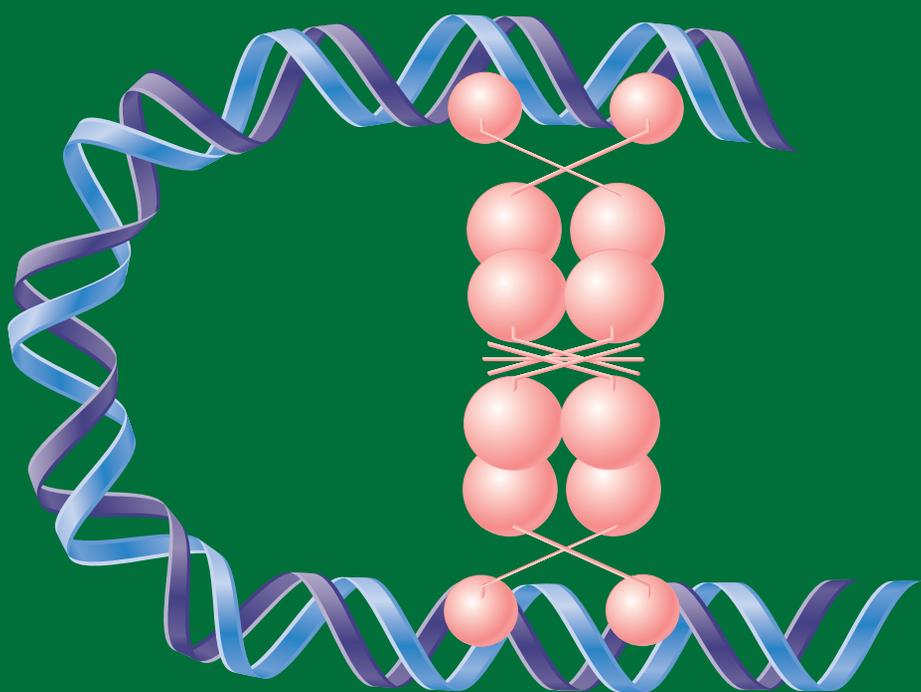


ГЕНЫ ПО ЛЬЮИНУ

ДЖ. КРЕБС
Э. ГОЛДШТЕЙН
С. КИЛПАТРИК



ГЕНЫ ПО ЛЬЮИНУ

LEWIN'S GENES X

Jocelyn E. Krebs
University of Alaska, Anchorage

Elliott S. Goldstein
Arizona State University

Stephen T. Kilpatrick
University of Pittsburgh at Johnstown



JONES AND BARTLETT PUBLISHERS

Sudbury, Massachusetts

BOSTON TORONTO LONDON SINGAPORE

ГЕНЫ ПО ЛЬЮИНСУ

ТРЕТЬЕ ИЗДАНИЕ

Дж. Кребс
Э. Голдштейн
С. Килпатрик

Перевод с английского под редакцией
доктора биологических наук Д. В. Ребрикова
и кандидата биологических наук Н. Ю. Усман



Москва
Лаборатория знаний

УДК 575.113/118
ББК 28.04-28.070
К79

Переводчики:
канд. биол. наук И. А. Кофиади
канд. биол. наук Н. Ю. Усман
канд. биол. наук М. А. Турчанинова
канд. биол. наук А. М. Савилова
д-р биол. наук И. В. Филиппович

Кребс Дж.

К79 Гены по Льюину / Дж. Кребс, Э. Голдштейн, С. Килпатрик ; пер. 10-го англ. изд. — 3-е изд. — М. : Лаборатория знаний, 2020. — 919 с. : цв. ил.

ISBN 978-5-00101-249-8

Перевод десятого англоязычного издания книги, ставшей классикой для молекулярных биологов всего мира, содержит последние достижения в области молекулярной биологии и молекулярной генетики, включая структуру генов, последовательности, организацию и экспрессию. Издание дополнено новыми разделами, хорошо иллюстрировано и структурировано, что помогает студентам лучше ориентироваться в отдельных темах.

Для студентов, специализирующихся в области молекулярной генетики, молекулярной биологии, геномной инженерии, а также для аспирантов, преподавателей, научных сотрудников.

УДК 575.113/118
ББК 28.04-28.070

Учебное издание

Кребс Джоселин
Голдштейн Эллиотт
Килпатрик Стивен

ГЕНЫ ПО ЛЬЮИНУ

Ведущий редактор канд. биол. наук *В. В. Гейдебрехт*

Художник *В. Е. Шкерин*

Корректор *В. К. Крылова*

Компьютерная верстка: *Т. Э. Внукова*

Подписано в печать 10.09.19. Формат 60×90/8.

Усл. печ. л. 115,00.

Издательство «Лаборатория знаний»
125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3
Телефон: (499) 157-5272
e-mail: info@pilotLZ.ru, <http://www.pilotLZ.ru>

ISBN 978-5-00101-249-8

ORIGINAL ENGLISH LANGUAGE EDITION
PUBLISHED BY
Jones & Bartlett Learning, LLC.
5 Wall Street
Burlington, MA 01803
© 2011 JONES & BARTLETT PUBLISHERS, LLC.
ALL RIGHTS RESERVED
© Лаборатория знаний, 2020

Посвящение

Бенджамину Льюину за то, что высоко поднял планку.

Моей матери Эллен Беккер, привившей мне любовь к науке; памяти моего отчима Барри Кифера, который убедил меня в том, что наука бывает забавной; и моей коллеге Сьюзен Морган, которая всегда делала вид, что мои биологические шутки действительно смешны. Наконец, моему сыну Рису, который когда-нибудь прочтет будущие переиздания этой книги.

Джоселин Кребс

Моей семье: жене Сьюзен, чье терпение, понимание и доверие ко мне просто изумительны; моим детям Анди, Хайле и Гарри, которые помогли мне освоить компьютер; и моим внукам Сету и Эллен, чье хихиканье вдохновляло меня. Также памяти моего большого друга и учителя Ли А. Снайдера, профессионализм, стиль руководства и научная интуиция которого продемонстрировали, что эти черты важны для ученого и руководителя. Я старался оправдать его ожидания.
Это Вам, Док.

Эллиотт Голдштейн

Моей жене Лоре, за ее многолетнюю любовь, поддержку и проявленное терпение; моей дочери Дженнифер, которая все-таки прочла эту книгу; моему сыну Эндрю, который постоянно поддерживал мою уверенность в том, что человеку присущи самые лучшие качества; и моей дочери Саре, которая каждый день доставляла мне радость.

Стивен Килпатрик

Предисловие

Среди различных наук, предметом которых является познание жизненных процессов, молекулярная биология выделяется быстротой проведения исследований и их широтой. Каждый день исследователи получают новые экспериментальные данные, которые приоткрывают ранее неизвестные стороны хорошо изученных процессов, причем это происходит не в течение нескольких лет, а исчисляется неделями или месяцами. Трудно поверить в то, что впервые данные о строении генома были получены менее чем пятнадцать лет тому назад. Исследования структуры генов, строения генома и их взаимосвязь с определенными внутриклеточными процессами выглядят красиво и создают обманчивое впечатление простоты, однако обычно являются чрезвычайно трудными, и невозможно в полной мере оценить всю сложность функционирования генетических систем живых организмов.

Настоящая книга предназначена для студентов, специализирующихся в области молекулярной генетики и молекулярной биологии. Для того чтобы дать представление о современном состоянии быстро развивающихся областей молекулярной биологии, мы привлекли к написанию книги двадцать одного исследователя, которые критически проанализировали данные по отдельным направлениям, в которых они являются специалистами. Их комментарии включены в текст соответствующих глав. В настоящее издание большинство исправлений внесено в соответствии со вторым изданием книги *Lewin's Essential Genes*, однако в нем также содержится и много новых поправок. Следует отметить появление двух новых глав: главы 3 («Методы молекулярной биологии и генной инженерии»), в которой рассматриваются некоторые общие положения и приводятся основные методики, используемые в молекулярной биологии, и главы 8 («Эволюция генома»), в которой обновлены и суммированы основные положения, в ранних изданиях рассеянные по разным главам. В этой главе рассматриваются и совершенно новые вопросы. В настоящем издании структура книги переработана в соответствии с логикой изложения материала, а также изменены названия многих глав как более соответствующие их содержанию. В частности, изложение закономерностей организации хроматина и структуры нуклеосом предшествует обсуждению вопросов транскрипции,

поскольку хромосомная организация играет критическую роль в реализации всех функций ДНК в клетке, и центр тяжести современных исследований процесса транскрипции смещен, главным образом, в сторону изучения роли хроматина в этом процессе. Соответственно, вопросы активации транскрипции и перестройки структуры хроматина сведены в одну главу (гл. 28 «Регуляция транскрипции у эукариот»). Две главы, посвященные транспозонам и ретропозонам, тоже объединены в одну (гл. 17 «Транспозоны и ретровирусы»). Некоторые главы подверглись существенной переработке и содержат много новых материалов. Вводная глава, посвященная информационной РНК, переработана полностью, и в нее включены новые материалы (гл. 22 «Стабильность и локализация мРНК»). Существенно расширена глава о регуляторных РНК, и в нее включены последние данные по метаболизму РНК_i (гл. 30 «Регуляторная РНК»). В книге много новых рисунков, отражающих последние научные разработки, главным образом, относящиеся к структурной организации хроматина и его функциям, к эпигенетическим механизмам и регуляции внутриклеточных процессов некодирующими микроРНК у эукариот.

Книга состоит из четырех частей. **Часть 1 (Гены и хромосомы)** включает десять глав. Первые две служат введением в проблему структуры и функции ДНК. В них изложены основные понятия репликации ДНК и генной экспрессии. В гл. 3 представлена информация о современных лабораторных методах исследования. В гл. 4 обсуждается строение прерывистых генов у эукариот, а в гл. 5–8 — вопросы структуры и эволюции генома. Главы 9 и 10 посвящены проблеме структуры хромосом эукариот.

Часть 2 (Репликация и рекомбинация ДНК) включает гл. 11–18. В гл. 11–14 подробно обсуждаются вопросы репликации плазмид и вирусов, а также прокариотических и эукариотических клеток. Главы 15–18 посвящены рекомбинации и ее роли в репарации ДНК и в функционировании иммунной системы у человека. В гл. 16 подробно рассмотрены вопросы репарации ДНК, в гл. 17 — различные типы транспозонов.

Часть 3 (Транскрипционные и посттранскрипционные механизмы) охватывает гл. 19–25. В гл. 19 и 20 подробно рассмотрены механизмы транскрипции

у бактерий и эукариот. Главы 21–23 посвящены РНК. В них обсуждаются вопросы строения и функционирования мРНК, стабильности и локализации РНК, а также ее процессинг и каталитическая роль. В гл. 24 и 25 рассмотрен круг вопросов, связанных с процессом трансляции и генетическим кодом.

Часть 4 (Регуляция экспрессии генов) включает главы 26–30. В гл. 26 рассмотрены вопросы регуляции экспрессии генов бактерий на уровне оперона. Глава 27 посвящена экспрессии генов в процессе развития фага после его проникновения в бактериальную клетку. В гл. 27 и 29 обсуждаются вопросы, связанные с регуляцией генной активности (в том числе посредством эпигенетических модификаций). Наконец, в гл. 30 изложены вопросы контроля генной экспрессии в клетках прокариот и эукариот.

Для преподавателей, которые предпочитают вначале знакомить студентов с основными вопросами, связанными с репликацией ДНК и экспрессией генов, а затем уже переходить к более сложным вопросам, можно предложить следующий порядок изложения материала:

Введение: гл. 1–2

Гены и структура генома: гл. 5–7

Репликация ДНК: гл. 11–14

Транскрипция: гл. 19–22

Трансляция: гл. 24–25

Регуляция генной экспрессии: гл. 9–10 и 26–30

Изложение материала остальных глав оставим на усмотрение преподавателей.

