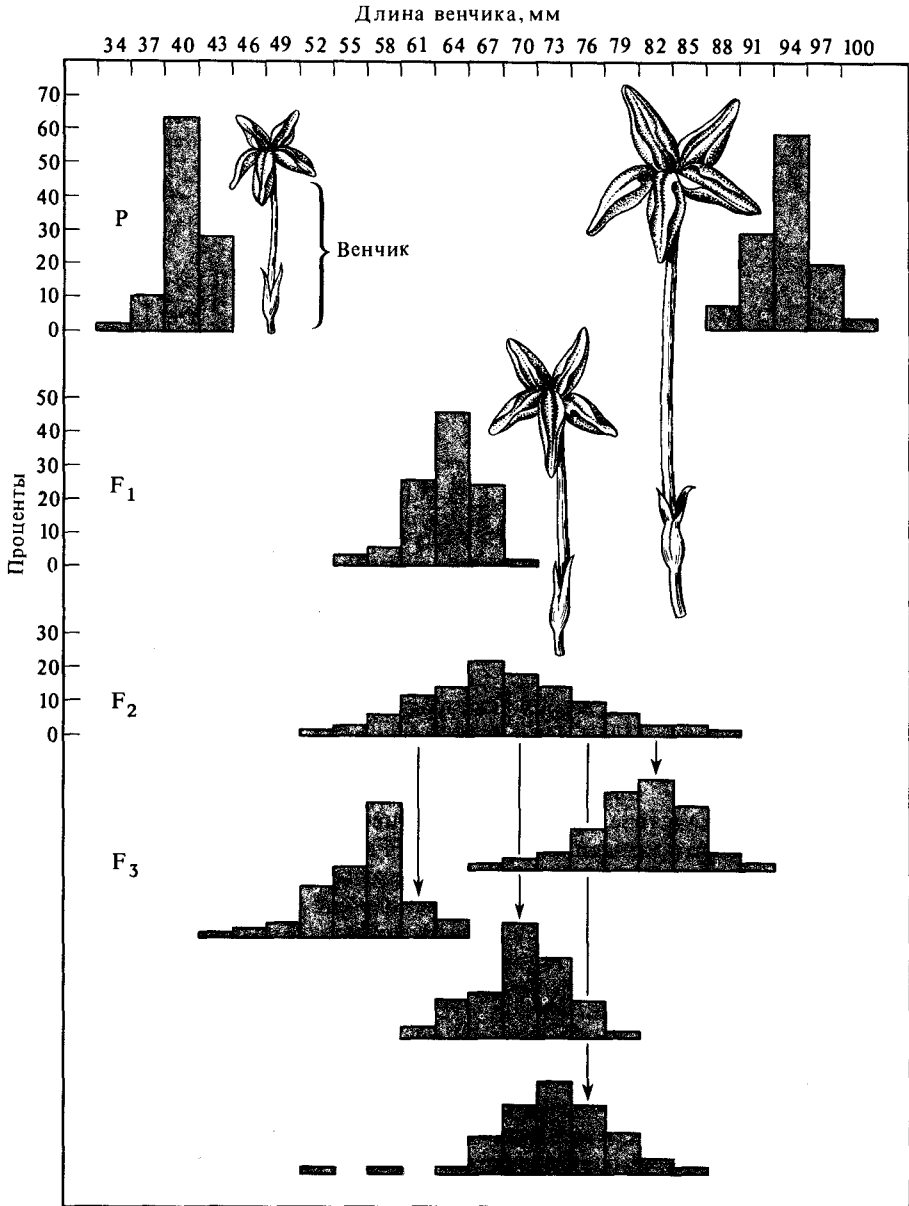


Рис. 19.15. Длина венчика цветка у *Nicotiana longiflora*. Показано распределение долей особей по классам для поколений P, F₁, F₂. Для длины венчика характерна непрерывная изменчивость, однако цветы сгруппированы в классы, отличающиеся по этому признаку на 3 мм. Средние распределений в F₁ и F₂ имеют значения, промежуточные между двумя родительскими линиями, однако в F₂

дисперсия выше. Из распределения потомства в F₃ видно, что часть наблюдаемой в F₂ изменчивости является генетической, поскольку растения F₂, имеющие различную длину венчика, дают в F₃ потомков с различным распределением данного признака. Средняя длина венчика у них приблизительно соответствует длине венчика растений F₂, от которых они получены.

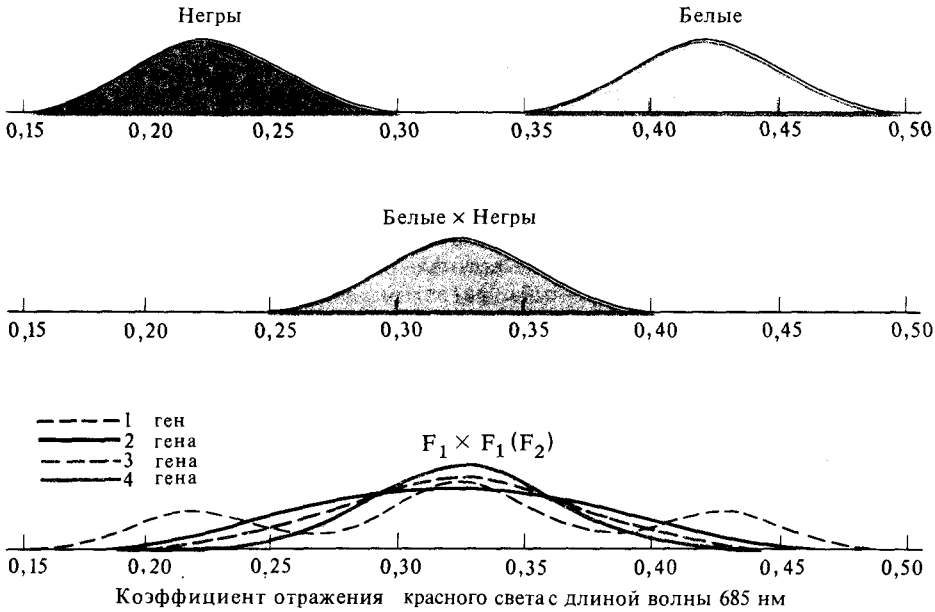


Рис. 19.16. Распределение цвета кожи у негров и людей белой расы. Цвет кожи оценивали по величине отражения света с длиной волны 685 нм. Кривые F_2 представляют собой теоретически ожидаемые на основе различных предположений о числе генов, определяющих различие в цвете кожи между

