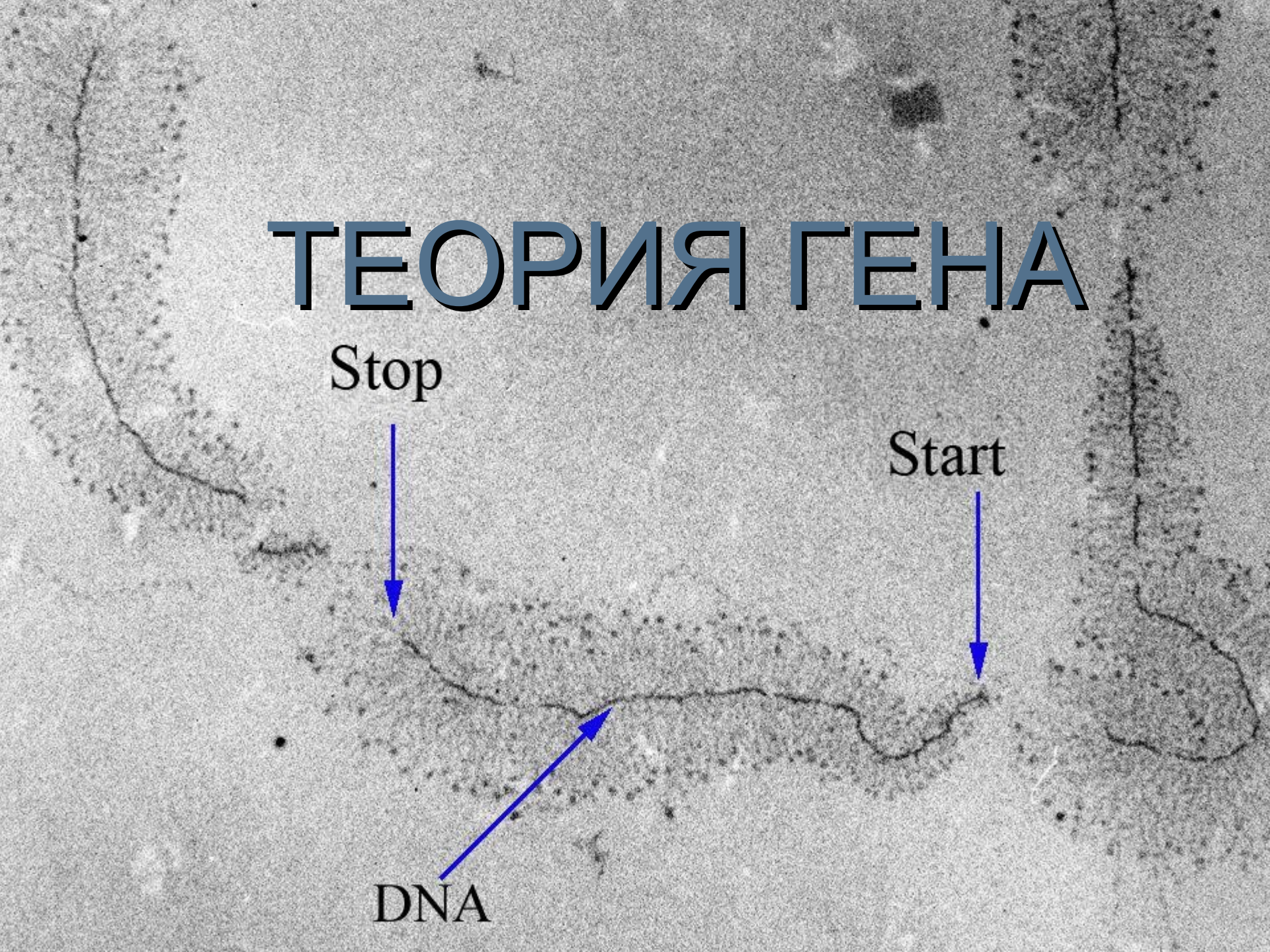


ТЕОРИЯ ГЕНА

Stop

Start

DNA



«Ген» и «аллель» - два самых важных слова в генетике, хотя бы уже по одному тому, что в течение долгого времени все снова и снова вставал вопрос, что, собственно, они означают. История генетики в значительной своей части есть история попыток ответить на этот вопрос.

У. Хейс, «Генетика бактерий и бактериофагов», 1965

Определение понятия ген

- «Ген – структурная единица генетической информации, далее неделимая в функциональном отношении. Ген представлен участком молекулы ДНК (реже РНК)» (С.Г.Инге-Вечтомов, «Генетика с основами селекции», 1989).
- Термин ген может иметь два определения в зависимости от того, на каком уровне он изучается:
- Детерминант наследуемого признака организма.
- Последовательность ДНК (РНК), кодирующая специфический полипептид или молекулу РНК определенного типа.

В течение более 100 лет изучения представления о гене
менялись многократно.

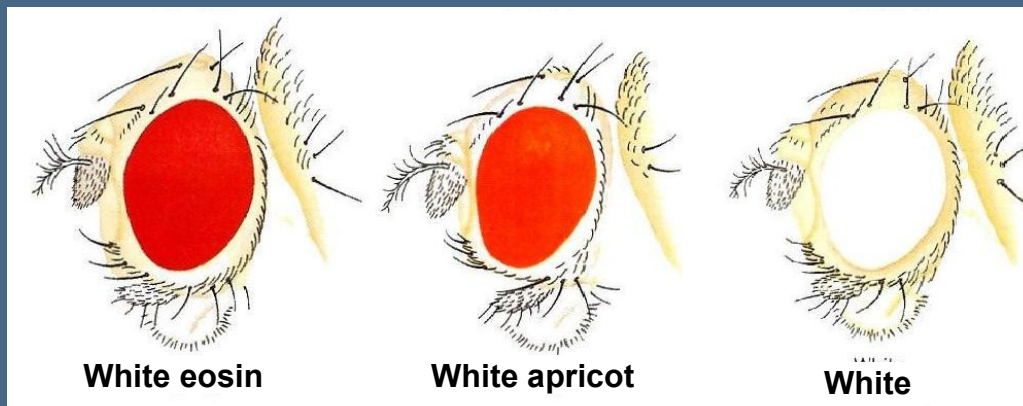
- Важным этапом в развитии теории гена было открытие Т.Х.Морганом и его сотрудниками явления множественного аллелизма.

- Это открытие поставило важную проблему: как различать одинаковые по фенотипу мутации, относящиеся к одному гену (аллельные) или к разным генам, контролирующим один признак (неаллельные).