Материалы для преподавателей

В книге использованы дополнительные приемы, помогающие студентам в усвоении материала. Каждая глава начинается с краткого изложения тех вопросов, *которым она посвящается*, а в начале каждого раздела главы дан перечень *основных положений*, которые в нем рассматриваются. Наиболее важные для усвоения материала термины выделены в тексте и сведены в словарь, который находится в конце книги. Наконец, в конце каждой главы приводится список литературы, содержащий самые последние работы по тому или иному направлению, причем в этот список включены не только статьи экспериментального характера, но и обзоры литературы, способствующие усвоению материала. Дополнительные материалы можно найти на прилагаемом компакт-диске (для англоязычных изданий) или в интернете в режиме онлайн.

Мультимедийные материалы

Издательство *Jones & Bartlett* располагает большим количеством мультимедийных материалов, включающих интерактивные средства обучения, которые помогают

студентам в изучении молекулярной биологии и облегчают задачу преподавателя. Дополнительную информацию и копии обзоров по разным областям молекулярной биологии можно получить в региональных отделениях издательства *Jones & Bartlett* или на сайте <http://www.jbpub.com/biology>.

Для студентов

Интерактивный справочник по молекулярной биологии

Издательство *Jones & Bartlett* и Brent Нильсен из университета Бригама Янга подготовили интерактивный справочник по молекулярной биологии и генетике. Студенты найдут в нем, а также на сайте <http://biology.jbpub.com/lewin/genesx> много полезной информации, способствующей усвоению материала, представленного в настоящей книге, и глубокому изучению этих наук. В конце каждой главы представлены различные материалы, облегчающие усвоение информации студентами. Следует отметить, что в интернете можно найти множество обучающих средств, а также многочисленные ссылки на анимации и видеоматериалы, а сама книга содержит множество наглядных рисунков и терминологический словарь (в конце).

Для преподавателей

«Набор преподавателя» на компакт-диске (для англоязычных изданий)

На диске находятся следующие средства:

- **Банк изображений в формате программы Power Point**, который содержит ключевые иллюстрации и таблицы, представленные в тексте книги (издательство *Jones & Bartlett* сохраняет права на их публикацию или цифровое воспроизведение). Преподаватель может по своему усмотрению копировать отдельные иллюстрации или объединять их с уже имеющимися у него слайдами.
- **Лекционные слайды**, подготовленные Стивеном Килпатриком из Питтсбургского университета в Джонстауне и содержащие иллюстративные материалы к каждой главе издания *Гены X*. Слайды предназначены для показа в программе Power Point, и лекторы могут самостоятельно оптимизировать их содержание, оформление и последовательность в соответствии со своими задачами.

Ресурсы онлайн

Доступен **набор тестовых вопросов**, который обновлен и расширен его составителем Стивеном Килпатриком. В наборе содержится 750 вопросов по различным разделам молекулярной биологии, и он доступен в виде текстового файла, с которым можно работать в различных тестовых редакторах.

Благодарности

Авторы приносят благодарность сотрудникам издательства *Jones & Bartlett*, принимавшим участие в подготовке настоящей книги, за внимание и постоянную поддержку со стороны редакции, а также отделов выпуска, маркетинга и продаж, которую они оказывали нам на разных стадиях подготовки книги к публикации. Особенно хотелось бы поблагодарить Кэти Сетер, Кэролайн Перри, Миган Тернер, Кимберли Потвин, Лию Корриген и Лу Бруно. Кэти была организатором всего проекта и благодаря ее деятельности работа над книгой протекала успешно и в дружеской атмосфере. Она постоянно руководила нами, оказывая всемерную поддержку в нашем рискованном предприятии. Кэролайн, Лу и Лия делили между собой ежедневные обязанности на стадии напи-

сания и подготовки книги к выпуску. Все это проходило в дружеской и в то же время высокопрофессиональной атмосфере. Миган и Кимберли оперативно отбирали и редактировали иллюстрации.

Мы также благодарим редакторов глав, чей опыт в сочетании с энтузиазмом и скрупулезностью обеспечил высокое качество материалов рукописи. Хотелось бы сказать спасибо Бренту Нильсену из университета Бригама Янга за подготовку начального варианта разд. 8.3, и Дэвиду Рэнду из Брауновского университета за ценные замечания, которые он сделал по гл. 8.

*Джоселин Кребс
Эллиотт С. Голдштейн
Стивен Т. Килтатрик*

Об авторах

Бенджамин Льюин основал журнал *Cell* в 1974 г., главным редактором которого состоял до 1999 г. Кроме того, он создал журналы *Neuron*, *Immunity* и *Molecular Cell*. В 2000 г. Льюин основал издательство *Virtual Text*, в 2005 г. оно вошло в состав издательства *Jones & Bartlett*. Является автором монографий *Essential GENES* и *CELLS*.



Джоселин Кребс. После окончания Бард-колледжа в Аннандейл-на-Гудзоне ей была присуждена степень PhD по специальности «биология». Ученую степень доктора по специальности «молекулярная и клеточная биология» Джоселин получила в Калифорнийском университете в Беркли. Ее диссертация была посвящена исследованию

роли ДНК-топоизомераз и инсуляторных элементов генома в регуляции транскрипции.

Будучи стипендиатом American Cancer Society, она занимала должность постдока на медицинском факультете Массачусетского университета в лаборатории Крэга Петерсона, в которой исследовала роль ацетилирования гистонов и хроматиновых перестроек в транскрипции. В 2000 г. Д. Кребс пришла в отдел биологии университета на Аляске в Анкоридже, где в настоящее время занимает должность адъюнкт-профессора. Она руководит исследовательской группой, изучающей роль структурных и функциональных изменений хроматина в транскрипции и репарации ДНК у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также роль хроматиновых перестроек в эмбриогенезе *Xenopus*. Д. Кребс ведет курс молекулярной биологии для студентов и выпускников университета, студентов-медиков первого года обучения, а также преподает курсы молекулярной биологии опухолевого роста, генетики и основ биологии. Она живет в г. Игл-Ривер на Аляске со своим сыном в доме, полном собак и кошек. В свободное время увлекается пешеходным туризмом и катанием на лыжах.



Эллиотт С. Голдштейн получил степень бакалавра по биологии в Хартфордском университете (Коннектикут), а диссертацию на соискание ученой степени PhD по генетике защитил в университете Миннесоты на факультете генетики и клеточной биологии. После защиты диссертации был удостоен стипендии постдока в НИИ и начал работать в MIT в лаборатории Шелдона Пенмана.

Из Бостона он переехал в университет Аризоны в Темпе, где в настоящее время занимает должность адъюнкт-профессора, участвуя в программе по молекулярной и клеточной биологии на биологическом факультете, а также в программе Honors Disciplinary. Область его научных интересов составляют исследования, связанные с молекулярными и эволюционными механизмами в раннем эмбриогенезе у *Drosophila melanogaster*. В последние годы он исследует аналоги протоонкогенов человека *jun* и *fos*, существующие у *Drosophila*. Преподавательская деятельность Э. Голдштейна включает чтение курса по общей генетике для студентов и курса молекулярной генетики для выпускников университета. Он женат на своей школьной подруге, имеет троих детей и двух внуков. Очень любит копаться в книгах, а также занимается подводной фотографией. Его снимки можно найти на сайте <http://www.public.asu.edu/~elliotg/>.



Стивен Т. Килпатрик. Степень BS по биологии получил в колледже Истер (сейчас университет Истер) в Сен-Дэвисе (Пенсильвания), а степень PhD по экологии и эволюционной биологии — в Брауновском университете. Его диссертация посвящена исследованиям в области популяционной генетики, а имен-

но выяснению взаимосвязи между митохондриальным и ядерным геномом. С 1995 г. преподает в Питтсбургском университете в Джонстауне (Пенсильвания). В круг его преподавательской деятельности входит чтение курса основ биологии и введения в общую биологию. Он также ведет курсы генетики, эволюции, молекулярной генетики и биостатистики для выпускников. Является руководителем нескольких студенческих работ в области эволюционной генетики. Учебная работа является основной в деятельности С.Т. Килпатрика. Он участвовал

в создании учебных пособий по курсу основ биологии, генетики и молекулярной генетики и публикует статьи по методике преподавания биологических дисциплин. Для своих студентов в Питт-Джонстауне д-р Килпатрик подготовил много материалов, предназначенных для активного усвоения ими основ биологии, генетики и эволюции. Он живет в Джонстауне с женой и тремя детьми. В свободное время любит слушать музыку и читать. Увлекается театром и время от времени участвует в выступлениях местных театральных трупп.

Редакторы глав

Эстер Зигфрид (Esther Siegfried) работала над настоящей книгой, будучи преподавателем Питтсбургского университета в Джонстауне. В настоящее время занимает должность ассистент-профессора по специальности «биология» в Пенсильванском университете в Алтуне. Занимается изучением путей внутриклеточных систем передачи сигналов в процессе развития *Drosophila*.

Джон Бранштейн (John Brunstein) является ассистент-профессором в отделе патологии и лабораторных исследований в университете Британской Колумбии. Круг его научных интересов составляет разработка новых и оценка существующих молекулярно-диагностических методов и внедрение их в клиническую практику.

Доналд Форсдайк (Donald Forsdyke), почетный профессор биохимии в университете Куинс в Канаде. Занимался исследованием генной активности в процессе активации/инактивации лимфоцитов. В 1990 г. получил экспериментальные доказательства справедливости своей гипотезы о происхождении интронов, выдвинутой в 1981 г. За подтверждение гипотезы о положительной селекции в процессе созревания лимфоцитов, предложенной им в 1975 г., австралийские иммунологи были удостоены Нобелевской премии. Он является автором ряда монографий: *The Origin of Species, Revised* (2001), *Evolutionary Bioinformatics* (2006) и *“Treasure Your Expectations”: The Science and Life of William Bateson* (2008).

Хэнк В. Басс (Hank W. Bass), адъюнкт-профессор по специальности «биология» в университете Флориды. В его лаборатории проводятся исследования структуры и функции мейотических хромосом и теломер кукурузы методами молекулярной цитологии и генетики.

Стивен Д. Белл (Stephen D. Bell), профессор по специальности «микробиология» в Институте патологии Уильяма Данна в Оксфордском университете. В его группе исследуются процессы транскрипции генов, репликации ДНК и клеточного деления у архей.

Сёрен Йоханнес Сёренсен (Søren Johannes Sørensen), профессор биологического факультета и руководитель отдела микробиологии в университете Копенгагена. Основное направление исследований — оценка генетических сдвигов в природных сообществах и их реакция на изменение условий существования. Для выяснения способности сообществ микроорганизмов к восстановлению функций и их устойчивости к внешним воздей-

ствиям используются такие методы, как градиентный электрофорез в денатурирующих условиях (DGGE) и пиросеквенирование (или «секвенирование путем синтеза»). Д-р Сёренсен более 20 лет преподает молекулярную микробиологию выпускникам университета.

Ларс Хестбьёрг Хансен (Lars Hestbjerg Hansen), адъюнкт-профессор кафедры микробиологии биологического факультета университета в Копенгагене. Его научные интересы сосредоточены на вопросах устойчивости и передачи плазмидной ДНК у бактерий, особенно в связи с их устойчивостью к антибиотикам. Для изучения процесса передачи плазмид и их устойчивости в лаборатории Л. Х. Хансена разработан и успешно используется новый метод проточной цитометрии. Л. Х. Хансен является научным руководителем группы геномики прокариот, входящей в состав отдела пиросеквенирования. В задачу группы входит изучение разнообразия бактерий и плазмид в природных условиях их существования.