неграми и белыми. Исследование потомства F_2 выявляет распределения, сходные с распределениями, полученными на основе предположения об участии трех или четырех пар генов. [По *Bodmer W.F., Cavalli-Sforza L.L.* (1976). *Genetics, Evolution and Man*, Freeman, San Francisco.]

сравнению с межгрупповыми различиями. Дети от браков между неграми и белыми имеют промежуточный цвет кожи; от браков между представителями F_1 и от их брака с неграми или белыми рождаются дети, цвет кожи которых варьирует в широких пределах. Распределение по цвету кожи в F_2 и у потомков от обратных скрещиваний приблизительно соответствует ожидаемому, если предположить, что разница в цвете кожи между неграми и белыми определяется тремя или четырьмя парами генов, каждый из которых вносит в проявление признака равный вклад (рис. 19.16).

Генетическая и средовая изменчивость

Чтобы охарактеризовать вклад наследственности и внешней среды в проявление количественных признаков, Фрэнсис Гальтон (1822–1911) использовал термины «природа» (*nature*) и «воспитание» (*nurture*). Обычно присутствуют оба типа влияния – и генетическое, и средовое. Хорошо откормленная мышь будет крупнее голодающей; коэффициент умственного развития (IQ) будет выше у человека, получившего хорошее образование, по сравнению с человеком, выросшим в плохих условиях. Однако изменчивость между особями может быть также обусловлена

генетическими различиями. Представляет интерес, а также практическое значение (например, для селекции растений и животных) отделить генетическое влияние на количественные признаки от средового.

Мы можем задаться вопросом: возможно ли установить, в какой степени данный признак определяется генотипом, а в какой внешней средой? Размышление над этим вопросом приводит нас к выводу о том, что он неправильно сформулирован. Развитие любого признака полностью определяется и генотипом, и условиями внешней среды. Чтобы организм мог развиваться, он должен иметь какой-либо генотип-генетический состав зиготы, однако его развитие может происходить только в какой-либо среде. Невозможно измерить IQ человека, который никогда не соприкасался ни с какой окружающей средой; такие люди просто не существуют.

Вопрос о сравнительной роли наследственности и среды (проблема «природы» и «воспитания») можно правильно задать следующим образом: в какой степени изменчивость между особями по данному количественному признаку обусловлена *генетической изменчивостью* (т.е. генетическими различиями между особями), а в какой степени она обусловлена *средовой изменчивостью* (различиями во внешней среде)? Вскоре станет ясно, почему важно понимать, что именно на этот вопрос, а не на вопрос, сформулированный выше, отвечают генетики, исследуя относительный вклад наследственности и окружающей среды.

Часть фенотипической изменчивости признака, обусловленная генетическими различиями, измеряется *наследуемостью* этого признака, понятие о которой ввел американский генетик Джей Лаш. Будем использовать следующие обозначения:

H – наследуемость;

V_T – общая фенотипическая изменчивость, наблюдаемая по данному признаку;

V_G – доля фенотипической изменчивости, обусловленная генетическими различиями между особями;

V_E – доля фенотипической изменчивости, обусловленная различиями в условиях внешней среды, в которой развивались особи.

Тогда $V_T = V_G + V_E$ и по определению

$$\text{наследуемость} = \frac{\text{генетическая дисперсия}}{\text{фенотипическая дисперсия}}$$

$$H = \frac{V_G}{V_T} = \frac{V_G}{V_G + V_E}$$

Измерение общей фенотипической дисперсии группы особей обычно не является трудной задачей (сначала вычисляется среднее значение величины признака, затем получают и возводят в квадрат разности между каждым значением и средней; средняя квадратов разностей и есть дисперсия – см. приложение П. III). Однако разделение общей дисперсии на генотипическую и средовую компоненты – непростая задача. Для этой цели генетики используют целый ряд методов, которые здесь рассматриваться не будут.

Обоснования близнецового метода и метода массового отбора представлены в дополнениях 19.1 и 19.2. Здесь мы используем данные Иста по длине цветка для иллюстрации понятия наследуемости.

Разновидности *Nicotiana longiflora*, которые использовал Ист, были гомозиготными. Следовательно, дисперсия внутри каждой родительской группы является только средовой. Дисперсия потомства F_1 также целиком средовая; все особи F_1 генетически идентичны (хотя и не гомозиготны), поскольку идентичны гаметы, производимые каждой родительской линией. Средняя дисперсия в каждой из родительских разновидностей и в F_1 равнялась 8,76, что является оценкой средовой дисперсии (V_E) в условиях среды, в которых проводился эксперимент. Таким образом, $V_E = 8,76$.

Гены, унаследованные от родительских линий, в F_2 расщепляются. Следовательно, величина фенотипической дисперсии в F_2 состоит из величин генетической и средовой дисперсий. Общая фенотипическая дисперсия (V_T) потомства F_2 составляет 40,96, т.е. $V_T = 40,96$. Поскольку $V_T = V_G + V_E$,

$$V_G = V_T - V_E = 40,96 - 8,76 = 32,20,$$

отсюда наследуемость длины цветка в эксперименте Иста

$$H = \frac{V_G}{V_T} = \frac{32,20}{40,96} = 0,79.$$

Однако было бы неверным считать, что длина цветка у *N. longiflora* на 79% определяется генами и на 21% — средой. Необходимо еще раз подчеркнуть уже сказанное ранее: наследуемость измеряет не степень, в которой признак определяется генами, а долю фенотипической изменчивости между особями, которая обусловлена генетической изменчивостью.