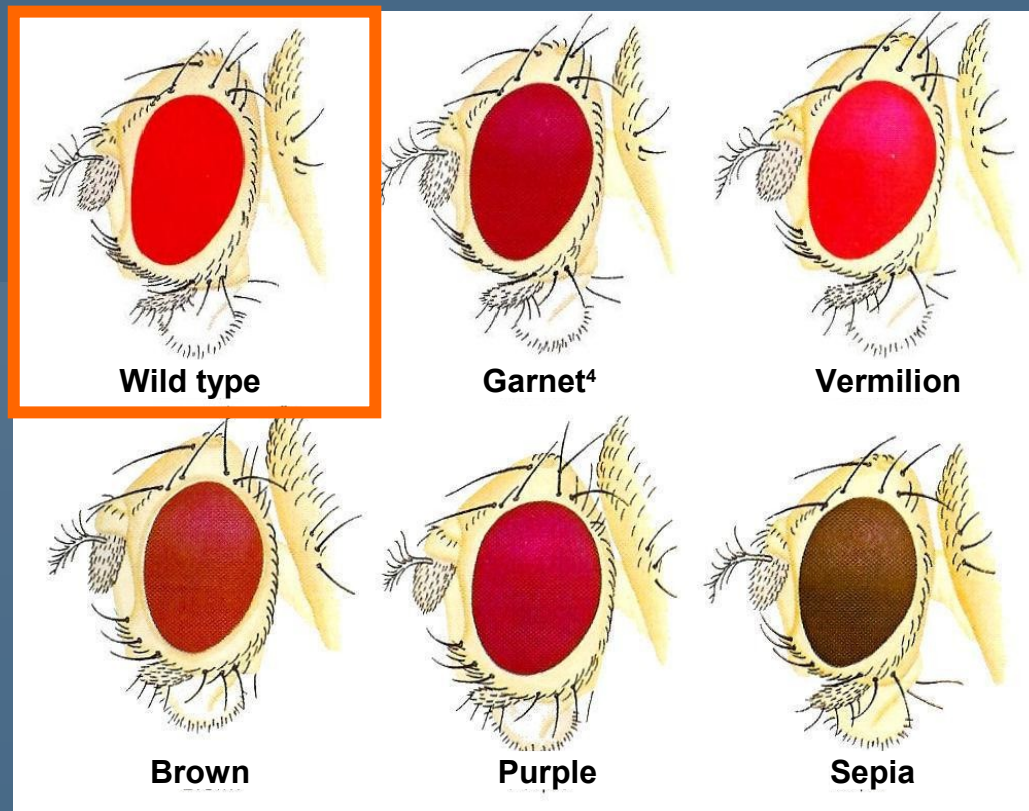
- Для решения этой проблемы Морган предложил два теста на аллелизм: тест на комплементарность (функциональный тест) и рекомбинационный тест.

Примеры мутаций по окраске глаз у *Drosophila*

Мутации в гене *white* (*w*)

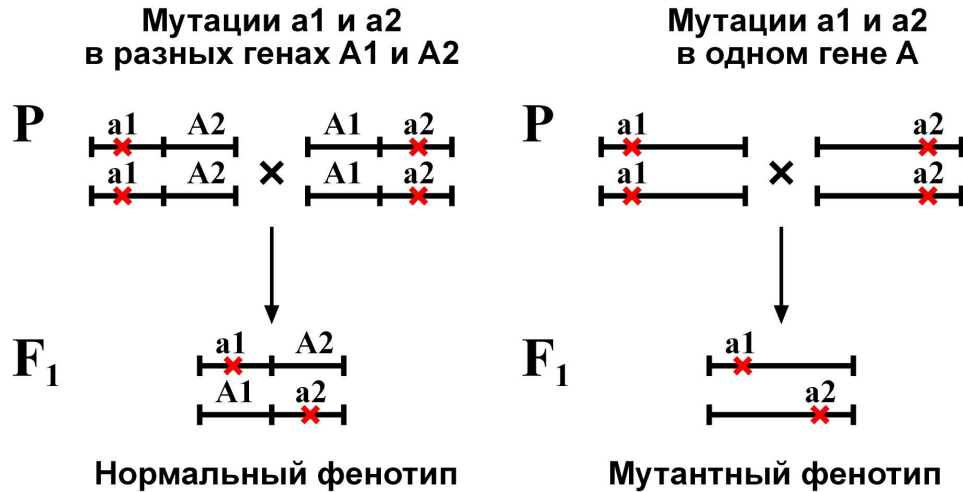


Мутации в других генах

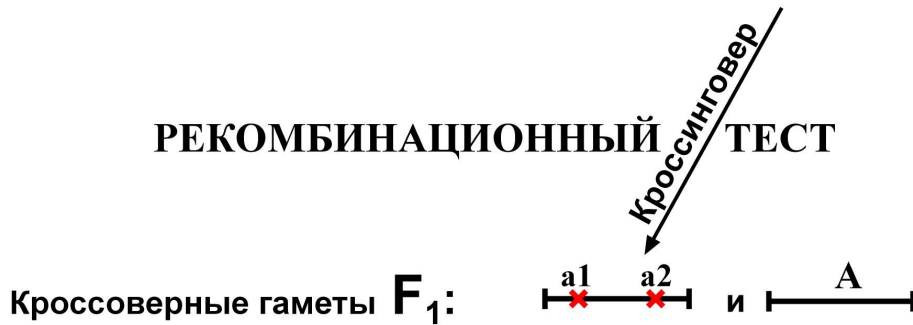


ТЕСТЫ НА АЛЛЕЛИЗМ, РАЗРАБОТАННЫЕ Т. МОРГАНОМ

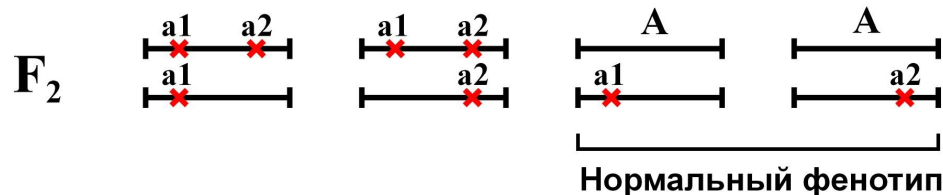
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕСТ



РЕКОМБИНАЦИОННЫЙ ТЕСТ



Скрещивание особей F₁ между собой.
Если произошел кроссинговер, в F₂ появятся особи:



- По результатам тестов на аллелизм Т.Х.Морган постулировал, что **ген является единицей функции, мутации и рекомбинации.**
- Эти представления стали общепризнанными на многие годы, вплоть до обнаружения явления т.н. псевдоаллелизма.
- М.Грин и Е.Льюис обнаружили у дрозофилы случаи рекомбинации между мутациями, которые согласно функциональному тесту были аллельными.
- Впервые функциональный и рекомбинационный тесты на аллелизм дали разные результаты.
- Вскоре выяснилось, что явление псевдоаллелизма не является неким исключением, а широко проявлялось в тех случаях, где анализировались большие выборки.
- Встала необходимость сделать выбор между функциональным и рекомбинационным тестами.

- М.Грин и Е.Льюис сделали выбор в пользу рекомбинационного теста (ген – единица рекомбинации). Эту точку зрения разделяли не все генетики.
- На самом деле в основе псевдоаллелизма лежала внутригенная рекомбинация, с которой не сталкивались ни Т.Х.Морган, ни другие исследователи того периода. Все они работали со сравнительно малыми выборками, недостаточными для обнаружения внутригенной рекомбинации.
- Возникла продолжительная дискуссия, приведшая к кризису теории гена.
- Точку в этой дискуссии поставил С.Бензер, который провел детальное картирование локуса *rII* у бактериофага Т4 и продемонстрировал рекомбинационную делимость гена вплоть до отдельных нуклеотидов.
- Было окончательно определено, что ген не может являться

Другой важный этап в развитии теории связан с появлением гипотезы «ОДИН ГЕН – ОДИН ФЕРМЕНТ» (Дж. Бидл и Э.Тейтум, 1941 г.).

Впоследствии гипотеза была переформулирована как «ОДИН ГЕН – ОДИН ПОЛИПЕПТИД ИЛИ ОДНА РНК».

ГИПОТЕЗА «ОДИН ГЕН – ОДИН ФЕРМЕНТ»

(Дж.Бидл и Э.Тейтум, 1941 г.).