Барбара Фаннелл (Barbara Funnell), профессор по специальности «молекулярная генетика» в университете Торонто. В возглавляемой ею лаборатории изучается динамика хромосом у бактерий и главным образом механизм действия белков, участвующих в сегрегации плазмид и хромосом.

Питер Бёргерс (Peter Burgers), профессор биохимии и молекулярной биофизики на медицинском факультете Вашингтонского университета. В его лаборатории на протяжении длительного периода ведутся исследования биохимии и генетики репликации ДНК у эукариот, а также реакции ДНК на повреждения и репликативный стресс, приводящий к мутагенезу и остановке клеточного цикла.

Ханна Л. Клейн (Hannah L. Klein), профессор по специальности «биохимия, медицина и патология» в медицинском центре Лангона при университете в Нью-Йорке. Она занимается вопросами репарации и рекомбинации ДНК, а также стабильности генома.

Саманта Хут (Samantha Hoot), постдок в лаборатории Ханна Клейн в медицинском центре Лангона в Нью-Йорке. Ученая степень PhD была присуждена ей в Вашингтонском университете. В круг ее научных интересов входит исследование роли рекомбинационных процессов в стабильности генома у дрожжей и выяснение молекулярных механизмов, определяющих устойчивость к лекарственным средствам у патогенных грибов.

Дэмон Лиш (Damon Lisch), адъюнкт-исследователь Калифорнийского университета в Беркли. Область его научных интересов — регуляция экспрессии генов транспозонами и их роль в эволюции генома растений. В возглавляемой им лаборатории исследуются основные характеристики и эпигенетическая регуляция системы транспозонов *Mutator* у кукурузы и других растений.

Паоло Касали (Paolo Casali), MD, профессор медицины, молекулярной биологии и биохимии и директор Института иммунологии в Калифорнийском университете, Ирвайн. Его исследования затрагивают вопросы дифференцировки В-лимфоцитов и регуляции экспрессии генов, продуцирующих антитела, в также молекулярные механизмы образования аутоантител. С 2002 г. является главным редактором журнала *Autoimmunity*. Стоит членом Американской ассоциации иммунологов. Введен в состав Американского общества клинических исследований, а также является членом AAAS. Принимал участие в работе ряда секций NIH по иммунологии и в научных дискуссиях.

Ричард Горс (Richard Gourse), профессор на факультете бактериологии Висконсинского университета в Мэдисоне и редактор *Journal of Bacteriology*. В круг его научных интересов входит исследование вопросов инициации транскрипции и регуляции экспрессии генов у бактерий. Лаборатория, работающая под его руководством, в течение ряда лет исследовала промоторы рРНК, а также контроль синтеза рибосом, которые являются фундаментальными механизмами транскрипции и трансляции.

Сян-Донг Фу (Xiang-Dong Fu), профессор по специальности «молекулярная и клеточная медицина» в Калифорнийском университете, Сан-Диего. В его лаборатории исследуются механизмы, лежащие в основе конститутивного и регулируемого сплайсинга пре-мРНК в клетках млекопитающих, сопряжения между транскрипцией и процессингом РНК, а также вопросы геномики и роли процессинга в развитии организмов и в патогенезе различных заболеваний.

Эллен Бекер (Ellen Baker), адъюнкт-профессор биологии в университете Невады, Рено. Круг ее научных интересов затрагивает вопросы полиаденилирования в стабильности и трансляции мРНК.

Дуглас Дж. Брайант (Douglas J. Briant) преподает в университете Виктории, Британская Колумбия. Его исследования посвящены процессингу РНК у бактерий и роли процесса убиквитинирования в функционировании системы внутриклеточной передачи сигналов.

Шерил Келлер Капоне (Cheryl Keller Capone), инструктор отдела биологии в Пенсильванском университете и преподаватель клеточной и молекулярной биологии. Ее научные интересы сосредоточены на исследовании процессов развития мышц у *Drosophila melanogaster* в эмбриогенезе, а также молекулярных механизмов кластеризации и постсинаптического адресования рецепторов ГАМК_A.

Джон Перона (John Perona), профессор биохимии факультета химии и биохимии и руководитель межфакультетской программы по молекулярной биологии и геной инженерии Калифорнийского университета в Санта-Барбаре. В возглавляемой им лаборатории исследуются структурно-функциональные взаимоотношения и каталитические механизмы аминоксил-тРНК-синтетаз, ферменты, модифицирующие аминокислоты и зависимые от тРНК, и ферменты, модифицирующие саму тРНК.

Лискин Свинт-Крузе (Liskin Swint-Kruse), ассистент-профессор по специальности «биохимия и молекулярная биология» медицинского факультета университета Канзаса. Она исследует регуляторы транскрипции у бактерий. Эти исследования связывают биофизические аспекты с анализом семейства репрессоров транскрипции с помощью биоинформатики, с целью выявления основных принципов конструирования белков.

Тригве Толлефсбол (Trygve Tollefsbol), профессор биологии в университете Алабамы в Бирмингеме и старший научный сотрудник геронтологического центра, центра комплексных онкологических исследований и исследовательского центра лечебного питания. В течение долгого времени исследовал эпигенетические механизмы и особенно их роль в развитии рака, а также при дифференцировке и старении. Является редактором и автором ряда монографий, например *Epigenetic Protocols*, *Cancer Epigenetics* и *Epigenetics of Aging*.

Краткое оглавление

Посвящение 5

Предисловие 6

Об авторах 9

Редакторы глав 11

ЧАСТЬ 1. ГЕНЫ И ХРОМОСОМЫ 14

Глава 1. Гены — это ДНК 15

Глава 2. Гены несут информацию о строении белков 39

*Редактор Эстер Зигфрид,
Университет штата Пенсильвания в Алтуне*

Глава 3. Методы молекулярной биологии и генной инженерии 55

*Редактор Джон Бранштейн,
Университет Британской Колумбии*

Глава 4. Прерывистый ген 89

Редактор Доналд Форсдайт, Университет Куинс

Глава 5. Структура генома 107

Глава 6. Структура генома и число генов 127

Глава 7. Кластеры и повторы 147

Глава 8. Эволюция генома 167

Глава 9. Хромосомы 195

Редактор Хэнк В. Басс, Университет штата Флорида

Глава 10. Хроматин 225

ЧАСТЬ 2. РЕПЛИКАЦИЯ И РЕКОМБИНАЦИЯ ДНК 264

Глава 11. Репликон 265

Редактор Стивен Д. Белл, Оксфордский университет

Глава 12. Внехромосомные репликоны 283

Редакторы Сёрен Йоханнес Сёренсен и Ларс Хестбьёрг Хансен, Университет Копенгагена

Глава 13. Взаимосвязь между репликацией и клеточным циклом у бактерий 301

Редактор Барбара Фаннелл, Университет Торонто

Глава 14. Репликация ДНК 321

Редактор Питер Бёргерс, медицинский факультет Вашингтонского университета

Глава 15. Гомологичная и сайт-специфичная рекомбинация 347

Редакторы Ханна Л. Клейн и Саманта Хут, Медицинский центр Лангона Нью-Йоркского университета

Глава 16. Системы репарации 387

Глава 17. Транспозоны и ретровирусы 415

Редактор Дэмон Лиш, Университет штата Калифорния, Беркли

Глава 18. Соматическая рекомбинация и гипермутации в клетках иммунной системы 451

Редактор Паоло Касали, Институт иммунологии Калифорнийского университета, Ирвайн

ЧАСТЬ 3. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ И ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ 492

Глава 19. Транскрипция у прокариот 493

Редактор Ричард Горс, Университет штата Висконсин, Мэдисон

Глава 20. Транскрипция у эукариот 533

Глава 21. Сплайсинг и процессинг РНК 559

Редактор Сян-Донг Фу, медицинский факультет Университета штата Калифорния, Сан-Диего

Глава 22. Стабильность и локализация мРНК 601

Редактор Эллен Бекер, Университет штата Невада, Рено

Глава 23. Каталитическая РНК 625

Редактор Дуглас Дж. Брайант, Университет Виктории

Глава 24. Синтез белка 649

Редактор Шерил Келлер Капоне, Университет штата Пенсильвания

Глава 25. Использование генетического кода 687

Редактор Джон Перона, Университет штата Калифорния, Санта-Барбара

ЧАСТЬ 4. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ 716

Глава 26. Оперон 717

Редактор Лискин Свинт-Крузе, медицинский факультет Университета штата Канзас

Глава 27. Стратегии бактериофагов 749

Глава 28. Регуляция транскрипции у эукариот 775

Глава 29. Эпигенетические эффекты наследуются 807

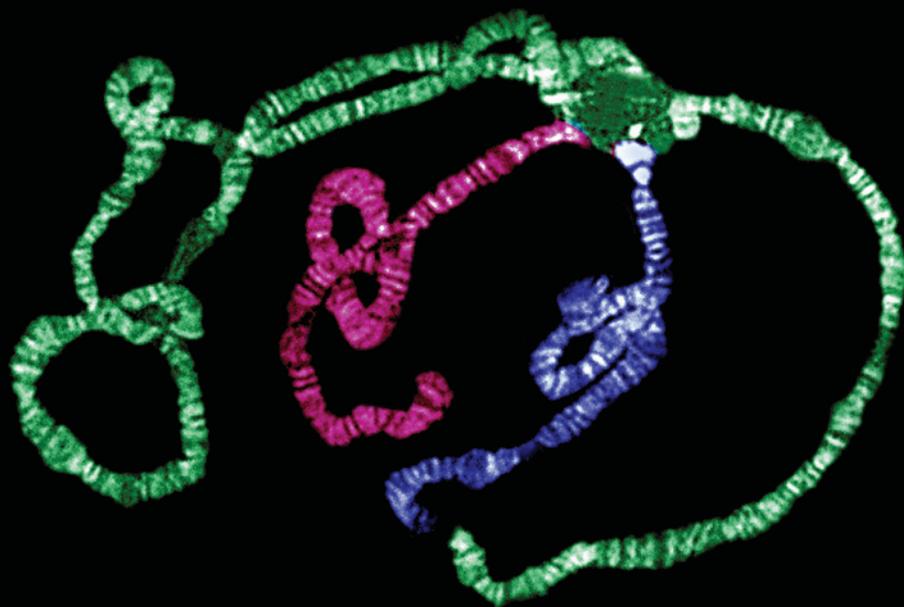
Редактор Тригве Толлефсбол, Университет штата Алабама, Бирмингем