Необходимо отметить, что взаимодействия между генами (доминирование между аллелями одного локуса или эпистаз между аллелями разных локусов) оказывают влияние на оценки наследуемости, поскольку эти взаимодействия неаддитивны. В более специализированных книгах обсуждается, каким образом учитывать подобные генетические взаимодействия.

Существует, однако, другой тип взаимодействий, влияющих на оценки наследуемости, который очень важен для понимания смысла этих оценок, а именно взаимодействие между генами и средой. Оценки наследуемости справедливы только для тех определенных условий среды, в которых они были получены. В других условиях среды они могут быть совершенно другими. Рассмотрим, к примеру, эксперимент, проиллюстрированный на рис. 2.17. В нормальных условиях среды, используемых для селекции «умных» и «глупых» крыс, генетические различия между двумя линиями приводят к значительным фенотипическим различиям: «умные» крысы находят путь в лабиринте лучше, чем «глупые». Однако разница между линиями исчезает, если крыс выращивать в плохих условиях среды. Этот пример показывает, что генетические различия между линиями в неблагоприятных условиях среды не выражаются как фенотипические, следовательно, наследуемость «сообразительности» выше в нормальной среде по сравнению с неблагоприятной. Дополнительные примеры, показывающие, что оценки наследуемости справедливы только для тех условий среды, в которых они были получены, приведены в следующем разделе.

Несмотря на их ограниченное значение, оценки наследуемости нахо-

Таблица 19.6. Примеры наследуемости некоторых признаков у различных организмов (величина наследуемости определена различными методами)

Признак	Наследуемость
Число белых пятен у коров фризской породы	0,95
Убойный вес крупного рогатого скота	0,85
Высота растений у кукурузы	0,70
Длина корнеплода у редиса	0,65
Вес яиц у кур	0,60
Толщина жирового слоя на спине у свиней	0,55
Вес настрига с овец	0,40
Реакция яичников крыс на гонадотропные гормоны	0,35
Удойность коров	0,30
Урожайность кукурузы	0,25
Яйценоскость кур	0,20
Число отложенных яиц у <i>Drosophila</i>	0,20
Длина початка у кукурузы	0,17
Величина помета у мышей	0,15

дят очень широкое применение в селекции растений и животных, поскольку они отражают степень ответа на искусственный отбор по хозяйственно ценным признакам. Оценки наследуемости также дают представление о роли, которую играют генетические различия в определении фенотипической изменчивости у организмов, живущих в одной и той же среде. Некоторые оценки приспособленности для различных количественных признаков у растений и животных приведены в табл. 19.6, а для человека – в табл. 19.7. Конечно, эти оценки могут быть другими, если проводить их определение в других условиях среды.

Таблица 19.7. Наследуемость некоторых признаков человека, определенная близнецовым методом

Признак	Наследуемость
Телосложение	0,81
Рост в положении сидя	0,76
Вес	0,78
Головной индекс	0,75
Ментальный возраст по Бине	0,65
IQ по Бине	0,68
IQ по Отису	0,80
Вербальные способности	0,68
Арифметические способности	0,12
Способности к естественным наукам	0,34
Способности к истории и литературе	0,45
Орфографические способности	0,53
Скорость постукивания ногой	0,50

Достоинства 1/2-Оценки наследуемости

Один из способов оценки величины наследуемости — это измерение фактической дисперсии в группах родственных особей с известной степенью родства, например близнецов, сибсов, двоюродных братьев и сестер. Существует два вида близнецов: идентичные и неидентичные. Идентичные, или монозиготные, близнецы происходят от одной зиготы, которая в раннем эмбриогенезе делится надвое и развивается в двух генетически идентичных особей. Неидентичные, или дизиготные, близнецы происходят от двух разных зигот, т. е. двух яйцеклеток, оплодотворенных двумя спермиями. Генетическое родство между неидентичными близнецами такое же, как между обычными сибсами, поскольку в обоих случаях зиготы образуются из разных яйцеклеток одной матери и разных спермиев одного отца. Неидентичные близнецы, как и сибсы, имеют в среднем половину общих генов (для каждого гена, полученного сибсом от матери, вероятность, что другой сибс получит тот же ген, равна 1/2; то же самое справедливо для отцовских генов).

Идентичные близнецы всегда бывают одного пола; неидентичные близнецы могут быть самками, самцами или самцом и самкой (в соотношении 1 : 2 : 1). При определении наследуемости группы идентичных близнецов одного пола сравниваются с группами неидентичных близнецов того же пола. Пусть V_i — фенотипическая дисперсия между монозиготными близнецами, а V_f — фенотипическая дисперсия между дизиготными близнецами. Поскольку монозиготные близнецы генетически идентичны, их дисперсия является полностью средовой:

$$V_i = V_E.$$

Дисперсия между неидентичными близнецами является частично средовой, частично генетической. Однако, поскольку половина генов у них общая, их дисперсия

равна 1/2 дисперсии неродственных особей:

$$V_f = 1/2 V_G + V_E.$$

Таким образом, разность между фенотипическими дисперсиями неидентичных и идентичных близнецов оценивает 1/2 генетической дисперсии:

$$V_f - V_i = 1/2 V_G + V_E - V_E = 1/2 V_G.$$

Эта величина, умноженная на 2 и деленная на общую фенотипическую дисперсию, дает оценку наследуемости:

$$H = \frac{2(V_f - V_i)}{V_T} = \frac{2(1/2 V_G)}{V_T} = \frac{V_G}{V_T}.$$

Тем не менее здесь существуют некоторые трудности. Предполагается, что для идентичных и неидентичных близнецов средовая дисперсия одинакова, так как в обоих случаях близнецы рождаются одновременно, они одного пола, живут вместе, ходят в одну школу и т. д. Однако существует возможность того, что в условиях жизни идентичных близнецов больше общего, чем у неидентичных, именно потому, что идентичные близнецы ближе генетически и вследствие этого одинаково реагируют на условия среды.