Впоследствии была переформулирована как «ОДИН ГЕН – ОДИН ПОЛИПЕПТИД ИЛИ ОДНА РНК».

Дж.Бидл и Э.Тейтум получили коллекцию мутантов нейроспоры, неспособных расти на минимальной синтетической среде. Впоследствии такие мутанты стали называть «ауксотрофными», в отличие от «прототрофного» штамма дикого типа, растущего на минимальной среде.

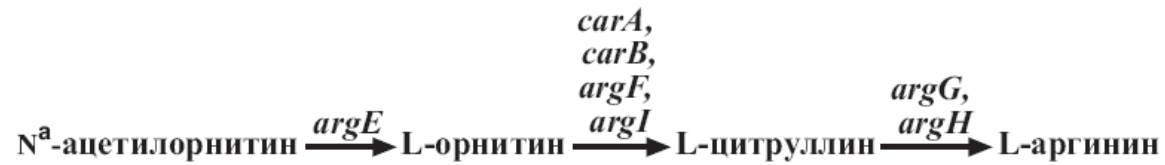
Далее Бидл и Тейтум установили:

Добавление какого именно вещества позволяет мутантному штамму расти на минимальной среде.

У каждого мутанта блокирована определенная метаболическая стадия (биосинтез аминокислот, пуриновых или пиримидиновых оснований, витаминов и других метаболитов), и при этом **отсутствует определенный фермент**.

Мутация, нарушающая любую из реакций в цепи биосинтеза, блокирует все последующие реакции в цепи. Об этом свидетельствует накопление метаболита, непосредственно предшествующего блокированной стадии биосинтеза.

Часть схемы биосинтеза аргинина у *Neurospora crassa*



Рост *arg*-мутантов на минимальных средах с добавками различных метаболитов пути биосинтеза аргинина

| Мутант гена | Добавление метаболита | | |
|-------------|-----------------------|-------------|-----------|
| | L-орнитин | L-цитруллин | L-аргинин |
| <i>argE</i> | + | + | + |
| <i>argF</i> | — | + | + |
| <i>argH</i> | — | — | + |

argE - N-ацетилорнитиназа
carA, carB - карбамоилфосфатсинтетаза
argF, argI - орнитинкарбамоилтрансфераза
argG - аргининсукцинатсинтаза
argH - аргининосукциназа

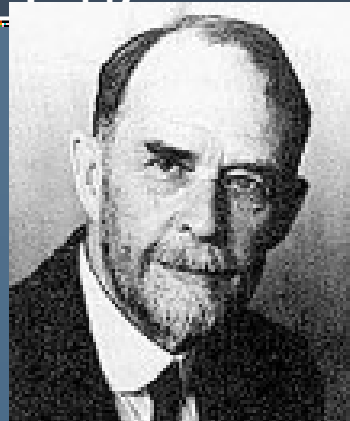


- **Классические представления о гене, сложившиеся к 1960 г.:**

- Ген – единица функции. Критерием гена является функциональный тест на аллелизм.
- Ген делим в рекомбинационном отношении до отдельных нуклеотидов.
- Ген занимает определенный локус в хромосоме.
- Один ген – один полипептид (или одна молекула РНК), то есть один продукт.
- Одна мутация (замена нуклеотида) в гене приводит к замене одной аминокислоты в кодируемом им полипептиде.
- Ген и его продукт колинеарны.



Gregor Johann
Mendel
(1822-1884)



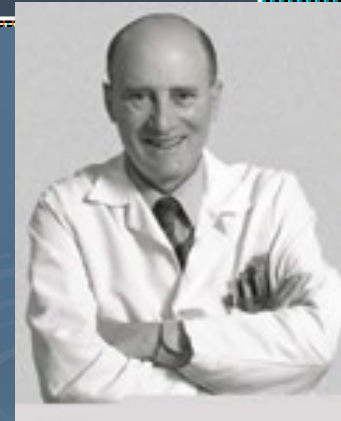
Thomas Hunt
Morgan
(1866-1945)



George Wells
Beadle
(1903-1989)



Edward Lawrie
Tatum
(1909-1975)



Seymour
Benzer
(1921-2007)

Все гены можно подразделить на две группы:

1. Гены, кодирующие полипептиды.
2. Гены, кодирующие различные РНК, где конечным продуктом является транскрипт.

НАИБОЛЕЕ ИЗВЕСТНЫЕ ТИПЫ РНК, КОДИРУЕМЫХ СОБСТВЕННЫМИ ГЕНАМИ

Рибосомные – рРНК:

прокариоты: 5S, 16S, 23S;

эукариоты: 5S, 5,8S, 18S, 28S.

Транспортные – тРНК.

Малые ядерные – мяРНК (small nuclear, snRNAs), представители:

U1, U2, U4, U5, U6 – компоненты сплайсосом (процессинг про-мРНК);

U3, U7 – процессинг про-рРНК.

Малые ядрышковые РНК (small nucleolar, snoRNAs) представлены сотнями видов, участвуют в модификации рРНК и мяРНК. Как правило, находятся внутри интронов про-мРНК, из которых вырезаются путем нуклеолитического процессинга.

Гены, кодирующие малые ядрышковые РНК, не имеют собственных промоторов.

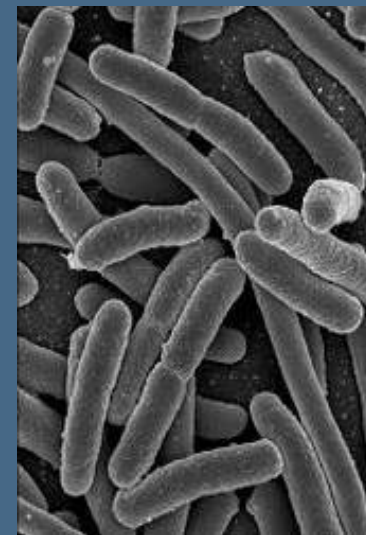
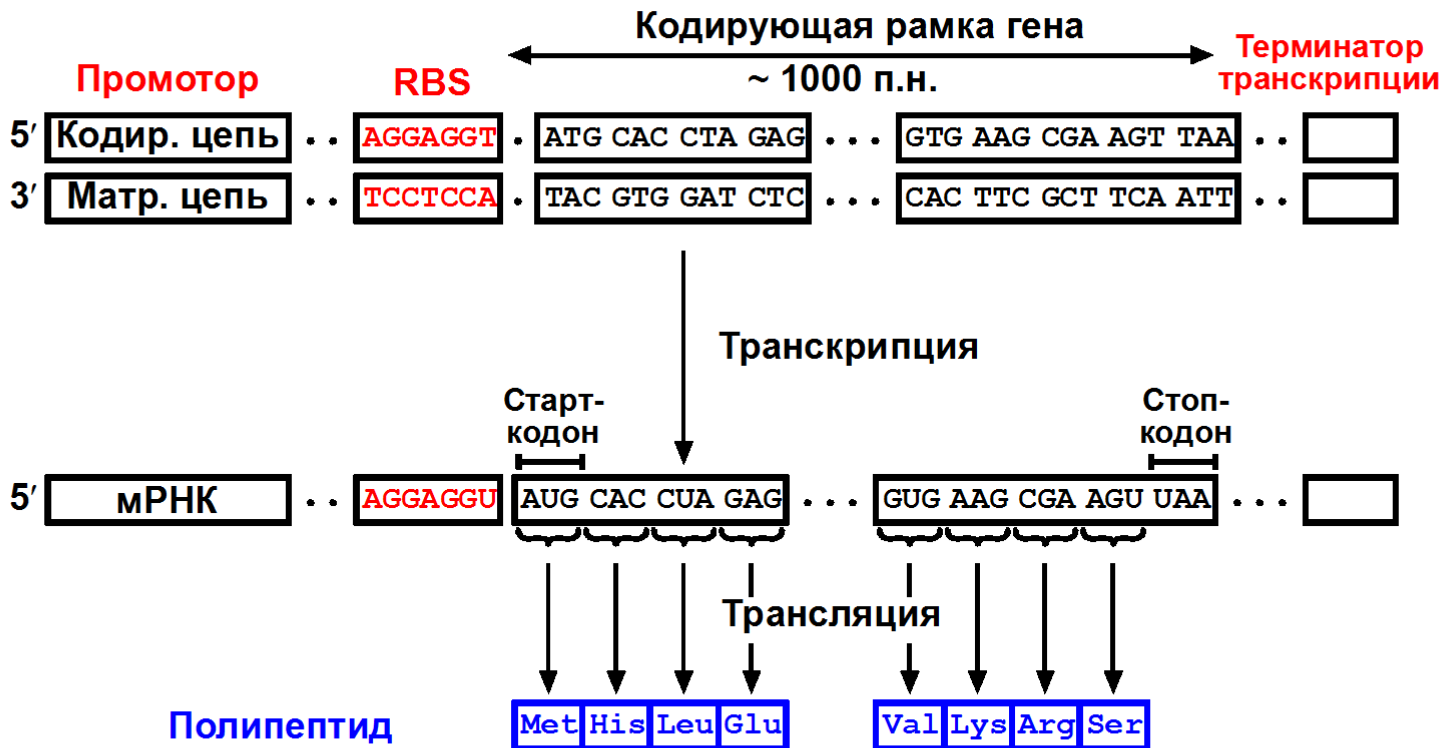
■ ДРУГИЕ ТИПЫ РНК, КОДИРУЕМЫХ СОБСТВЕННЫМИ ГЕНАМИ