Глава 30. Регуляторная РНК 839

Словарь терминов 857

Предметный указатель 881

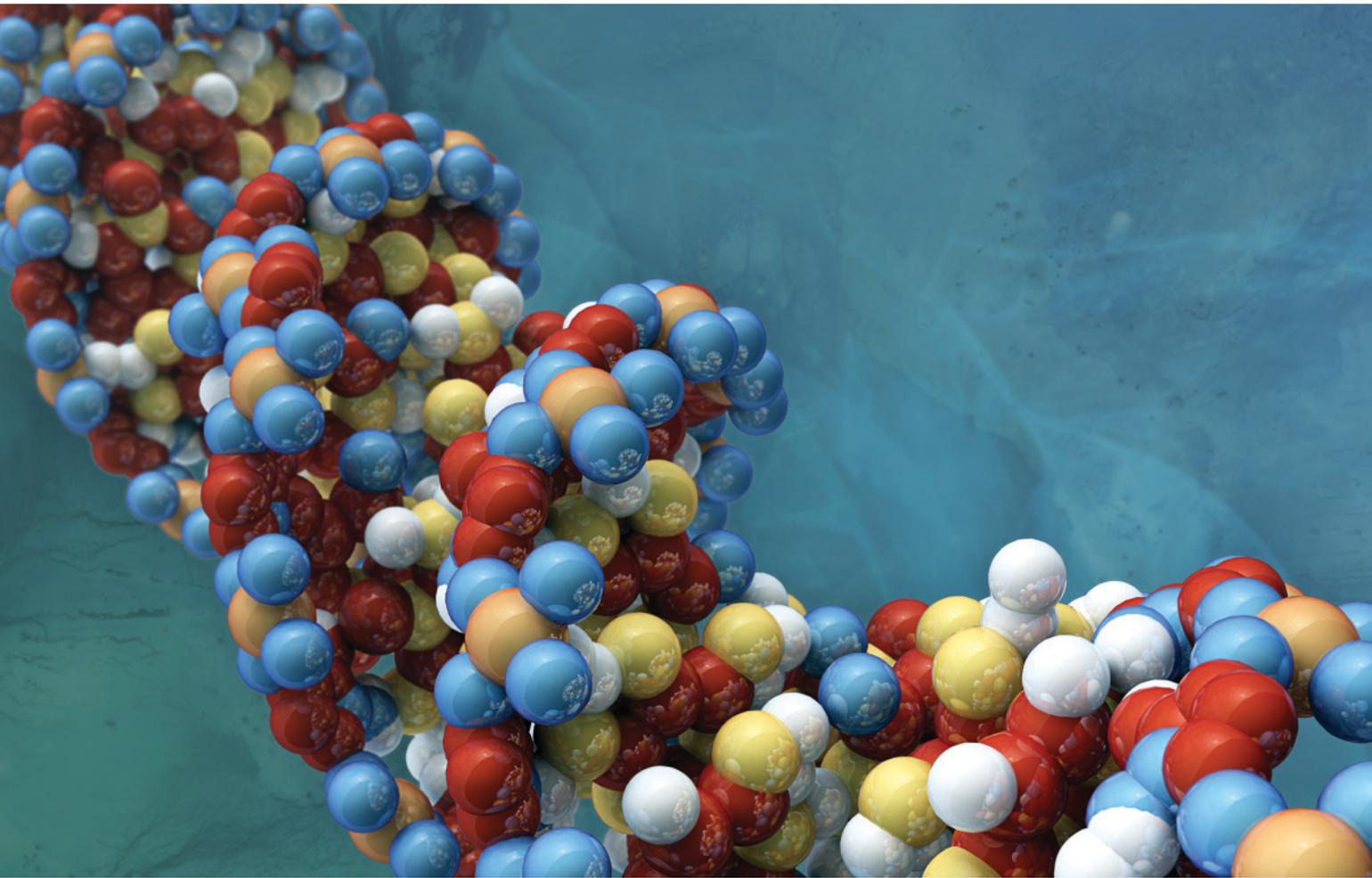
Гены и хромосомы



- 1 Гены — это ДНК
- 2 Гены несут информацию о строении белков
- 3 Методы молекулярной биологии и геной инженерии
- 4 Прерывистый ген
- 5 Структура генома
- 6 Структура генома и число генов
- 7 Кластеры и повторы
- 8 Эволюция генома
- 9 Хромосомы
- 10 Хроматин

Фотография любезно предоставлена S.V. Flores, A. Мена и В.Е. McAllister. С разрешения Bryant McAllister, Department of Biology, University of Iowa

Гены — это ДНК



1.1 Введение

1.2 ДНК — генетический материал бактерий и вирусов

- Первые доказательства того, что генетический материал бактерий представляет собой ДНК, были получены в экспериментах по трансформации бактерий. При добавлении ДНК, выделенной из одного штамма бактерий, к другому штамму последнему передаются и генетические признаки первого штамма.
- Эксперименты по заражению бактерий фагами свидетельствуют о том, что генетический материал некоторых вирусов также представляет собой ДНК. При мечении разными радиоактивными изотопами ДНК и белков бактериофага было показано, что потомкам фаговых частиц передается только ДНК.

1.3 ДНК — генетический материал клеток эукариот

- ДНК можно использовать для придания новых признаков как отдельным клеткам животных, так и целым организмам.
- Генетический материал некоторых вирусов представлен РНК.

1.4 Полинуклеотидные цепи состоят из азотистых оснований, связанных с сахарофосфатным остовом

- Нуклеозиды состоят из пуриновых или пиримидиновых оснований, связанных в первой позиции с пятиуглеродным сахаром (пентозой).
- Чтобы различать позиции атомов углерода, входящих в состав азотистого основания и пентозного кольца, атомы сахара обозначают штрихом (').
- ДНК и РНК отличаются химической группой в положении 2' сахарного кольца: в ДНК это водород (что дает дезоксирибозу), а в РНК — гидроксил (получаем рибозу).
- Нуклеотид состоит из нуклеозида, связанного с фосфатной группой в 5'- или 3'-положении (дезокси)рибозы.
- Каждая последующая субъединица полинуклеотидной цепи соединяется своей 5'-позицией через фосфатную группу с 3'-позицией предыдущего сахара.
- Один из концов цепи называют 5'-конец, а противоположный — 3'-конец.
- ДНК содержит четыре основания — аденин, гуанин, цитозин и тимин; в РНК вместо тимина — урацил.

1.5 Сверхспирализация затрагивает структуру ДНК

- Сверхспиральная структура характерна только для замкнутой ДНК, не имеющей свободных концов.
- Замкнутая ДНК обладает кольцевой структурой или представляет собой линейную молекулу, концы которой фиксированы таким образом, что их вращение невозможно.
- Молекула замкнутой ДНК характеризуется параметром, который называется «порядок зацепления» (L) и представляет собой сумму двух других параметров — числа витков двойной спирали (T) и сверхвитков (W).
- Порядок зацепления изменяется только при внесении разрыва в цепь ДНК с последующим изменением топологии.

1.6 Структура ДНК представлена двойной спиралью

- В-форма ДНК представлена двойной спиралью, состоящей из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей.
- Азотистые основания каждой цепи состоят из плоских пуриновых или пиримидиновых колец, обращенных друг к другу и соединенных посредством водородных связей в пары А–Т или G–C.
- Диаметр двойной спирали составляет 20 Å. Полный оборот спирали включает 10 пар оснований (10,4 пары для ДНК в растворе) и происходит на промежутке длиной в 34 Å.
- Двойная спираль формирует основную (большую) и второстепенную (малую) бороздку.

1.7 Процесс репликации ДНК полуконсервативен

- Эксперимент Мезельсона–Сталя, основанный на мечении ДНК тяжелыми изотопами, доказал, что в реакции репликации консервативным элементом ДНК служит одна из полинуклеотидных цепей.
- Каждая цепь ДНК-дуплекса служит матрицей для синтеза дочерней цепи.
- Последовательность нуклеотидов, составляющих дочернюю цепь, комплементарна последовательности материнской цепи.

1.8 Полимеразы проявляют активность в том месте, где цепи ДНК разделены и которое называют репликативной вилкой

- Репликацию ДНК контролирует комплекс ферментов, разделяющих материнские цепи и синтезирующих дочерние.
- Репликативная вилка — это точка, в которой разделяются цепи материнской ДНК.
- Ферменты, осуществляющие синтез ДНК, называют ДНК-полимеразами, а ферменты, синтезирующие РНК, — РНК-полимеразами.
- Разрушение нуклеиновых кислот осуществляют ферменты нуклеазы; нуклеазы принято делить на ДНКазы и РНКазы, обладающие эндо- или экзонуклеазной активностью.

1.9 Генетическая информация может быть закодирована в ДНК или РНК

- Большинство геномов представляют собой ДНК, однако геномы вирусов и виридов могут состоять из РНК.
- Перевод информации из ДНК в РНК происходит в результате транскрипции, а из РНК в ДНК — в ходе обратной транскрипции.
- Трансляция РНК в белок однонаправленна.

1.10 Нуклеиновые кислоты гибридизуются в соответствии с принципом комплементарности

- Нагревание приводит к разделению цепей ДНК-дуплекса.
- Температура плавления T_m — это температура разделения цепей дуплекса.
- Комплементарные одноцепочечные молекулы ДНК при понижении температуры могут ренатурировать (с образованием дуплекса).
- Процессы денатурации (плавления) и ренатурации (гибридизации) могут происходить как между однотипными молекулами, так и между молекулами

разного типа. При этом могут формироваться дуплексы ДНК–ДНК, РНК–ДНК и РНК–РНК.

- Способность двух одноцепочечных нуклеиновых кислот гибридизоваться зависит от степени их комплементарности.

1.11 Мутации изменяют последовательность ДНК

- Мутации — это изменения в последовательности ДНК.
- Мутации возникают спонтанно или могут быть спровоцированы мутагенами.

1.12 Мутации могут затрагивать отдельные пары оснований или более длинные последовательности

- Точечные мутации изменяют отдельные пары оснований.
- Точечные мутации могут быть результатом химического превращения одного основания в другое или могут возникать в результате ошибок репликации.
- Замену пары G–C на A–T (или наоборот) называют транзицией.
- Замену пурина на пиримидин (например, A–T на T–A) называют трансверсией.
- Короткие инсерции (вставки) и/или делеции — самый распространенный тип мутаций — происходят в результате перемещения мобильных элементов.

1.13 Эффекты мутаций могут быть обратимы

- Прямые мутации инактивируют ген, а обратные мутации (реверсии) способны компенсировать эти эффекты.

1.1 Введение

Носителем наследственных признаков каждого живого организма является **геном**: протяженная последовательность ДНК, в которой находится вся генетическая информация организма. В состав генома входит ДНК хромосом или плазмид, а у эукариот — ДНК органелл, которая содержится в митохондриях и хлоропластах. Мы пользуемся термином «информация», поскольку геном как таковой непосредственно не участвует в построении организма. Последнее обеспечивается последовательностью отдельных субъединиц, или оснований, ДНК. Все белки организма образуются с участием ДНК в нужное время и в нужном месте за счет протекания сложной цепи реакций.

Белки характеризуются множеством функций, важных для развития и функционирования организмов. Так, формируя структуры клетки, белки обеспечивают структуру организмов, участвуют в жизненно важных метаболических процессах и в качестве факторов транскрипции и рецепторов выступают в роли ключевых компонентов внутриклеточных систем передачи сигналов.

Физически геном состоит из набора различных молекул ДНК, или **хромосом**. Таким образом, геном пред-

- Эффект от инсерции может быть исправлен делецией вставленного участка, тогда как делеция практически необратима.
- Когда мутация в одном гене сводит на нет эффект от мутации в другом гене, говорят об эффекте подавления (супрессии).

1.14 Мутации наиболее часты в «горячих точках» генома

- На большей части генома вероятность возникновения мутаций статистически примерно одинакова, однако в «горячих точках» эта вероятность может возрастать на порядки.

1.15 Большинство «горячих точек» появляется в результате модификации оснований

- Спонтанное дезаминирование, в результате которого происходит превращение 5-метилцитозина в тимин, — одна из наиболее частых причин возникновения «горячих точек».
- «Горячие точки» могут возникать при увеличении копийности коротких tandemно повторяющихся последовательностей.

1.16 Некоторые элементы наследственности чрезвычайно малы

- Некоторые очень маленькие элементы наследственности не кодируют собственных белков, однако, представляя собой РНК или белок, обладают наследственным потенциалом.