Другая трудность состоит в том, что близнецы растут в более сходных условиях внешней среды, чем дети, не являющиеся родственниками, поскольку близнецы живут в одной семье, имеют одинаковое культурное окружение и т. д. Эту трудность, также как и проблему, обсуждающуюся в предыдущем разделе, можно в значительной степени преодолеть, изучая близнецов, усыновленных разными семьями. Хотя число таких случаев и ограничено, многие из них были изучены генетически.

В определении величины наследуемости существуют и другие трудности. Здесь мы не будем их касаться, поскольку цель данного обсуждения — рассмотреть основы методологии определения наследуемости близнецовым методом.

Дополнение 19.2. Оценка наследуемости методом массовой селекции

Селекционеры улучшают домашних животных и культурные растения путем массовой селекции, которая является одной из форм искусственного отбора. Этот метод заключается просто в том, что новое поколение получают от особей, наилучших в отношении селектируемого признака. У крупного рогатого скота для размножения используют наиболее удойных коров; в селекции скаковых лошадей потомство получают от самых резвых из них; фермеры оставляют на семена зерна растений пшеницы, имеющих наибольшую урожайность, и т. д. Искусственный отбор практикуется уже более 10 000 лет. Если фенотипическая изменчивость частично обусловлена генетическими различиями между особями, путем массовой селекции можно добиться улучшения генетических характеристик сорта или породы.

Предположим, что рассматриваемый нами признак имеет нормальное распределение, что часто справедливо для количественных признаков. В качестве иллюстрации рассмотрим длину цветка у *Nicotiana longiflora* (рис. 19.5). Введем два следующих параметра: селекционный дифференциал, т. е. разность между сред-

ней величиной признака у особей, отбираемых в качестве родителей, и средней величиной признака в популяции и селекционный сдвиг, т. е. разность между средней в потомстве отобранных родителей и средней в родительском поколении (рис. 19.17).

Если изменчивость целиком обусловлена влиянием окружающей среды, распределение потомков, полученных от отобранных родителей, будет идентично соответствующему распределению в родительской популяции (рис. 19.17, слева). Такую картину наблюдал Иоганнсен, скрещивая семена гороха различного размера из одной и той же инбредной линии (табл. 19.3). С другой стороны, если фенотипическая изменчивость целиком обусловлена генетическими причинами, среднее значение признака в потомстве будет равно средней у отбираемых родителей (рис. 19.17, середина). К этому случаю относится наследование окраски зерен у пшеницы (рис. 19.13). В наиболее часто встречающемся случае изменчивость обусловлена отчасти средовыми, отчасти генетическими причинами. В этом случае будет наблюдаться селекционный сдвиг, однако средняя величина признака в по-

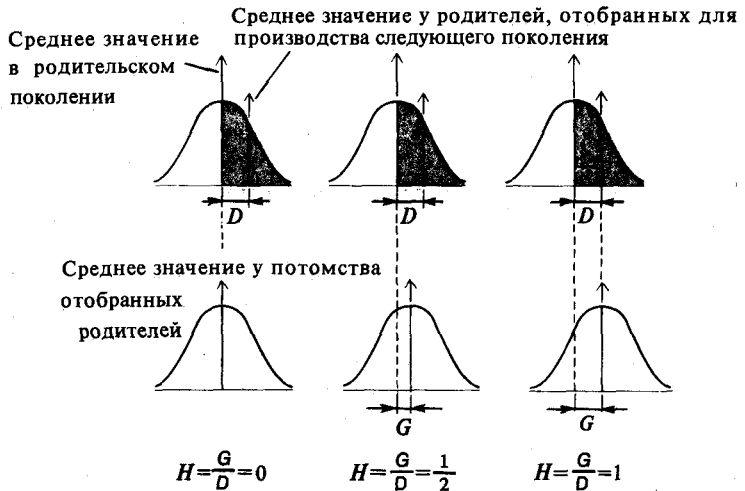


Рис. 19.17. Селекционный дифференциал (D) и селекционный сдвиг (G). Деление величины селекционного сдвига на селекционный дифференциал дает оценку наследуемости (H) в экспериментах по искусственному отбору.

томстве будет ниже, чем у отбираемых родителей. Наследуемость можно оценить как отношение селекционного сдвига к селекционному дифференциалу. Пусть G — селекционный сдвиг, а D — селекционный дифференциал, тогда

$$H = \frac{G}{D}.$$

Например, число абдоминальных щетинок в одной из линий *Drosophila melanogaster* равно 38. Мух со средним числом щетинок, равным 42,8, скрестили для получения следующего поколения;

следовательно, $D = 42,8 - 38 = 4,8$. Среднее число щетинок в потомстве отобранных мух было 40,6; отсюда $G = 40,6 - 38 = 2,6$. Наследуемость оценивается как

$$H = \frac{G}{D} = \frac{2,6}{4,8} = 0,54.$$

Эта оценка хорошо согласуется с оценкой $H = 0,52$, полученной в независимом эксперименте, где полусибсы (имеющие 1/4 общих генов) сравнивались с сибсами (которые имеют 1/2 общих генов).

Наследуемость в различных популяциях

Наследуемость — это характеристика, зависящая от популяции. Она является не мерой какого-либо неизменного свойства организма, а только мерой относительного вклада генетических и средовых различий в фенотипическую изменчивость. Если генетическая изменчивость или средовая изменчивость меняются, оценка наследуемости также изменяется. Следовательно, измерение наследуемости в группе организмов в различных условиях среды или в двух различных популяциях и находящихся в одинаковых условиях среды, скорее всего, приведет к разным результатам. Хотя эти положения уже упоминались выше, здесь мы рассмотрим их более подробно, во-первых, из-за их фундаментального значения и, во-вторых, для понимания концепции наследуемости, поскольку они имеют отношение к усиленно обсуждаемому вопросу о генетической природе межрасовых различий коэффициента умственного развития (IQ) у человека.