- МикроРНК (miRNAs) – низкомолекулярные (в среднем 22 п.н.) регуляторные РНК, представленные сотнями видов (и соответствующим количеством генов) у эукариот. Подавляют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, взаимодействуя с комплементарными участками их мРНК. Эти взаимодействия приводят либо к деградации мРНК, либо к подавлению трансляции.
- “Antisense” РНК у бактерий и эукариот. Действуют как “риборегуляторы” на уровне инициации трансляции, спариваясь с комплементарной последовательностью выше начального кодона AUG.
- RNase P – процессинг тРНК и некоторых других РНК (каталитическая РНК);
- РНК в составе теломеразы как матрица для синтеза теломер;
- Xist RNA, осуществляет дозовую компенсацию X- хромосом у млекопитающих;
- roX1 и roX2 – дозовая компенсация X-хромосом у дрозофилы.

Гены, кодирующие полипептиды, отличаются от генов, кодирующих РНК, тем, что они имеют в своем составе так называемые открытые рамки считывания (ОРС). ОРС состоят из:

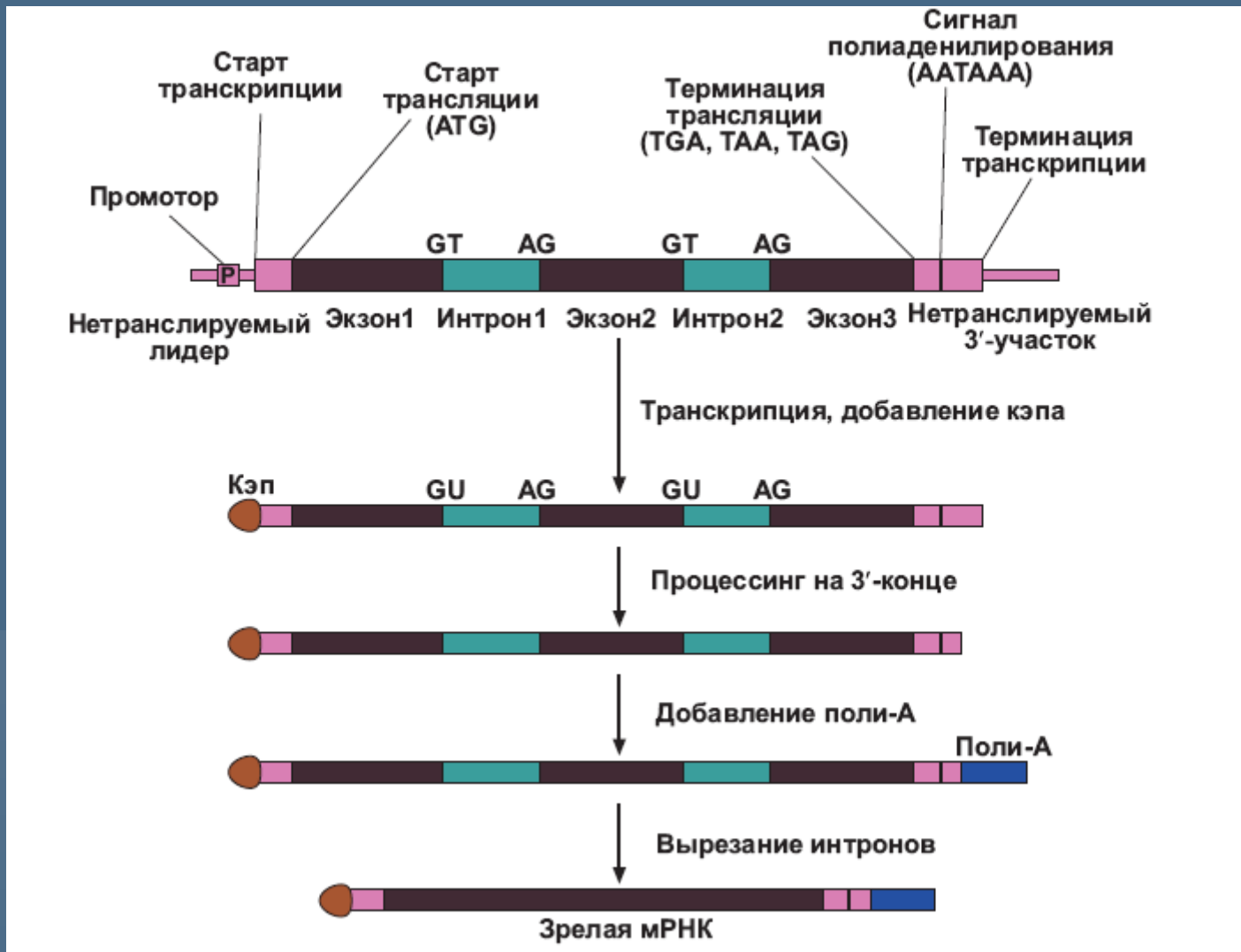
- (1) кодона, инициирующего трансляцию (AUG),
- (2) последовательности кодирующих аминокислоты нуклеотидных триплетов и
- (3) одного или двух терминирующих (нонсенс) кодонов (UAA, UAG, UGA).