1.17 Резюме

ставляет собой последовательность ДНК, входящей в каждую хромосому. Функционально геном состоит из генов. Каждый ген представляет собой последовательность ДНК, кодирующую определенный вид РНК или определенный полипептид. В каждой из хромосом, которые составляют геном, содержится большое количество различных генов. Геном организма может содержать от 500 генов (микоплазма, некоторые виды бактерий) до 20 000–25 000 (у человека), а в клетках риса число генов приближается к 50 000–60 000.

В этой части книги мы попытаемся проанализировать свойства гена, основываясь на базовых представлениях о его молекулярной организации. На **РИС. 1.1** приведены основные исторические этапы развития концепции гена, начиная с первых теоретических воззрений и заканчивая современными данными о структуре генома.

Первое представление о гене как о функциональной единице появилось после доказательства того, что каждый отдельно взятый ген ответственен за производство определенного белка. Различия в химической структуре ДНК, из которой состоит ген, и химической структуре белков послужили развитию концепции генетического кода. Это, в свою очередь, привело к открытию сложного аппарата, осуществляющего перевод последовательно-



РИС. 1.1 Краткая история генетики

сти ДНК в последовательность аминокислот полипептидной цепи белка.

С пониманием процесса экспрессии гена представления о его структуре и функциях стали значительно более полными. На РИС. 1.2 представлен основной предмет обсуждения данной книги. Ген — это фрагмент последовательности ДНК, в котором закодирована информация о структуре другой нуклеиновой кислоты — РНК. Ген — это фрагмент последовательности ДНК, непосредственно участвующий в синтезе одноцепочечной РНК. Последовательность РНК определяется последовательностью одной из двух полинуклеотидных цепей ДНК. В свою очередь, часто РНК непосредственно участвует в синтезе полипептидов. В случае генов, кодирующих рРНК и тРНК, образующиеся продукты выполняют свои функции в виде РНК. Таким образом, ген — это последовательность ДНК, которая кодирует РНК, а в случае генов, кодирующих определенный белок (**структурных генов**), последняя, в свою очередь, непосредственно участвует в его синтезе.

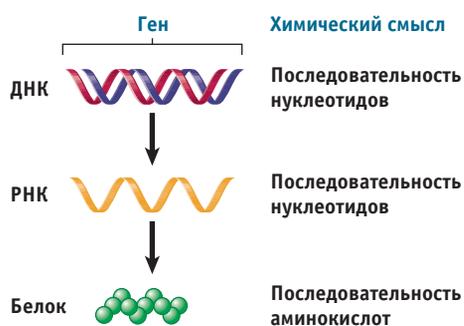


РИС. 1.2 Гены кодируют РНК, которая, в свою очередь, может кодировать белок

От иллюстрации того, что ген представляет собой фрагмент ДНК, а хромосомы — это длинные цепи ДНК, содержащие множество генов, мы перейдем к рассмотрению общей организации генома, но уже с позиции последовательности ДНК. В гл. 4 («Прерывистый ген») мы более детально рассмотрим строение гена и его участие в синтезе белка. В гл. 5 («Структура генома») мы рассмотрим все разнообразие генов и, наконец, в гл. 7 («Кластеры и повторы») обсудим другие компоненты генома и механизмы поддержания его целостности.

1.2 ДНК — генетический материал бактерий и вирусов

Основные положения

- Первые доказательства того, что генетический материал бактерий представляет собой ДНК, были получены в экспериментах по трансформации бактерий. При добавлении ДНК, выделенной из одного штамма бактерий, к другому штамму последнему передаются и генетические признаки первого штамма.
- Эксперименты по заражению бактерий фагами свидетельствуют о том, что генетический материал некоторых вирусов также представляет собой ДНК. При мечении разными радиоактивными изотопами ДНК и белков бактериофага было показано, что потомкам фаговых частиц передается только ДНК.

Открытие Фредериком Гриффитом процесса бактериальной трансформации в 1928 г. послужило развитию идеи о том, что нуклеиновые кислоты служат генетическим материалом. Бактерия *Пневмосoccus* вызывает у мышей пневмонию. Вирулентность этой бактерии обусловлена **капсульным полисахаридом**. Этот компонент клеточной стенки позволяет бактерии избегать воздействия защитной системы организма. Разные типы пневмококков (I, II и III) содержат различные капсульные полисахариды. Они образуют гладкие колонии, обозначаемые буквой S (от *англ.* smooth — гладкий).

Каждый пневмококк S-типа может производить дочерние бактерии, в которых механизм производства полисахарида оболочки нарушен. Эти бактерии обозначаются буквой R (от *англ.* rough — грубый) и имеют шероховатую поверхность (состоящую из материала, расположенного под полисахаридом оболочки). Эти пневмококки **авирулентны**. Они не способны вызвать заболевание, поскольку недостаток полисахарида делает их уязвимыми.

Если подвергнуть бактерии S-типа температурному воздействию, они погибнут и потеряют способность причинять мышам вред. Однако погибшие S-бактерии вместе с непатогенными живыми R-бактериями демонстрируют совсем иные свойства, нежели каждая из них по отдельности. На РИС. 1.3 показано, что при инъекции смеси таких бактерий животное вскоре погибает от пневмонии, а после смерти из мышей можно выделить патогенные бактерии S-типа.

В этом эксперименте нежизнеспособные S-бактерии относились к типу III. Живые R-бактерии были полу-

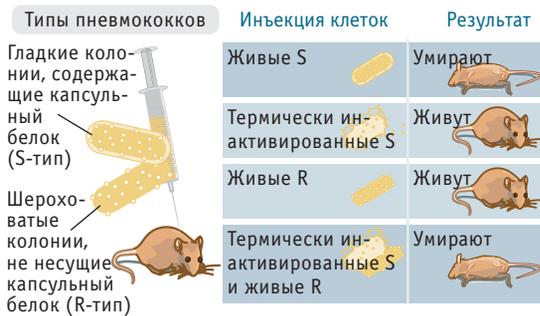


РИС. 1.3 Ни термически инактивированные бактерии S-типа, ни живые R-типа не могут убить мыш, однако их одновременная инъекция убивает мыш так же эффективно, как живые бактерии S-типа

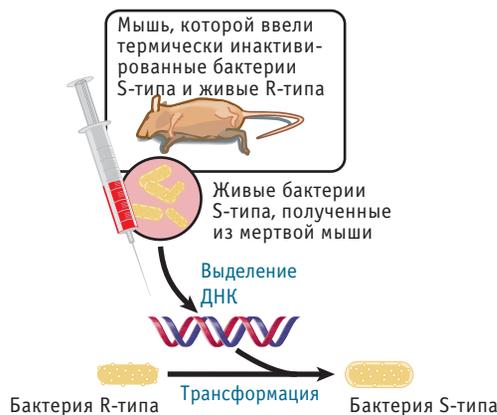


РИС. 1.4 ДНК бактерий S-типа может трансформировать бактерии R-типа в S-тип

ченны из пневмококков типа II. Вирулентные бактерии, выделенные из мертвых мыш, после заражения такой смешанной инфекцией имели гладкую оболочку, т. е. относились к типу III. Так, нежизнеспособные IIIS-бактерии трансформировали живые бактерии IIR-типа, причем последние становились способными синтезировать капсулярные полисахариды и приобретали вирулентность.

На **РИС. 1.4** показан процесс выделения компонента инактивированных бактерий, ответственного за трансформацию. Этот компонент был назван **трансформирующим фактором**. Он был очищен благодаря созданию бесклеточной системы, в которой фактор, выделенный из инактивированной бактерии S-типа, можно было добавлять к живым бактериям R-типа до посева на агар и исследования трансформирующей активности (**РИС. 1.5**). В результате очистки трансформирующего фактора Эвери, МакЛеод и МакКарти в 1944 г. показали, что он представляет собой **дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК)**.

После эксперимента с бактериями, показавшего, что их генетический материал представлен ДНК, исследователи продемонстрировали, что ДНК служит источником генетической информации и в совершенно иной системе. Фаг T2 — это вирус, способный заражать бактерию

Escherichia coli. При добавлении фага (вируса) в культуру *E. coli* его частицы адсорбируются на внешней поверхности бактерий, часть вирусного материала проникает внутрь клетки, после чего, примерно через 20 мин, бактерия погибает (лизировается), высвобождая огромное количество дочерних фагов.

На **РИС. 1.6** показаны результаты эксперимента Альфреда Херши и Марты Чейз по заражению *E. coli* фагом T2, проведенного в 1952 г. В эксперименте разные компоненты фага были помечены различными радиоактивными метками. ДНК была помечена изотопом ^{32}P , а белки — изотопом ^{35}S . Смесь бактерий при помощи центрифугирования разделили на две фракции. Одна фракция содержала пустые фаговые оболочки с поверхности *E. coli*, а другая — инфицированные бактерии. Предварительно было показано, что фаг реплицируется в клетке и, таким образом, при заражении его генетический материал должен поступать в клетку.

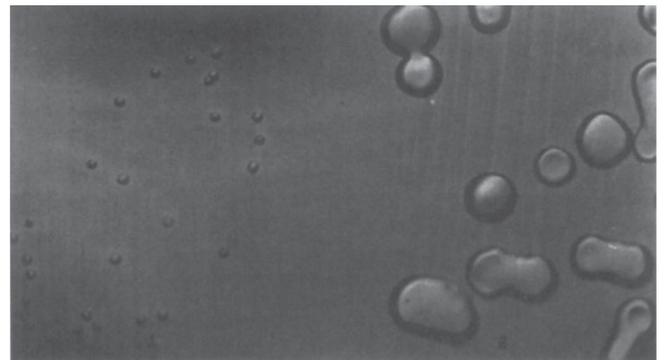


РИС. 1.5 Колонии R-бактерий (слева) и S-бактерий (справа) *S. pneumoniae*. © Avery, et al., 1944. The Journal of Experimental Medicine, 79: 137–158. С разрешения Rockefeller University Press

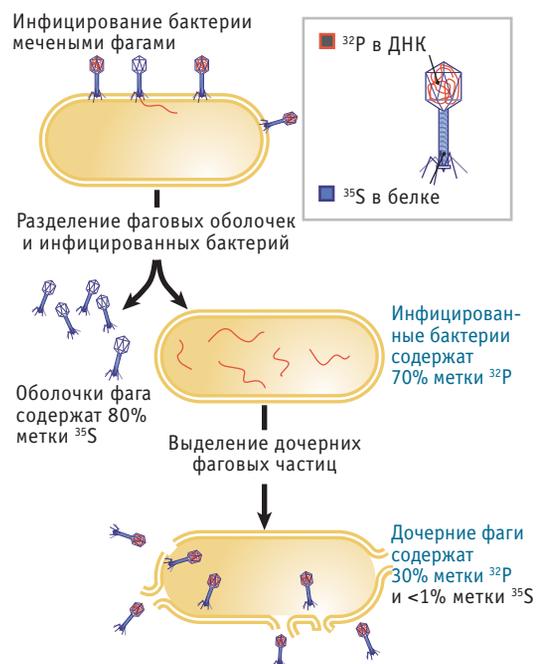


РИС. 1.6 Генетический материал фага T2 представлен ДНК

Метка ^{32}P (метка ДНК) большей частью оказалась во фракции с инфицированными бактериями. Дочерние фаги содержали около 30% от исходного количества метки ^{32}P и менее 1% от исходного количества меченого белка. «Тени» фага содержали белок и, как следствие, изотоп ^{35}S . Таким образом, эксперимент показал, что в бактерию попадает только ДНК материнского фага, которая затем становится частью дочерних фагов. Эта модель продемонстрировала передачу генетического материала фагов по наследству.

Размножение фага происходит за счет ресурсов клетки-хозяина. Фаг обладает генетическим материалом, аналогичным генетическому материалу клетки: его особенности точно воспроизводятся и подчиняются тем же универсальным правилам. Эксперимент с фагом T2 подтверждает основной постулат: ДНК — это генетический материал, вне зависимости от того, является она геномом клетки или вирусом.