Рассмотрим следующие «мысленные эксперименты» с растением *Potentilla glandulosa* (рис. 2.16). Это растение воспроизводится черенкованием, что дает возможность получать группы генетически идентичных особей, полученных из частей одного и того же растения.

Эксперимент 1. Разрежем одно растение на несколько частей и высадим их на склон холма, где растения находятся в совершенно различных условиях относительно качества почвы, освещенности, влажности и т. д. Измерим фенотипическую изменчивость какого-либо признака, например общий вес (биомассу) каждого растения. Поскольку все растения генетически идентичны, вся изменчивость является средовой. Наследуемость признака, измеренная у этих растений, равна поэтому нулю.

Эксперимент 2. Соберем растения в разных местностях, чтобы они были генетически гетерогенными. Посадим маленький черенок каждого растения на экспериментальном участке. Обеспечим каждое растение оптимальными условиями произрастания в отношении почвы, удобрения, влажности, освещенности и т. п. Проследим за тем, чтобы все растения получали одинаковый уход. Теперь определим у этих растений наследуемость того же признака, что и в эксперименте 1. Вероятно, мы

получим очень высокую величину, скажем 0,95, что и следовало ожидать, поскольку растения очень гетерогенны генетически, а условия среды совершенно однородны.

Эксперимент 3. Используем черенки от того же набора растений, что и в эксперименте 2; и поставим эксперимент подобным образом, но посадим растения в плохую почву, не будем применять удобрения и используем минимальные уровни влажности и освещенности. Однако будем следить за тем, чтобы все растения получали одинаковый уход. В конце вегетационного периода растения будут очень мелкими из-за того, что они развивались в неблагоприятных условиях среды. Мы определяем наследуемость и получаем высокую величину, как в эксперименте 2, по тем же самым причинам: растения генетически гетерогенны, а среда однородна.

Эксперимент 4. Используем черенки тех же растений, как и в экспериментах 2 и 3, и посадим их на склоне холма, т. е. в месте их естественно-го обитания. Определяем наследуемость в конце вегетационного периода и получаем промежуточную величину, скажем 0,60. Этот эксперимент лучше, чем три предыдущие, соответствует обычным природным условиям обитания растений и животных, где существует как генотипическая, так и средовая изменчивость.

Эти мысленные эксперименты иллюстрируют уже высказанное утверждение: величина наследуемости измеряет не степень, в которой признак определяется генами, а долю фенотипической изменчивости между особями, которая обусловлена генетической изменчивостью. Оценки изменчивости зависят от популяции; они справедливы только для данной популяции в данных условиях среды. Во всех четырех экспериментах нами измерялась наследуемость одного и того же признака — биомассы растения. Однако величина наследуемости этого признака равна 0 в эксперименте 1; 0,95 в эксперименте 2 и 3 и 0,60 в эксперименте 4. Наследуемость признака различна в разных группах особей (сравните эксперимент 1 с экспериментом 2) или в разных условиях среды (сравните эксперимент 3 с экспериментом 4).

Эти эксперименты иллюстрируют также следующее положение, имеющее практическое значение. Из того факта, что наследуемость признака высока в каждой из двух популяций, не следует, что средняя разница между популяциями в большой степени обусловлена генетическими различиями. Предположим, что большие различия в размерах между растениями из эксперимента 2 и эксперимента 3 в основном обусловлены генетическими причинами, на том основании, что наследуемость в обоих случаях высока. Эта гипотеза явно противоречит здравому смыслу. В обоих экспериментах были использованы черенки одних и тех же растений; различия между двумя исследованными популяциями обусловлены совершенно различными условиями среды, использованной в этих двух экспериментах.

Из двух приведенных выше утверждений следует, что различие между популяциями или даже между особями не обязательно предполагает, что одна из популяций или одна из особей в генетическом отношении лучше других. Та из них, которая «лучше» в одной среде, может быть «хуже» в другой. Эксперимент, результаты которого приведены на рис. 2.16, хорошо иллюстрирует это утверждение: растение из прибрежной зоны было лучшим в саду, расположенном на уровне моря, но худшим на высоте 3000 м.

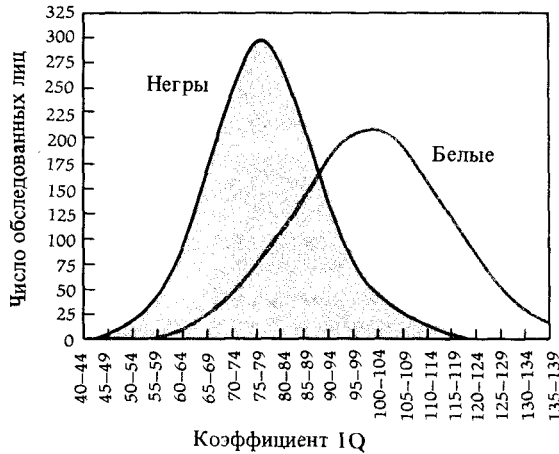


Рис. 19.18. Распределение IQ у негров и белых. Выборка из 1800 детей-негров из школ Алабамы, Флориды, Джорджии, Теннесси и Южной Каролины сравнивается с репрезентативной выборкой белых детей. Среднее значение IQ в этих распределениях составляет 80,7 и 101,8. Данное

различие (21,1 единицы) выше, чем соответствующее различие, полученные в большинстве других подобных исследований. Различие средних значений IQ между неграми и белыми в США часто составляет около 15 единиц.