Схема строения и функционирования гена, кодирующего полипептид у прокариот



RBS - сайт связывания рибосомы (ribosome binding site)

Схема строения и функционирования эукариотического гена



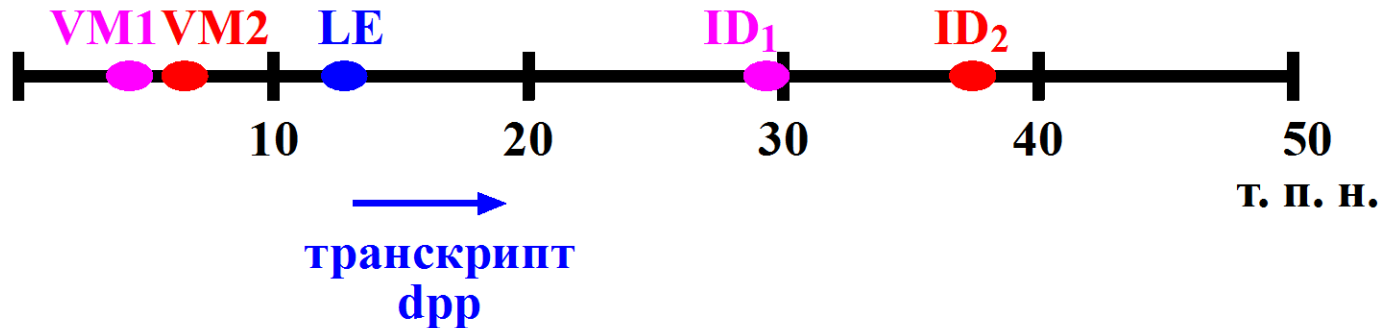
Представленный здесь тип сплайсинга, где порядок экзонов в зрелой мРНК соответствует их порядку в ДНК, называют конститутивным.

На приведенных выше схемах вместе с генами представлены их промоторы.

Однако, важно оговорить, что ни промоторы, ни другие регуляторные элементы в собственно ген не входят, а составляют его регуляторную область.

Сам ген представлен только его кодирующей последовательностью.

Физическая карта гена *dpp* дрозофилы с его регуляторной зоной



Представлены некоторые из многих энхансерных элементов гена *dpp* дрозофилы на участке 50 т. п. н.

VM1 активирует развитие мезодермы внутренних органов (3-й зародышевый листок) передней части зародыша,

VM2 - задней части.

ID - один из многих энхансерных элементов, активирующих экспрессию имагинальных дисков

Основные явления, нарушающие классические представления о гене – период развития молекулярной генетики

- Межаллельная комплементация – нарушение функционального теста на аллелизм.
- Перекрывание генов – одна мутация может приводить к замене аминокислоты в разных белках.
- Прерывистая (интрон-экзонная) структура эукариотических генов – частичное нарушение коллинеарности гена и продукта.
- Альтернативный сплайсинг – один ген может кодировать несколько разных продуктов; нарушение принципа коллинеарности гена и белка и принципа один ген – один продукт.
- Рекомбинационные состыковки различных кодирующих сегментов ДНК, приводящие к формированию разнообразных генов (например, генов иммуноглобулинов), - нарушение всех принципов.

МЕЖАЛЛЕЛЬНАЯ КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ

Это явление характерно для белков, имеющих четвертичную структуру и состоящих из идентичных полипептидных субъединиц (кодируются одним геном).

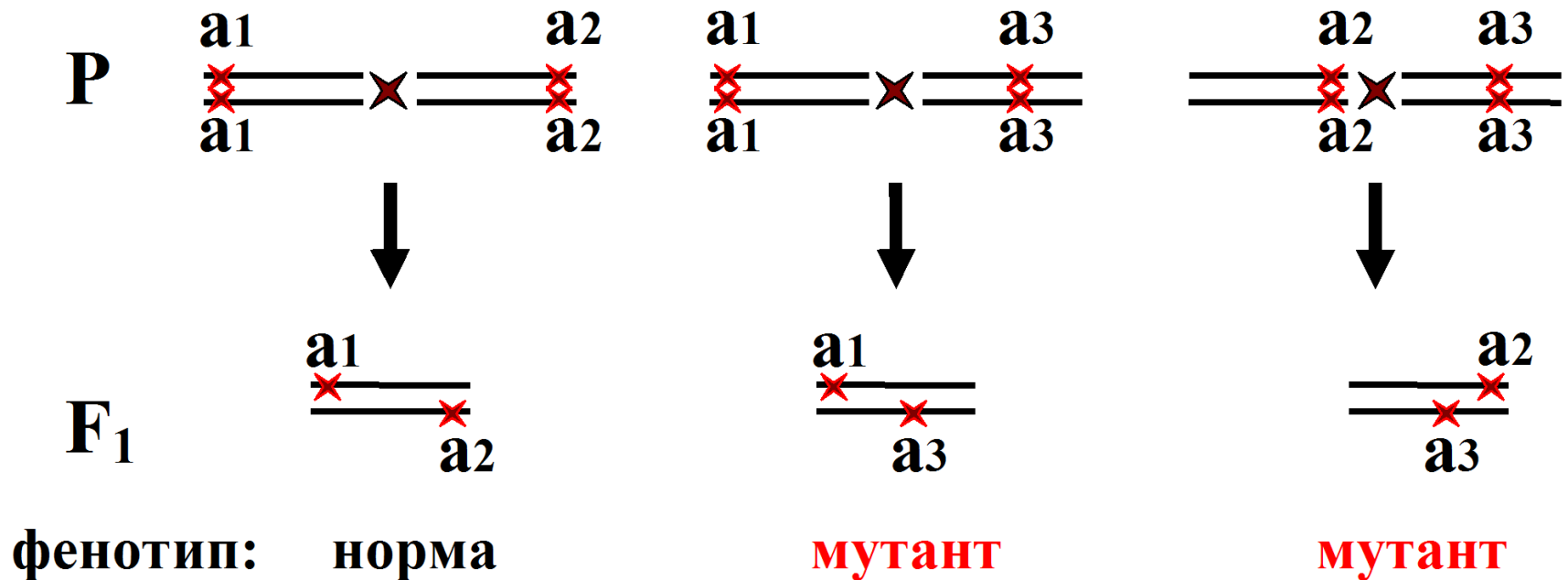
Разные аллельные мутации могут вызвать нарушения в разных участках полипептида.

Некоторые из нарушений в разных полипептидах могут компенсировать друг друга и тогда два разных мутантных полипептида смогут сформировать четвертичную структуру.

Образовавшийся белок будет не вполне полноценным: как правило, он проявляет примерно 10% активности по сравнению с нормой, но обычно этого достаточно для проявления нормального фенотипа.

Межаллельную комплементацию можно выявить с помощью системы скрещиваний, представленной на следующем слайде.

Система скрещиваний, демонстрирующая явление межallelной комплементации

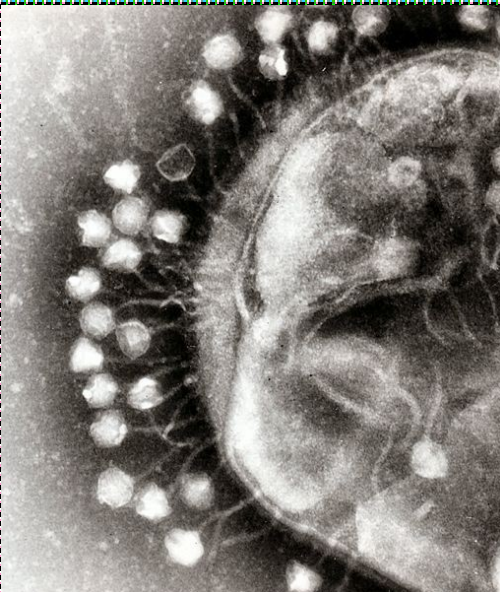


Мутация a_1 комплементарна мутации a_2 , из чего следует, что они неаллельны – относятся к разным генам.
 Мутация a_1 некомплементарна мутации a_3 , и мутация a_2 некомплементарна мутации a_3 , то есть они находятся в одном гене с a_3 , что опровергает первоначальный вывод о неаллельности a_1 и a_2 .