1.3 ДНК — генетический материал клеток эукариот

Основные положения

- ДНК можно использовать для придания новых признаков как отдельным клеткам животных, так и целым организмам.
- Генетический материал некоторых вирусов представлен РНК.

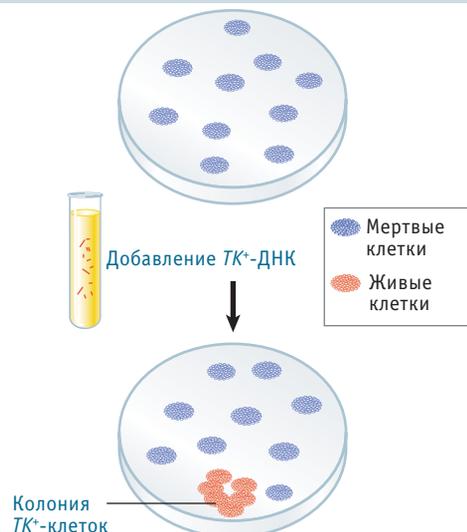
Если добавить ДНК к культуре эукариотических клеток, нуклеиновые кислоты могут проникать внутрь клеток и вызывать в некоторых из них синтез новых белков. Если при этом использовать фрагмент ДНК, несущий конкретный ген, его проникновение в клетку приведет к синтезу закодированного белка. На рис. 1.7 изображена одна из таких систем.

Несмотря на то что по историческим причинам процедура введения ДНК в клетки эукариот была названа **трансфекцией**, ее механизм в целом аналогичен бактериальной трансформации. ДНК, проникая в клетку-реципиент, становится частью ее генетического материала, и привнесенная информация передается по наследству так же, как это происходит с любой другой частью ДНК. Экспрессия нового участка ДНК придает клеткам новые свойства (в случае, изображенном на рис. 1.7, это способность синтезировать тимидинкиназу). Сначала такие эксперименты удавались только с индивидуальными клетками, выращенными в культуре. Однако впоследствии удалось ввести ДНК в яйцеклетки мышей и добиться того, чтобы введенная ДНК стала частью их генетического материала.

На основании таких экспериментов было доказано, что ДНК — генетический материал эукариот и что *при межвидовом переносе нуклеиновые кислоты могут сохранять способность выполнять свои функции*.

Как мы уже выяснили, ДНК — это генетический материал всех известных клеточных организмов и многих вирусов. Однако у некоторых вирусов генетический материал представлен *рибонуклеиновой кислотой* (РНК).

Клетки, дефицитные по гену *TK*, не способны продуцировать тимидинкиназу и погибают при отсутствии в среде тимидина



Ген *TK* интегрирует в некоторые клетки; потомки трансфицированных клеток формируют колонию

РИС. 1.7 При добавлении ДНК в культуру эукариотических клеток происходит трансфекция, в результате которой клетка может приобрести новый фенотип

Таким образом, основной принцип природы генетического материала состоит в том, что это всегда нуклеиновая кислота; а точнее — это всегда ДНК, за исключением РНК-содержащих вирусов.

1.4 Полинуклеотидные цепи состоят из азотистых оснований, связанных с сахарофосфатным остовом

Основные положения

- Нуклеозиды состоят из пуриновых или пиримидиновых оснований, связанных в первой позиции с пятиуглеродным сахаром (пентозой).
- Чтобы различать позиции атомов углерода, входящих в состав азотистого основания и пентозного кольца, атомы сахара обозначают штрихом (').
- ДНК и РНК отличаются химической группой в положении 2' сахарного кольца: в ДНК это водород (что дает дезоксирибозу), а в РНК — гидроксил (получаем рибозу).
- Нуклеотид состоит из нуклеозида, связанного с фосфатной группой в 5'- или 3'-положении (дезокси)рибозы.
- Каждая последующая субъединица полинуклеотидной цепи соединяется своей 5'-позицией через фосфатную группу с 3'-позицией предыдущего сахара.
- Один из концов цепи называют 5'-конец, а противоположный — 3'-конец.
- ДНК содержит четыре основания — аденин, гуанин, цитозин и тимин; в РНК вместо тимина — урацил.

Основной составной частью нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) является нуклеотид. Нуклеотид состоит из трех компонентов:

- азотистое основание;
- сахар (пентоза);
- одна или несколько фосфатных групп.

Азотистое основание содержит **пуриновое** или **пиримидиновое** кольцо и связано гликозидной связью (через N₉ у пуринов и N₁ у пиримидинов) с 1'-положением пятиуглеродного сахара. Если основание связано с пентозным остатком, такой продукт называют **нуклеозидом**. Чтобы избежать неясностей с нумерацией атомов гетероциклических колец и атомов сахара, позиции пентозного кольца отмечают штрихом (').

Тип сахара, включенного в состав нуклеотида, определяет название нуклеиновой кислоты. В нуклеотидах, составляющих ДНК, содержится 2'-дезоксирибоза, а в РНК — рибоза. Разница между рибозой и 2'-дезоксирибозой состоит в том, что в положении 2' у рибозы находится ОН-группа. Сахар может быть связан с фосфатной группой в 5'- или 3'-положении. Присоединение к нуклеозиду фосфатной группы дает **нуклеотид**.

Полинуклеотид состоит из длинной цепи нуклеотидов. На **РИС. 1.8** показано, что остовом полинуклеотидной цепи служит чередующаяся последовательность пятиуглеродных сахаров и фосфатов. Этот остов формируется путем соединения 5'-позиции одного сахара и 3'-позиции другого сахара через фосфатную группу. Таким образом, сахарофосфатный остов состоит из 5'-3'-фосфодиэфирных связей. 3'-атом углерода кольца пентозы связан с атомом кислорода фосфатной группы, а 5'-углеродный атом другого пентозного кольца — с атомом кислорода фосфатной группы, расположенной напротив. Азотистые же основания обращены в сторону от остова.

Каждая нуклеиновая кислота состоит из четырех типов оснований: два пуриновых и два пиримидиновых.

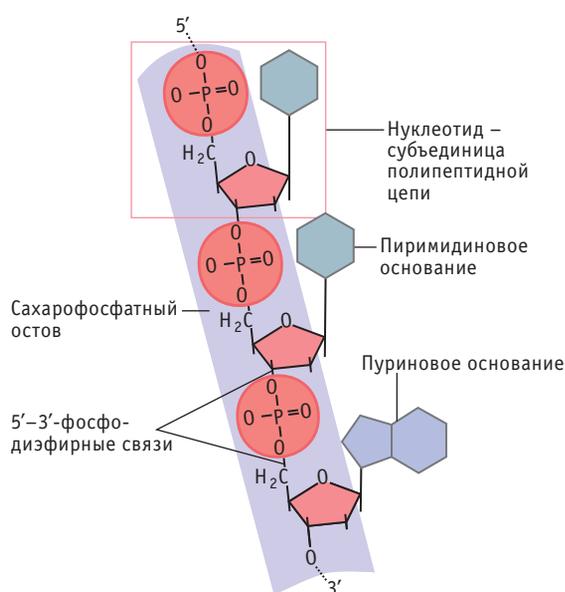


РИС. 1.8 Полинуклеотидная цепь состоит из серии 5'-3'-сахарофосфатных связей, формирующих остов, из которого «торчат» основания

Пуриновые основания — аденин и гуанин — присутствуют и в ДНК, и в РНК. Что же касается пиримидинов, то в состав ДНК входят цитозин и тимин, а в РНК вместо тимина содержится урацил. Единственное различие между урацилом и тиминим в том, что у урацила в позиции С₅ находится метильная группа. Основания обычно обозначают по первым буквам их названий: в ДНК — А, G, С и T; в РНК — А, G, С и U. У крайнего нуклеотида с одной стороны цепи находится свободная 5'-группа, а у крайнего с другой стороны — 3'-группа. Записывать последовательность нуклеиновых кислот принято в направлении от 5'-к 3'-концу, при этом располагая 5'-конец слева, а 3'-конец справа.

1.5 Сверхспирализация затрагивает структуру ДНК

Основные положения

- Сверхспиральная структура характерна только для замкнутой ДНК, не имеющей свободных концов.
- Замкнутая ДНК обладает кольцевой структурой или представляет собой линейную молекулу, концы которой фиксированы таким образом, что их вращение невозможно.
- Молекула замкнутой ДНК характеризуется параметром, который называется «порядок зацепления» (L) и представляет собой сумму двух других параметров — числа витков двойной спирали (T) и сверхвитков (W).
- Порядок зацепления изменяется только при внесении разрыва в цепь ДНК с последующим изменением топологии.

Цепи ДНК закручены друг относительно друга, образуя структуру двойной спирали (которая подробно рассматривается в следующем разделе); двойная спираль также может вращаться в пространстве относительно себя, тем самым изменяя пространственную конформацию, или **топологию**, молекулы ДНК. Это называют **сверхспирализацией**. Благодаря сверхспирализации в молекуле ДНК существуют напряжения, характерные для молекулы, не обладающей свободными концами (в противном случае их вращение привело бы к снятию напряжений), или для линейной ДНК (**РИС. 1.9, верху**), концы которой связаны с фиксирующими белковыми структурами, как это имеет место в хромосомах эукариот. Результат можно представить как резиновую ленту, закручивающуюся относительно себя. Простейшим примером ДНК без свободных концов является кольцевая молекула. Эффект сверхспирализации можно увидеть, сравнивая несверхспирализованную кольцевую ДНК, плоско лежащую (**рис. 1.9, в центре**), со сверхспирализованной кольцевой молекулой (**рис. 1.9, внизу**).

Последствия сверхспирализации зависят от того, в какую сторону закручена ДНК относительно себя. Если в ту же, что и две цепи внутри двойной спирали (по часовой стрелке), то это **положительная сверхспирализация** (positive supercoiling). Она заставляет цепи ДНК закручиваться друг относительно друга более плотно, с большим числом пар оснований на виток. Вращение ДНК относительно себя в противоположной ориентации по-

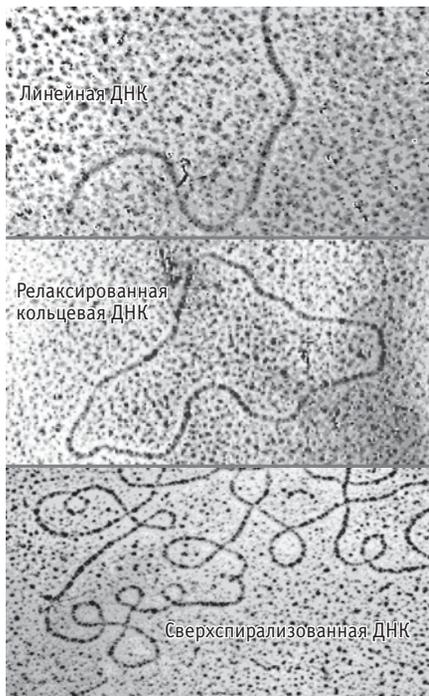


РИС. 1.9 Свободная линейная ДНК выглядит расправленной (вверху). Кольцевая ДНК выглядит расправленной, если она релаксирована, т. е. не содержит сверхвитков (в центре). Сверхспирализованная ДНК образует петли и выглядит конденсированной (внизу). Фотография любезно предоставлена Nirupam Roy Choudhury, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)

рождает *отрицательную сверхспирализацию* (negative supercoiling). При ней цепи ДНК становятся закрученными менее плотно с меньшим, чем в исходном (релаксированном) состоянии, числом пар оснований на виток. Оба типа сверхспирализации двойной спирали в пространстве служат причиной возникновения напряжений в ДНК (поэтому несверхспирализованную ДНК называют релаксированной). Отрицательную сверхспирализацию можно представлять себе как создание в ДНК напряжений, которые сбрасываются посредством расплетания двойной спирали. Крайним проявлением эффекта негативной сверхспирализации является участок с разделенными цепями ДНК — формально, с нулем пар оснований на виток.