Многочисленные исследования показали, что средние значения коэффициента умственного развития (IQ) выше у американцев белой расы, чем у американцев-негров (рис. 19.18). В других исследованиях было показано, что наследуемость IQ высока в обеих этих группах населения; ее оценки варьируют от 0,40 до 0,80, однако точная величина не имеет для нас особого значения. Для нас также неважно, насколько точно величина IQ измеряет умственные способности. Некоторые ученые утверждают, что, поскольку наследуемость IQ так высока, различие в среднем уровне IQ между белыми и черными в основном обусловлено генетическими причинами. Это утверждение несправедливо. Высокая наследуемость IQ внутри популяций белых и внутри популяций черных ничего не говорит о причине различий между этими популяциями. Вспомним, что наследуемость была высока и в эксперименте 3, и в эксперименте 2, а уровень признака был в эксперименте 2 гораздо выше, чем в эксперименте 3. Несмотря на это, данное различие между растениями вовсе не было генетически обусловлено; обе группы растений были генетически идентичными, а разница между ними объяснялась различными условиями среды.

Популяции человека генетически отличаются друг от друга. Внутри любой человеческой популяции также присутствует значительная генетическая гетерогенность. Эти различия оказывают влияние как на IQ, так и на множество других признаков. Однако изучение наследуемости не позволяет нам сделать вывод о том, что одна популяция генетически «лучше» других по отношению к IQ. Более того, оценки IQ могут резко изменяться при значительном изменении культурного окружения.

Литература

- Bodmer W.F., Cavalli-Sforza L.L. (1970). Intelligence and race, *Scientific American*, October, pp. 19–29.
- Bodmer W.F., Cavalli-Sforza L.L. 1976. *Genetica, Evolution, and Man*, W.H. Freeman, San Francisco.
- East E.M. (1916). Studies on size inheritance in *Nicotiana*, *Genetics*, 1, 164–176.
- Falconer D.S., 1981. *Introduction to Quantitative Genetics*, 2nd ed., Longman, London.
- Johannsen W., 1903. *Über Erblichkeit in Populationen und in reinen Linien*, G. Fischer, Jena.
- Lewontin R.C., 1970. Race and Intelligence, *Bulletin of the Atomic Scientists*, March, pp. 2–8.
- Lush J.L., 1945. *Animal Breeding Plants*, Iowa State University Press, Ames.
- Matcher K. (1943). Polygenic Inheritance and natural selection, *Biol. Rev.*, 18, 32–64.
- Mather K., Jinks J.L., 1971. *Biometrical Genetics*, Chapman, London.
- Nilsson-Ehle H. (1909). Kreuzungsuntersuchungen an Hafer und Weizen, *Lunds Univ. Aarskr. N.F. Atd.*, Ser. 2, Vol. 5, No. 2, pp. 1–122.
- Pollak E., Kempthorne O., Bailey J.B., Jr., eds., 1977. *Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics*, Iowa State University, Ames.
- Thompson J.N., Jr., Thoday J.M., eds., 1979. *Quantitative Genetic Variation*, Academic Press, New York.

Ключевые слова и понятия

Гены-модификаторы
Дисперсия
Количественный признак
Наследуемость
Непрерывная изменчивость
Нормальное распределение

Пенетрантность
Плейотропия
Полигенное наследование
Экспрессивность
Эпистатические гены

Задачи

19.1. Дайте определение различным видам генетических взаимодействий. В чем разница между эпистазом и доминированием?

19.2. Окраска шерсти «агути», характерная для мышей, крыс, морских свинок, белок и других грызунов, обусловлена тем, что каждый волос у таких животных имеет черную окраску, а около кончика узкое желтое кольцо. Окраска типа «агути» определяется доминантными аллелями двух локусов, один из которых (*C*) необходим для проявления любого цвета, а другой (*A*) определяет наличие желтого кольца на черном волосе. Особи, гомозиготные по рецессивному аллелю *c*, всегда являются альбиносами. Особи, имеющие

доминантный аллель *C*, но гомозиготные по рецессивному аллелю *a*, имеют черную окраску. Предположим, что мы скрестили черную мышь генотипа *CCaa* с мышью-альбиносом генотипа *ccAA*. Какой фенотип будет у потомства F_1 ? Какого цвета потомки и в каких соотношениях появятся в F_2 ?

19.3. У крыс существует взаимодействие между генами окраски (*Aa* и *Rr*), в результате которого появляются следующие фенотипы:

A-R- : серый
A-rr : желтый
aaR- : черный
aa rr : кремовый

Однако для проявления всех этих фенотипов необходимо присутствие гена окраски C , поскольку особи cc – альбиносы. Данные три пары генов наследуются независимо друг от друга. Потомство F_1 от скрещивания четырех различных линий мышей-альбиносов с гомозиготной серой линией было серым. В потомстве F_2 наблюдалось следующее расщепление:

Линия альбиносов	Потомки F_2				
	Серые	Желтые	Черные	Кремовые	Альбиносы
1	48	0	0	0	16
2	104	33	0	0	44
3	174	0	65	0	80
4	292	87	88	32	171

Каков вероятный генотип каждой линии альбиносов? Методом χ^2 проверьте соответствие наблюдаемых данных с результатами, предсказанными на основе вашего объяснения.

19.4. Если у кур гены, определяющие наличие розовидного гребня (R), и гороховидного гребня (P) присутствуют вместе, это приводит к появлению ореховидного гребня. Особи, гомозиготные по рецессивным аллелям обоих локусов ($rrpp$), имеют обычный гребень. Оба гена наследуются независимо. Определите расщепление фенотипов, ожидаемое в потомстве от следующих скрещиваний:

(а) $RRPp$ (ореховидный) \times $rrPp$ (гороховидный);

(б) $RrPp$ (ореховидный) \times $RrPp$ (ореховидный);

(в) $RrPp$ (ореховидный) \times $Rrpp$ (розовидный);

(г) $Rrpp$ (розовидный) \times $rrPp$ (гороховидный).

Каков генотип родителей, один из которых имеет ореховидный гребень, а другой – простой, если в их потомстве F_1 наблюдается расщепление 1/4 простых : 1/4 розовидных : 1/4 гороховидных и 1/4 ореховидных?