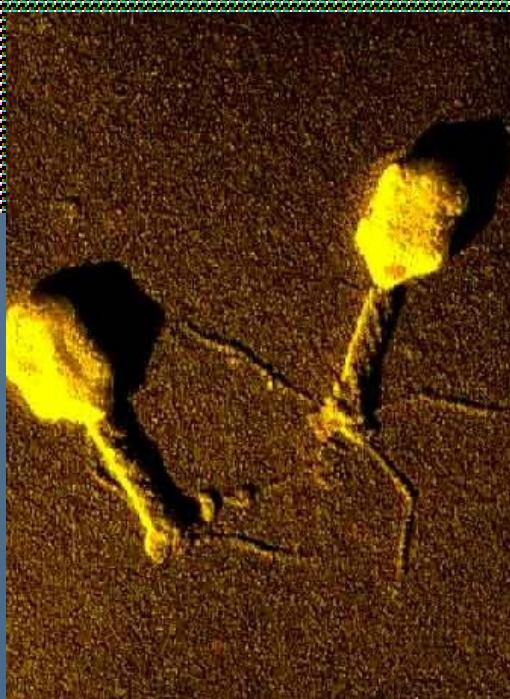
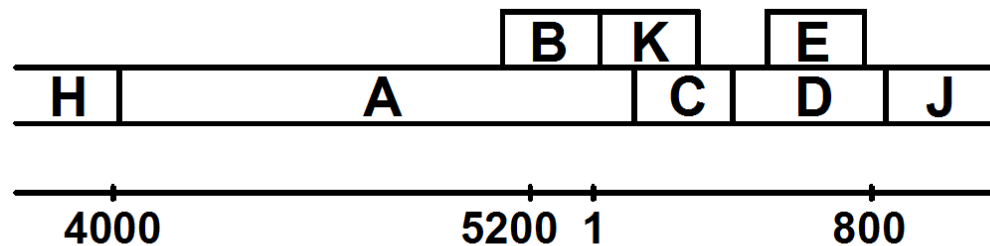
ПЕРЕКРЫВАНИЕ ГЕНОВ

Перекрывание генов проявляется в том, разные гены могут частично занимать одну и ту же последовательность в ДНК.

Впервые это явление было обнаружено в 1976 г. после того, как у бактериофага фХ174 выявили, что суммарное количество аминокислот в кодируемых геномом фага белках значительно превышает его кодирующие возможности – общее число нуклеотидов в фаговой хромосоме.



Участок хромосомы ~2000 н. бактериофага
 ФХ174 в районе гена А. Геном ФХ174
 имеет размер 5386 н.



Конец гена А
 5' - ATGA - 3'
 Начало гена С

Конец гена Е Начало гена J
 5' - GAAGGAGTGATGТААТGTСТААА - 3'
 Конец гена D

Перекрытие генов, открытое у бактериофагов, широко распространено в различных формах среди разных групп организмов. Приведем несколько примеров.

Нередко в дуплексе ДНК обе цепи могут являться кодирующими. Например регуляторные антисенс-РНК у про- и эукариот.

Интроны некоторых эукариотических генов содержат гены малых ядрышковых РНК, которые впоследствии вырезаются путем нуклеолитического процессинга.

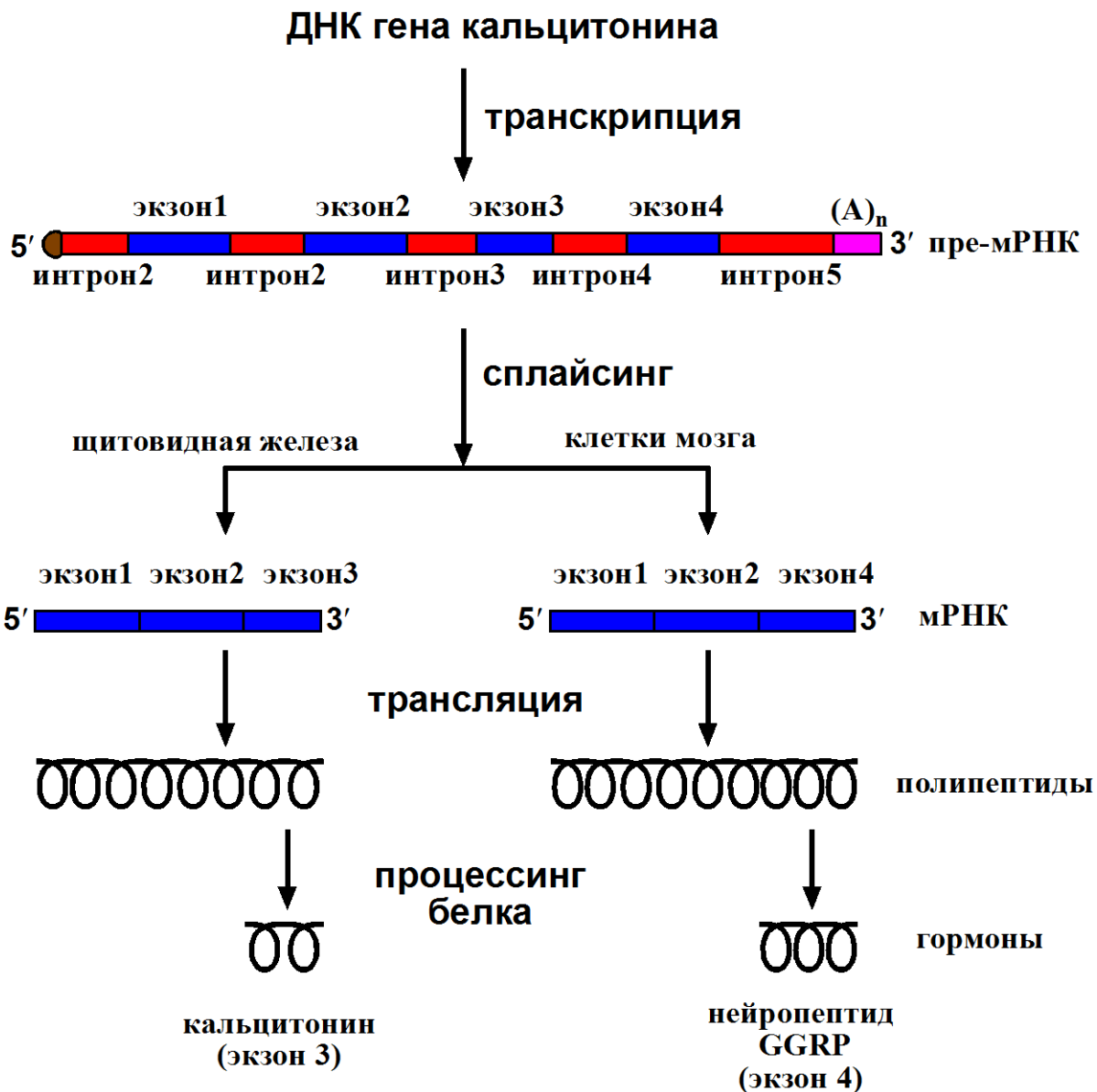
За счет использования двух разных промоторов на одной последовательности ДНК могут синтезироваться две разных мРНК: одна короче, другая – длиннее.