Топологическое манипулирование ДНК можно считать центральным аспектом всех ее видов функциональной активности (рекомбинации, репликации, транскрипции), а также организации структуры высшего порядка. Все виды синтетической активности с участием двухцепочечной ДНК требуют разделения цепей. Но, оказывается, цепи не просто лежат бок о бок; они переплетаются. Поэтому их разделение требует вращения друг относительно друга в пространстве. Некоторые возможности для реакции расплетания проиллюстрированы на **РИС. 1.10**.

Раскручивание коротких линейных молекул ДНК не создает никаких проблем, поскольку их концы могут свободно вращаться относительно оси двойной спирали,

благодаря чему снимается любое напряжение. Однако в типичной хромосоме ДНК не только представляет собой очень длинную молекулу, но также связана с белком, играющим роль «якоря», удерживающего ДНК в нескольких точках. Поэтому даже в линейной хромосоме эукариот свободные концы ДНК функционально неактивны.

Рассмотрим последствия разделения цепей в молекуле, чьи концы не свободны для вращения. Если две переплетенные цепи взять за концы и растянуть врозь, результатом будет уплотнение их закручивания в дальней части молекулы. При этом, для того чтобы уравновесить сброс витков в однонитиевых участках, в любом месте молекулы ДНК возникают положительные сверхвитки. Проблему можно решить внесением временного разрыва (ника) в одну из цепей. Внутренний свободный конец позволяет надрезанной цепи вращаться вокруг интактной цепи, после чего ник может быть зашит. Каждое повторение реакции надрезания и сшивания высвобождает один сверхспиральный виток.

Закрытую молекулу ДНК характеризует ее **порядок зацепления** (L) — число раз, которое одна ее цепь пересекает другую в пространстве. Закрытые молекулы ДНК с идентичными последовательностями могут иметь разные порядки зацепления, отражающие разные степени сверхспирализации. Молекулы ДНК, одинаковые во всем, кроме порядков зацепления, называют **топологическими изомерами**.

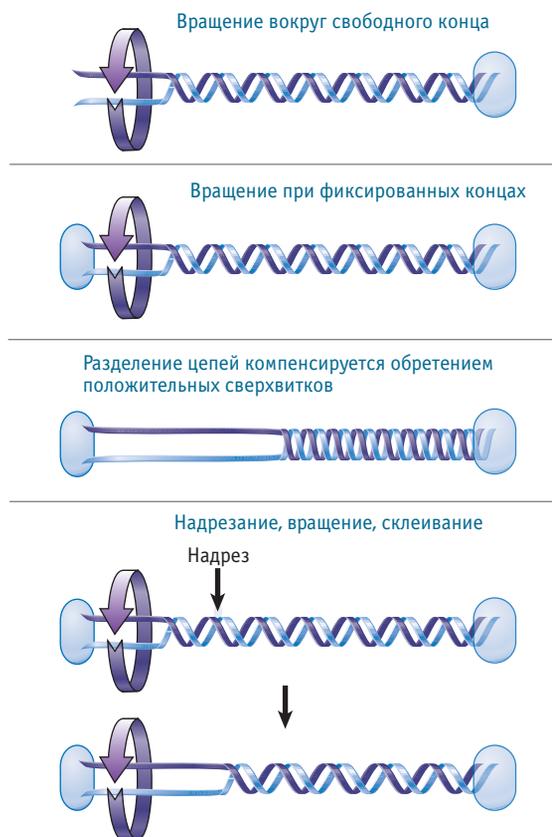


РИС. 1.10 Разделение цепей двойной спирали ДНК можно произвести несколькими способами

У порядка зацепления есть две составляющие: число сверхвитков (W) и число витков двойной спирали (T).

Число витков двойной спирали (T) — это свойство самой двуспиральной структуры, отображающее вращение одной цепи относительно другой. Оно отображает общее число витков дуплекса и определяется числом пар оснований на виток. Для релаксированной закрытой кольцевой ДНК, лежащей плашмя на плоскости, число витков равняется общему числу пар оснований, деленному на число пар оснований в одном витке.

Число сверхвитков (W) отображает вращение оси дуплекса в пространстве. Оно соответствует интуитивному представлению о сверхспирализации, но количественно это не совсем одинаковые понятия. Для релаксированной молекулы $W = 0$ и порядок зацепления равен числу витков.

Часто интерес вызывает изменение порядка зацепления, или ΔL , заданного равенством

$$\Delta L = \Delta W + \Delta T.$$

Это равенство означает, что любое изменение общего числа обращений одной цепи ДНК относительно другой может быть выражено как сумма изменений спирализации оси дуплекса в пространстве (ΔW) и скрученности самой двойной спирали (ΔT). Если ДНК не связана с белком или не имеет других конформационных ограничений, то число витков остается постоянным — другими словами стабильная конформация ДНК в растворах существует, если на виток приходится 10,5 пары оснований. Любое ΔL (изменение порядка зацепления), по-видимому, выражается изменением W , т. е. изменением сверхспирализованности.

Уменьшение порядка зацепления, т. е. отрицательное значение ΔL , соответствует внесению некоей комбинации отрицательной сверхспирализации и/или расплетания. Увеличение порядка зацепления, означающее положительную величину ΔL , соответствует увеличению положительной сверхспирализации и/или расплетанию.

Изменение состояния любой ДНК можно описать специфической разностью зацепления (specific linking difference), или $\sigma = \Delta L/L_0$, где L_0 — порядок зацепления для релаксированной ДНК. Если изменение порядка зацепления целиком вытекает из изменения W (т. е. $\Delta T = 0$), специфическая разность зацепления равняется плотности сверхспирализации. Фактически, σ как $\Delta L/L_0$ можно полагать соответствующей плотности сверхскручивания при условии постоянства структуры самой двойной спирали.

Говоря о порядке зацепления, важно понимать, что этот показатель инвариантен для любой индивидуальной закрытой молекулы ДНК. Порядок зацепления не может быть изменен какой-либо деформацией, кроме как с использованием разрыва и заклеивания. У кольцевой молекулы с конкретным порядком зацепления этот порядок может выражаться в разных сочетаниях T и W , сумма которых, однако, не может измениться до тех пор, пока какая-либо из цепей не будет разорвана. (На самом деле распределение значения L , фиксированно-

го для молекулы ДНК в растворе, между T и W означает свободу каждой из этих составляющих принимать разные значения.)

Порядок зацепления связан с действительными, ферментативно обусловленными событиями, посредством которых в топологию ДНК вносятся изменения. Порядок зацепления конкретной закрытой молекулы может быть изменен лишь разрывом цепи или цепей, использованием свободного конца для вращения одной цепи вокруг другой и «заклеиванием» рваных концов. Изменение порядка зацепления после осуществления ферментом такой операции должно выражаться целым числом; его значение можно определить как характеристику реакции. Степень сверхспирализации ДНК в клетке изменяется при действии ферментов топоизомераз (см. гл. 14 «Репликация ДНК»).

1.6 Структура ДНК представлена двойной спиралью

Основные положения

- В-форма ДНК представлена двойной спиралью, состоящей из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей.
- Азотистые основания каждой цепи состоят из плоских пуриновых или пиримидиновых колец, обращенных друг к другу и соединенных посредством водородных связей в пары А–Т или Г–С.
- Диаметр двойной спирали составляет 20 Å. Полный оборот спирали включает 10 пар оснований (10,4 пары для ДНК в растворе) и происходит на промежутке длиной в 34 Å.
- Двойная спираль формирует основную (большую) и второстепенную (малую) бороздку.

Как было показано Эрвином Чаргаффом в 1950-е гг. у различных видов живых существ основания, входящие в состав нуклеиновых кислот, представлены в разных соотношениях. Это наблюдение привело к развитию концепции, в соответствии с которой генетическая информация определяется последовательностью оснований. Оставалось ответить на два вопроса: какую структуру имеет ДНК и каким образом последовательность ее оснований определяет последовательность аминокислот в белках.

В предложенной в 1953 г. Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком модели ДНК, состоящей из двух цепей, были приняты в расчет результаты трех наблюдений:

- Данные по дифракции рентгеновских лучей, полученные Розалинд Франклин и Моррисом Уилкинсом, показали, что В-форма ДНК (более гидратированная, чем А-форма) имеет структуру правильной спирали. Спираль совершает полный оборот каждые 34 Å (3,4 нм), а ее диаметр равен 20 Å (2 нм). Поскольку расстояние между соседними нуклеотидами составляет 3,4 Å, на один полный оборот спирали должно приходиться 10 нуклеотидов (в водных растворах на один оборот спирали приходится 10,4 нуклеотида).

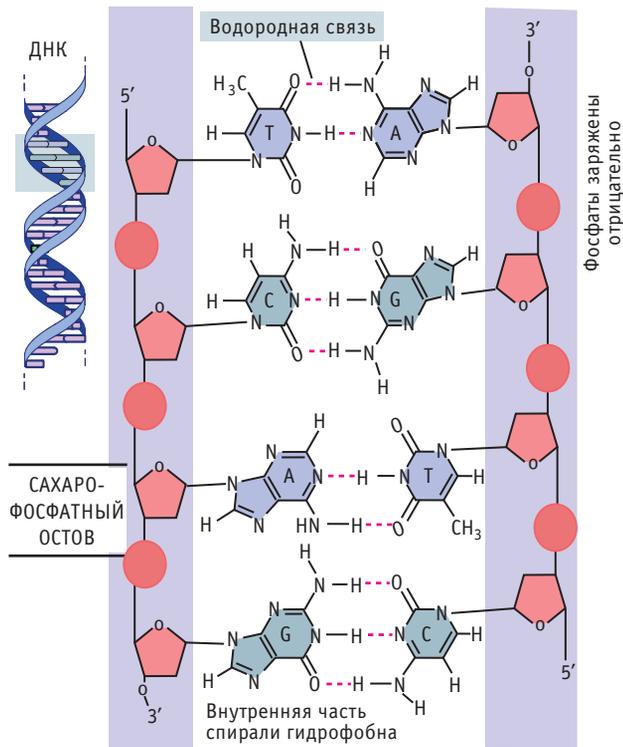


РИС. 1.11 Двойная спираль сохраняет постоянную ширину, поскольку в комплементарных парах А–Т и Г–С пурины всегда противостоят пиримидинам. На рисунке представлена последовательность ТСАГ

- Плотность молекулы ДНК позволяет предположить, что спираль состоит из двух полинуклеотидных цепей. Спираль на всем своем протяжении имеет постоянный диаметр. Это можно объяснить тем, что основания каждой цепи обращены друг к другу и расположены так, что пурины всегда находятся напротив пиримидина. Пары пурин–пурин слишком велики, для того чтобы обеспечить постоянство диаметра, а пары пиримидин–пиримидин — слишком малы.
- Чаргафф также показал, что вне зависимости от абсолютного размера каждого основания доля основания G всегда равна доле основания C. То же справедливо для соотношения A и T. Таким образом, состав ДНК может быть описан суммарной долей оснований: G+C. (Доля оснований A и T определяется путем вычитания содержания G+C из единицы.) Доля G+C варьирует в интервале от 0,26 до 0,74 у разных видов.