19.5. В Северной Ирландии было изучено несколько семей, в которых наблюдались случаи глухонмоты. В одной из

таких семей у здоровых родителей родилось 8 детей, 4 из которых (два сына и две дочери) были глухонемыми. В другой семье у глухонемых родителей было три дочери и один сын, все глухонемые. Глухонемой сын из первой семьи женился на глухонемой дочери из второй семьи; все их дети (дочь и три сына) также были глухонемыми. Однако, когда один из этих глухонемых сыновей женился на глухонемой девушке, не состоящей в родстве с этой семьей, их шестеро детей (все сыновья) оказались здоровыми. Каков возможный способ наследования глухонмоты?

19.6. Известно, что дети, гомозиготные по гену фенилкетонурии (pp), могут развиваться нормально, если их растят на диете с низким содержанием фенилаланина. От браков таких людей обычно рождаются нормальные дети, гетерозиготные по гену p (Pp), поскольку их супруги обычно гомозиготны по гену P (PP). Однако, описаны случаи, когда у женщины с генотипом pp , выросшей на диете и вышедшей замуж за нормального гомозиготного мужчину (PP), все дети являются умственно отсталыми. Как это можно объяснить?

19.7. У японского растения *Pharbitis nil* скрещивание между двумя линиями, имеющими пурпурные цветки, дает потомство с цветками только синего цвета. Однако потомство от скрещиваний растений, принадлежащих к одной и той же линии с пурпурными цветками, также имеет пурпурные цветы. Как объяснить эти результаты?

19.8. Наличие окраски щитка (скутеллума) у кукурузы определяется присутствием любых двух из следующих трех генов: S_2 , S_3 и S_4 . Каково будет соотношение растений с окрашенными и неокрашенными щитками в F_1 следующих скрещиваний:

(а) $S_2S_2s_3s_3s_4s_4$ (неокрашенный) \times $s_2s_2S_3S_3s_4s_4$ (неокрашенный)

(б) $S_2S_2s_3s_3S_4S_4$ (окрашенный) \times $s_2s_2S_3S_3S_4S_4$ (окрашенный)

19.9. Искусственный отбор через некоторое число поколений часто становится неэффективным. Если скрестить между со-

бой две независимо селекционируемые линии, в которых отбор потерял эффективность, и вести отбор в потомстве от такого скрещивания, в последующих поколениях отбор может оказаться эффективным. Как объяснить этот результат?

19.10. При скрещивании двух чистых родительских линий, различающихся по количественному признаку, изменчивость потомства F_1 обычно не отличается от родительской, тогда как в F_2 изменчивость обычно значительно выше. С чем это связано?

19.11. Предположим, что в двух высокоинбредных линиях овса урожай составляет 4 и 10 г на растение соответственно. Эти две линии скрещивают друг с другом; в потомстве F_1 производится самоопыление. Приблизительно у $1/64$ растений F_2 урожай равен 10 г на растение. Сколько генов контролирует разницу между исходными инбредными линиями?

19.12. При самоопылении растений F_2 из предыдущей задачи в F_3 получены семейства, заметно различающиеся по своей изменчивости. В некоторых из них уровень изменчивости так же низок, как и в исходных линиях, в других изменчивость несколько выше, а в третьих уровень изменчивости был равен таковому в F_2 . Как бы вы это объяснили? Можно ли ожидать, что некоторые семейства будут превосходить по своей изменчивости растений F_2 ? Почему?

19.13. Предположим, что разница между растениями кукурузы с початками длиной 6 и 18 см определяется (1) двумя парами генов; (2) тремя парами генов; (3) четырьмя парами генов. Предположим также, что в каждом случае эти гены имеют равный и кумулятивный эффект на длину початка и наследуются независимо друг от друга. Скрещиваются растение с длинными початками и растение с короткими початками; затем производится обратное скрещивание F_1 с родительским растением с длинными початками. Какова доля растений с початками длиной 18 см в потомстве в каждом из трех случаев наследования?

19.14. Нильсон-Эле скрестил между со-

бой две линии овса: одну с белыми, другую с черными зернами. В F_1 окраска зерен была черной. F_2 состояло из следующих 560 растений: 418 с черными зернами, 106 с серыми и 36 с белыми зернами. Как объяснить в этом случае наследование окраски зерна?

19.15. У *Drosophila melanogaster* в скрещивании между мухами с крыльями *Dichaete* (*Dichaete* × *Dichaete*) $2/3$ потомков имеют крылья *Dichaete*, а $1/3$ — нормальные крылья. В скрещивании *Dichaete* × нормальные мухи наблюдается расщепление $1/2$ *Dichaete*: $1/2$ нормальных. Объясните.

19.16. Для одной из разновидностей культурной земляники были получены следующие оценки наследуемости: (1) урожайность — 0,48; (2) плотность ягоды — 0,46; (3) размер ягоды — 0,20. Средние и стандартные отклонения в родительском поколении составляли (1) 380 ± 91 г; (2) $4,4 \pm 0,6$ (методика и единицы измерения плотности здесь не представляют для нас интереса); (3) $11,3 \pm 3,0$ г. Предположим, что мы получаем новое поколение, используя в качестве родителей растения, значения признаков у которых превышают средние на удвоенную величину стандартного отклонения. Каков будет ожидаемый прирост каждого из трех признаков через одно поколение отбора?

19.17. Средний вес 6-недельных мышей в лабораторной популяции составляет 21,5 г. Два типа мышей используются для получения следующего потомства: (1) мыши с большим весом (средний вес — 27,5 г); (2) мыши с малым весом (средний вес — 15,5 г). Средний вес потомства в возрасте 6 недель равен: (1) 22,7 г; (2) 18,1 г. Вычислите наследуемость веса в каждом из типов потомства. Приведите по крайней мере одно из объяснений того факта, что наследуемость в одном из этих случаев больше, чем в другом.