Например, дрожжей продуктом одного из альтернативных транскриптов гена *SUC2* является внутриклеточная форма инвертазы, продуктом другого транскрипта – секретлируемая форма инвертазы.

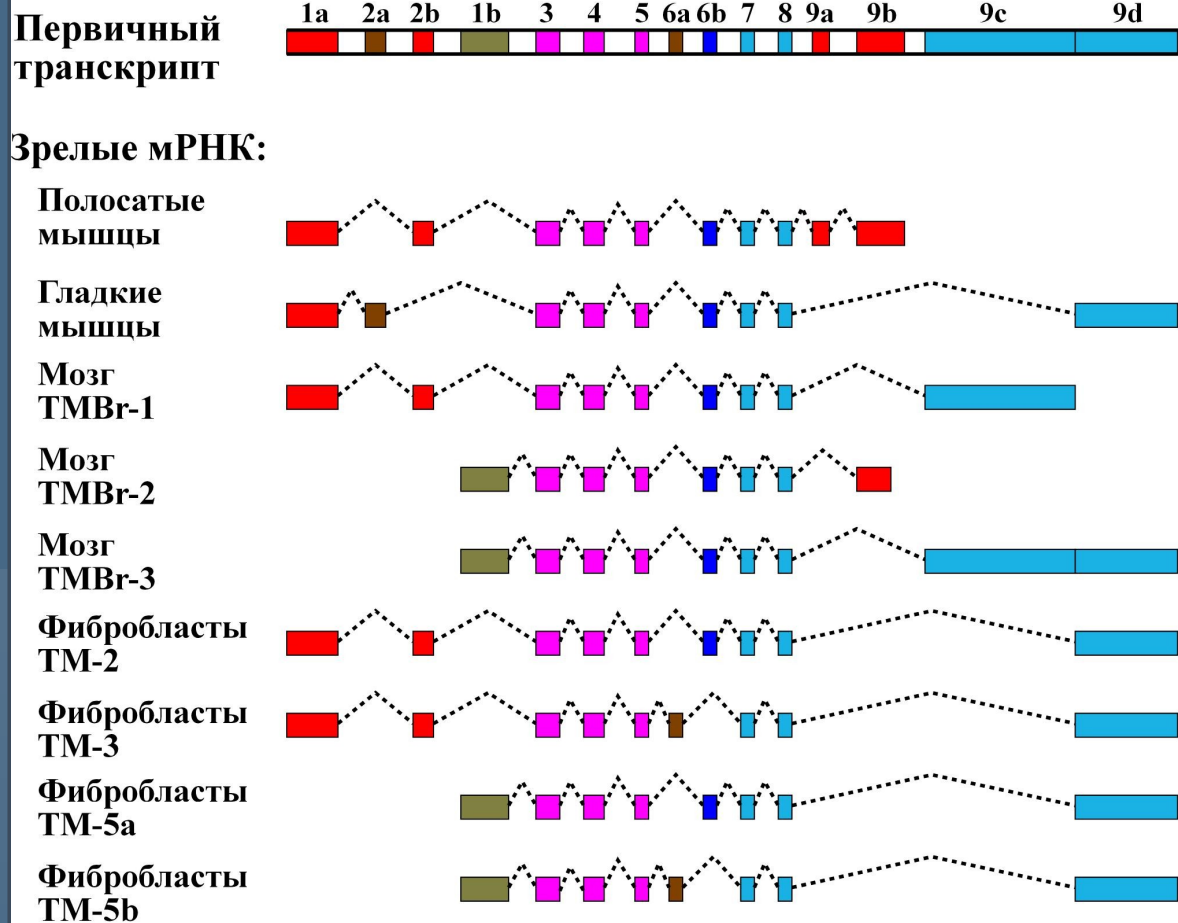
АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Альтернативный сплайсинг – сшивание экзонов при сплайсинге в различных сочетаниях. В результате один ген может иметь более одного продукта.

Альтернативный сплайсинг при экспрессии гена кальцитонина у крысы



Альтернативный сплайсинг мРНК гена α-тропомиозина в клетках различных тканей млекопитающих (по Griffiths *et al.*, 1999, модифицир.)



Интроны обозначены белыми прямоугольниками, экзоны - цветными прямоугольниками. Пунктирные линии указывают районы, удаляемые в результате сплайсинга.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Около 94% генов человека экспрессируются по механизму альтернативного сплайсинга.

Этот факт объясняет огромное разнообразие белков в организме человека при сравнительно небольшом числе генов (около 21 тыс.), несущественно превышающем таковое у более низко организованных форм организмов.

Альтернативный сплайсинг обычно имеет тканеспецифический характер.

Сходная ситуация обнаружена у растения *Arabidopsis thaliana*.

ТРАНССПЛАЙСИНГ

Известны случаи, когда происходит сшивание экзонов из разных мРНК, считывающихся с цепей ДНК противоположной полярности и даже с разных хромосом.

Например, в эритроцитах человека обнаружен необычный белок – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. 479 С-концевых аминокислотных остатка белка закодированы в гене в X-хромосоме, а 53 N-концевых остатка происходят от гена GMP-редуктазы в хромосоме 6.

Очевидно, что концепция гена как локуса в хромосоме к таким случаям неприменима.

У ресничных инфузорий происходит процесс, напоминающий сплайсинг, но на уровне ДНК.

- Начнем с того, что генетический аппарат ресничных инфузорий отличается ядерным диморфизмом. Он проявляется в наличии в клетке двух типов ядер: малого или микронуклеуса (**Ми**), и большого – макронуклеуса (**Ма**).
- Диплоидный Ми служит генеративным ядром, используемым для передачи наследственной информации в ряду поколений. В вегетативно растущих клетках гены Ми практически не транскрибируются.
- Зато активно транскрибируются гены полиплоидного Ма, выполняющего роль рабочего ядра и контролирующего процессы жизнедеятельности. Его часто называют соматическим ядром. Ма богаче ДНК (хроматином) по сравнению с Ми в сотни и даже тысячи раз.

■ Диплоидный Ма при вегетативном росте делится путем обычного митоза, Ма – путем непрямого амитотического деления. «Соматические» хромосомы Ма лишены центромер. При делении Ма хромосомы не конденсируются, аппарат клеточного веретена не формируется, а сам Ма расщепляется на две **примерно** равные половины.

■ Такой способ деления не обеспечивает правильной сегрегации хромосом. Поэтому в ходе размножения инфузорий Ма постепенно дегенерирует, что ограничивает продолжительность жизни клонов инфузорий.

- Для обновления Ма. у инфузорий периодически происходит конъюгация – своеобразная форма полового процесса.

- Во время конъюгации их Ма начинают разрушаться, а Ми делятся путем мейоза, на 4 гаплоидных ядра каждое.

- Клетки партнеров обмениваются гаплоидными ядрами, по одному от каждой клетки, затем каждое сливается с местным (стационарным) гаплоидным ядром, то есть происходит оплодотворение. К этому моменту все лишние ядра дегенерируют и элиминируются, и в каждой клетке остается по одному диплоидному ядру – продукту оплодотворения.

- После расхождения партнеров ядро делится митотически на два. Одно из дочерних ядер останется Ми, другое превратится в Ма.

- **Формирование нового Ма сопровождается полной реорганизацией генома Ми-предшественника.**

- При созревании Ма происходит полная реорганизация генома, в результате которой в геномах Ма брюхожесничных инфузорий (*Hypotricha*) (роды *Euplotes*, *Oxytricha* и *Stylonychia*) остается менее 5% от геномной ДНК Ми.