19.18. При оценке наследуемости близнецовым методом, который обсуждается в дополнении 19.1, необходимо знать общую фенотипическую дисперсию признака в популяции. Когда известна только дисперсия признака между близнецами, наследуемость можно определить по сле-

дующей формуле:

$$H = \frac{V_f - V_i}{V_f},$$

где V_f и V_i – фенотипическая дисперсия между неидентичными и идентичными близнецами соответственно. Величины V_f и V_i вычисляются как среднее различий между двумя членами пары близнецов.

Получены следующие различия по IQ между двумя близнецами из 10 идентичных пар и 10 неидентичных пар (все 20 пар близнецов мужского пола и в каждом случае выросли вместе):

Пара	Идентичные близнецы	Неидентичные близнецы
1	4	12
2	7	4
3	5	9
4	3	7
5	6	7
6	1	11
7	9	13
8	7	10
9	3	9
10	7	9

Оцените на основе этих данных наследуемость IQ.

Оглавление

10. Генетические функции 7

- Преформация и эпигенез 7
- Генетическая информация 9
- «Врожденные ошибки метаболизма» по Гэрроду 10
- Гипотеза «один ген – один фермент» 11
- Биохимические превращения при метаболизме 12
- Гены и белки 18
- Структура белков 20
- Внутригенная комплементация 30

11. Передача информации в клетках 34

- Общий перенос информации 35
- Специализированный перенос информации 49
- Запрещенные (неизвестные) варианты переноса информации 51
- Коллинеарность генов и полипептидов (прокариоты) 52
- Коллинеарность генов и полипептидов (эукариоты) 55
- Центральная догма 62

12. Генетический код 67

- Генетическое изучение кода 70
- Генетическое подтверждение существования терминаторных кодонов 74
- Расшифровка кода с помощью биохимических методов 76
- Особенности построения генетического кода 80
- Терминаторные кодоны 82
- Организация нуклеотидной последовательности фага φX174 83
- Генетические факторы, влияющие на трансляцию кода 91
- Генетический код митохондрий 95

13 Генетический контроль синтеза ДНК 103

- Полимеризация ДНК в репликативной вилке 104
- Генетический анализ репликации ДНК 109
- Биохимический анализ репликации ДНК 112
- Инициация синтеза ДНК в точке начала репликации 118
- Синтез ДНК у эукариот 120
- Точность синтеза ДНК 121
- Исправление ошибок репликации и репарация ДНК 122

14 Рекомбинация 131

- Общая рекомбинация 132
- Консервативный разрыв и воссоединение 134
- Генетический анализ рекомбинации 136
- Высокая отрицательная интерференция и генная конверсия 139
- Образование структур Холлидея у эукариот 148
- Сайт-специфическая и незаконная рекомбинация 152
- Интеграция и эксцизия профага λ 153
- Подвижные генетические элементы 158
- Общая картина метаболизма ДНК 162

15 Регуляция экспрессии генов у прокариот 167

- Участки ДНК, контролирующие транскрипцию 170
- Lac*-оперон 173
- Катаболитная репрессия 181
- Бактериофаг λ 183
- Опероны биосинтеза аминокислот 194
- Регуляция экспрессии генов с помощью сайт-специфической рекомбинации 199

16 Регуляция экспрессии генов у эукариот 206

- Участки ДНК, контролирующие транскрипцию 208
- Сплайсинг гРНК-транскриптов 216
- Транскрипция и структура хроматина 220
- Согласованная регуляция экспрессии генов 224
- Метилирование ДНК 226
- Регуляция гемоглобиновых генов в ходе развития организма 230
- Контроль экспрессии генов, основанный на перестройках ДНК 234
- Заключение 244

17 Генетический анализ развития 248

- Дифференциальная экспрессия генов 248
- Клеточная детерминация 252
- Карта зачатков бластодермы дрозофилы 252
- Эмбриогенез мыши 258
- Генетический анализ развития 259
- Мутации, затрагивающие эмбриогенез у мыши 260
- Мутации с материнским эффектом у дрозофилы 262
- Гомеозисные мутации у *Drosophila* 266
- Определение пола и дозовая компенсация 274
- Определение пола у млекопитающих 277
- Механизмы генетической регуляции 283

18 Генетика соматических клеток: картирование генома человека 290

- Геном человека 293
- Гибридизация клеток в культуре 294

Отбор клеточных гибридов с помощью метода НАТ	298
Внутрихромосомное картирование генов с помощью хромосомных перестроек	301
Микроклетки и изолированные хромосомы	304
Картирование генов с помощью ДНК-зондов	308
Гибридизация <i>in situ</i>	313
Генетическая карта человека	316
Трансфекция и наследственные болезни	321
Онкогены	322
Трансфекция генов и рак	324
Генетика соматических клеток растений	329
19 Количественные признаки	334
Пенетрантность и экспрессивность	335
Гены-модификаторы и гены, имеющие эпистатическое действие	337
Плейотропия	341
Непрерывная изменчивость	343
Окраска семян у пшеницы	346
Полигенное наследование	349
Генетическая и средовая изменчивость	353
Наследуемость в различных популяциях	359

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

Франциско Айала, Джон Кайгер

СОВРЕМЕННАЯ ГЕНЕТИКА

В ТРЕХ ТОМАХ

Том 2

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев

Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова

Научный редактор М. Р. Погосбекова

Мл. редактор О. В. Шагинян

Художник Л. М. Муратова

Художественный редактор А. Я. Мусин

Технический редактор М. А. Страшнова

Корректор В. И. Киселева

ИБ № 6145

Сдано в набор 23.12.86. Подписано к печати 19.11.87. Формат 70 × 100¹/₁₆. Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 11,50 бум.л. Усл.печ.л. 29,90. Усл.кр.-отт. 60,45. Уч.изд.л. 28,58. Изд. № 4/4952. Тираж 15000 экз. Зак. 1355. Цена 2 р. 60 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли.

г. Можайск, ул. Мира, 93.