- Процессы реорганизации начинаются с удаления значительной части хромосом и **политенизации** оставшихся хромосом.

- Уже в процессе политенизации начинается элиминация внутренних участков хромосом. Удаляются все мобильные элементы, большая часть высокоповторяющихся последовательностей ДНК, спейсерные ДНК и т.н. внутренние элиминируемые последовательности (*internal eliminated sequences - IES*). IES **как бы** соответствуют ДНК-интронам.

- IES – короткие однокопийные сегменты ДНК, находящиеся главным образом в кодирующих последовательностях генов Ми. Они прерывают и, тем самым, **инактивируют Ми-гены**. Это – одна из причин отсутствия экспрессии у генов Ми.

- Кодирующие последовательности, разделяемые IES, называют **MDSs** (*macronucleus destined sequences*). Иногда их называют «ДНК-экзонами»)

Вырезание IESs приводит к состыковке кодирующих сегментов – MDS, являющейся необходимым условием активации генов Ma.

У значительной части генов Mi порядок MDSs отличается от такового в генах зрелого Ma, т.е. MDSs в Mi как бы перетасованы («*scrambled*»). Более того, некоторые MDSs могут находиться в инвертированной по отношению к другим MDSs ориентации или даже в несцепленных локусах.

Состыковка MDSs в гене Ma в правильной (*unscrambled*) последовательности управляется относительно короткими (порядка 11 п.н.) повторами, расположенными на стыках MDS и IES.

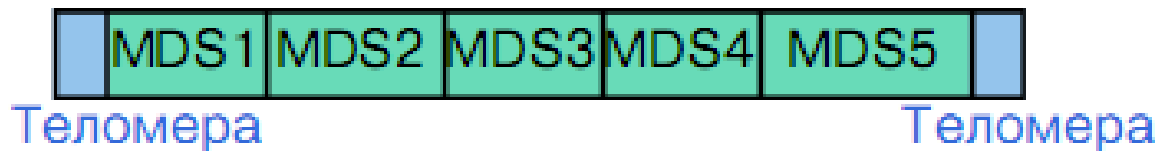
Повидимому, состыковка MDS происходит за счет рекомбинации между парами одинаковых повторов.

Организация гена *actin1* в Ми и в Ма *Oxytricha nova*

Ген в хромосоме Ми



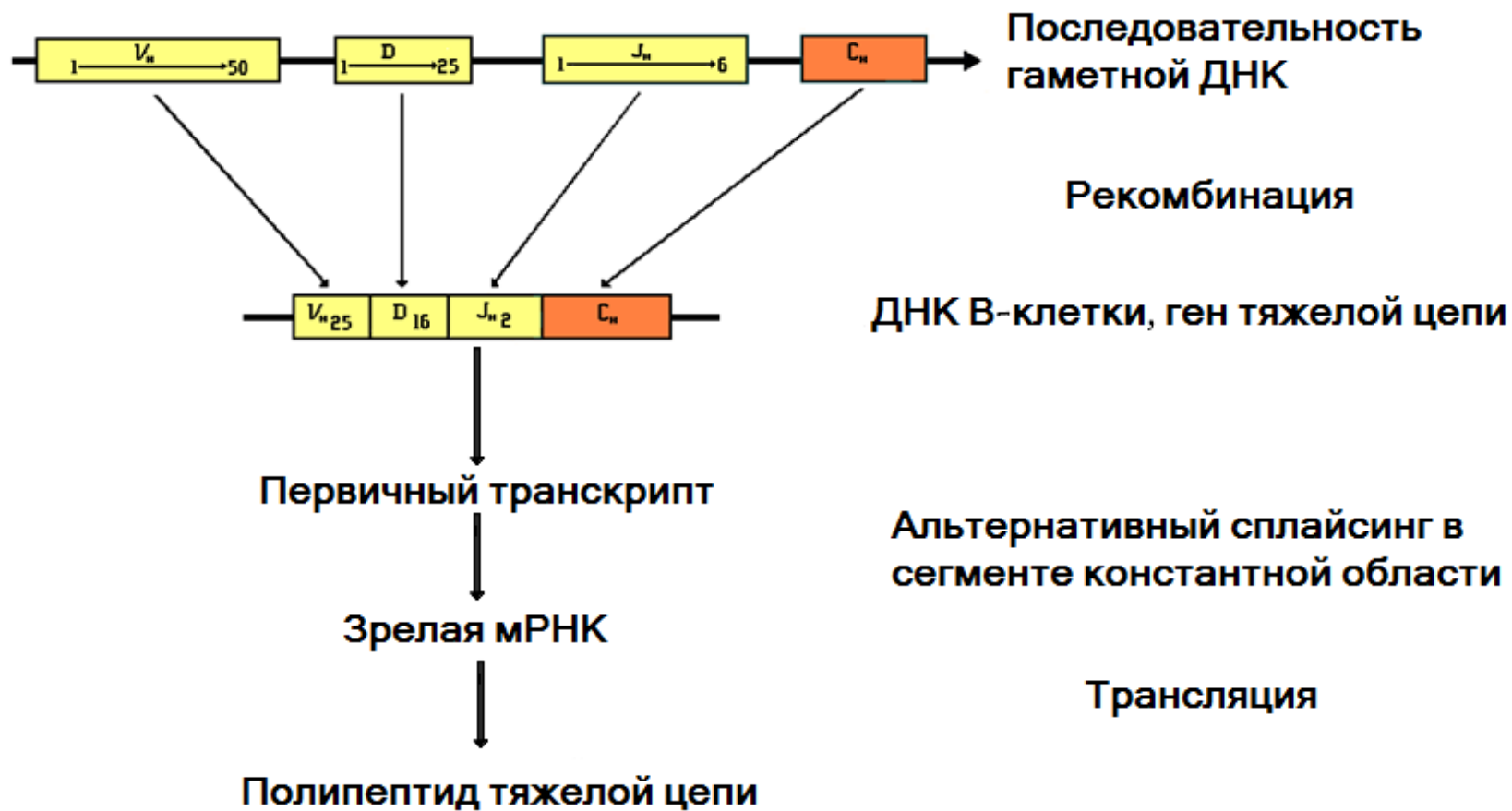
Ген Ма



ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

- Ярким примером явлений, усложняющих и в то же время обогащающих наши представления о гене, являются процессы геномных перестроек, лежащих в основе **формирования генов** антител и Т-клеточных рецепторов у позвоночных.
- В иммунном ответе организма ключевую роль играют лимфоидные В- и Т-клетки, синтезирующие белки, специфически связывающие антигены. В-клетки продуцируют разнообразные антитела (иммуноглобулины), а т.н. Т-хелперы – Т-клеточные рецепторы.
- Разнообразие этих белков обеспечивается разнообразием генов, кодирующих иммуноглобулины и рецепторы Т-лимфоцитов.
- **В геномах генеративных и всех соматических клеток, кроме В-лимфоцитов, гены иммуноглобулинов отсутствуют.**
- В них представлены только наборы кодирующих сегментов V, D и J, из которых **на строго определенных стадиях дифференцировки** предшественников лимфоцитов формируются гены иммуноглобулинов.

Формирование гена тяжелой цепи иммуноглобулина



- Несмотря на приведенные сложности, ген остается реальным понятием.

- В настоящее время можно дать следующее рабочее определение:

- Ген – это участок ДНК, кодирующий один (у прокариот и у эукариот) или несколько (только у эукариот) функциональных продуктов: полипептид(ы) или РНК.