Уотсон и Крик предположили, что две полинуклеотидные цепи в двойной спирали соединяются водородными связями между их азотистыми основаниями. G может связываться только с C, а A — только с T. Водородные связи между основаниями обеспечивают их спаривание, а спаренные основания (G, образующий три водородных связи с C, или A, образующий две связи с T) принято называть **комплементарными**. Спаривание оснований объясняется комплементарностью формы их молекул,

расположенных вдоль границы взаимного контакта, и соответствующим положением функциональных групп. При этом создается конфигурация, благоприятствующая образованию водородных связей.

В соответствии с моделью Уотсона–Крика две полинуклеотидные цепи противоположно направлены (**антипараллельны**) (рис. 1.11). На протяжении всей спирали одна из цепей лежит в направлении от 5'-конца к 3'-концу, тогда как комплементарная ей цепь направлена в противоположную сторону.

Сахарофосфатный остов расположен с внешней стороны спирали и несет отрицательные заряды на фосфатных группах. В растворе *in vitro* отрицательные заряды нейтрализованы ионами металлов, в большинстве случаев Na^+ . В клетке нейтрализующую функцию выполняют положительно заряженные белки. Эти белки играют важную роль при формировании структуры ДНК клетки.

Азотистые основания направлены внутрь спирали. Это плоские структуры, расположенные попарно перпендикулярно оси спирали. Представьте себе двойную спираль ДНК в виде винтовой лестницы, у которой ступеньки — это пары оснований (рис. 1.12). Поднимаясь вдоль спирали, азотистые основания укладываются одно за другим как стопка тарелок.

Каждая пара оснований повернута на 36° вокруг оси спирали относительно следующей пары. Таким образом, 10 пар оснований делают полный оборот в 360° . Две цепи, закручиваясь друг относительно друга, формируют **малую бороздку** (около 12 Å или 1,2 нм в поперечнике) и **большую бороздку** (около 22 Å или 2,2 нм в поперечнике) (рис. 1.13). Двойная спираль закручена **вправо**, т. е. ее ход соответствует ходу часовой стрелки, если взглянуть вдоль оси спирали. Приведенные выше параметры соответствуют **В-форме** ДНК. А-форма характерна для гидратированной ДНК. Она представляет собой правую спираль, но по сравнению с В-формой более короткую и широкую. Третья форма называется Z-ДНК, она длиннее и уже В-формы и представлена левой спиралью.

Важно понимать, что В-форма отражает некое усредненное представление о структуре ДНК. Структура ДНК может изменяться от участка к участку. ДНК может содержать большее число пар оснований на оборот спирали

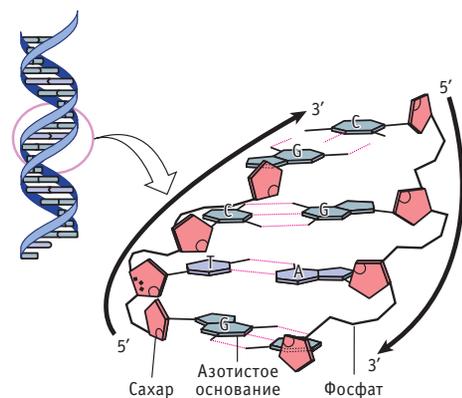


РИС. 1.12 Плоскость, в которой лежат пары оснований, расположена перпендикулярно сахарофосфатному остову

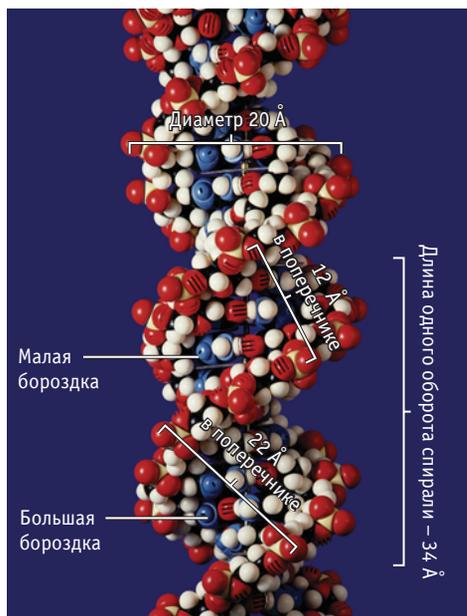


РИС. 1.13 Две цепи ДНК формируют двойную спираль. Фотография © Photodisc

ли, и тогда говорят, что она **перекручена**; если же число оснований на виток спирали меньше 10, говорят, что она **недокручена**. Эти особенности могут быть результатом пространственных изменений в структуре двойной спирали или могут быть связаны с прикреплением белковых молекул к некоторым участкам ДНК.

Еще одна топологическая форма представлена изогнутой ДНК. Наличие в одной из цепей 8–10 остатков аденина может приводить к изгибу двойной спирали. Такая структура способствует ее более плотной упаковке, обеспечивающей сборку нуклеосом (см. гл. 10 «Хроматин») и регуляцию активности генов.

1.7 Процесс репликации ДНК полуконсервативен

Основные положения

- Эксперимент Мезельсона–Сталя, основанный на мечении ДНК тяжелыми изотопами, доказал, что в реакции репликации консервативным элементом ДНК служит одна из полинуклеотидных цепей.
- Каждая цепь ДНК-дуплекса служит матрицей для синтеза дочерней цепи.
- Последовательность нуклеотидов, составляющих дочернюю цепь, комплементарна последовательности материнской цепи.

Важным свойством генетического материала является возможность его точного воспроизведения. Две полинуклеотидные цепи связаны лишь водородными связями, а значит, их можно легко разъединить, поскольку для этого не требуется разрушения прочных ковалентных связей. Специфичность спаривания оснований позволяет сделать предположение, что каждая из разделенных

цепей **материнской** ДНК может служить **матрицей** для синтеза комплементарной **дочерней** цепи. На **РИС. 1.14** показан принцип, в соответствии с которым каждая новая дочерняя цепь собирается на материнской цепи. Последовательность дочерней цепи определяется материнской цепью. Аденин в материнской цепи приводит к встраиванию тимина в дочернюю цепь, а гуанин определяет встраивание в дочернюю цепь цитозина и т. п.

В верхней части рис. 1.14 изображен материнский (нереплицированный) ДНК-дуплекс, изначально состоящий из двух материнских цепей. На нижней части рисунка изображены два дочерних дуплекса, появившихся в результате присоединения комплементарных оснований. Каждый из дочерних дуплексов идентичен последовательности исходного материнского и состоит из одной материнской цепочки и одной новосинтезированной. Структура ДНК несет информацию, необходимую для собственной репликации. Результат такого способа репликации изображен на **РИС. 1.15**. Материнский

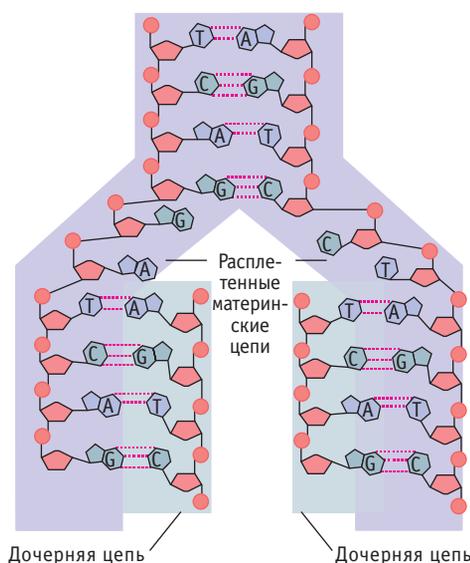


РИС. 1.14 Репликация ДНК осуществляется в соответствии с правилом спаривания оснований

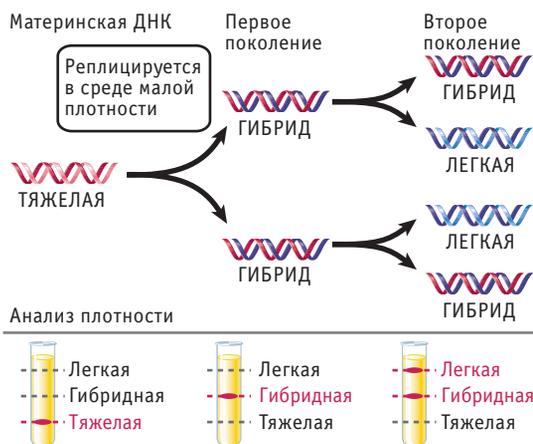


РИС. 1.15 Репликация ДНК полуконсервативна

дуплекс реплицируется, давая два дочерних дуплекса, каждый из которых состоит из одной материнской цепи и одной (новосинтезированной) дочерней цепи. *Консервативной единицей, передающейся от одного поколения другому, является одна из двух цепей, составляющих материнский дуплекс.* Таким образом, репликация ДНК носит **полуконсервативный** характер.

На рис. 1.15 показан эксперимент, подтверждающий состоятельность данной модели. Если вырастить организм в среде, содержащей подходящий тяжелый изотоп (например, ^{15}N), материнская ДНК будет нести тяжелую метку. При переносе организма в новую среду, содержащую легкие изотопы, цепи материнской ДНК с тяжелой меткой можно отличить от новосинтезированных (с легкой меткой) по их массе. Материнская ДНК состоит из дуплекса двух тяжелых цепей (отмечены красным цветом). В первом поколении, выращенном в легкой среде, ДНК представлена гибридным дуплексом из одной тяжелой материнской цепи (красной) и одной легкой дочерней (синей). Во втором поколении две цепи каждого гибридного дуплекса разъединяются, и каждая из них обретает нового легкого партнера. В результате половина дуплексов остается гибридной, а половина становится полностью легкой (обе цепи синие).

Вместе с тем отдельные цепи этих дуплексов либо полностью тяжелые, либо полностью легкие. Это утверждение было доказано в 1958 г. экспериментом Мэттью Мезельсона и Фрэнклина Сталя. Они наблюдали полуконсервативную репликацию ДНК в трех поколениях *E. coli*. Когда из бактерий выделили ДНК и при помощи центрифугирования разделили ее по плотности, выяснилось, что ДНК сформировала полосы в соответствии с плотностью: тяжелые для родительских бактерий, гибридные в первом поколении и смесь гибридных и легких во втором поколении.

1.8 Полимеразы проявляют активность в том месте, где цепи ДНК разделены и которое называют репликативной вилкой

Основные положения

- Репликацию ДНК контролирует комплекс ферментов, разделяющих материнские цепи и синтезирующих дочерние.
- Репликативная вилка — это точка, в которой разделяются цепи материнской ДНК.
- Ферменты, осуществляющие синтез ДНК, называют ДНК-полимеразами, а ферменты, синтезирующие РНК, — РНК-полимеразами.
- Разрушение нуклеиновых кислот осуществляют ферменты нуклеазы; нуклеазы принято делить на ДНКазы и РНКазы, обладающие эндо- или экзонуклеазной активностью.

Для того чтобы началась репликация, цепи материнского ДНК-дуплекса должны разъединиться (денатурировать). Однако нарушение двойной спирали носит временный

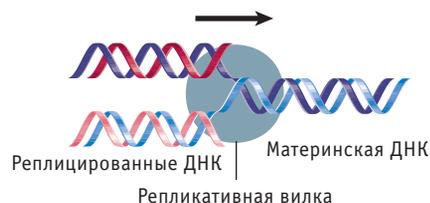


РИС. 1.16 Участок ДНК, в котором расплетенный материнский дуплекс переходит в новосинтезированные дочерние дуплексы, называют репликативной вилкой

характер. Структура молекулы восстанавливается (ренатурирует) за счет формирования нового дочернего дуплекса. В отдельно взятый момент в ДНК расплетен лишь короткий участок двойной спирали. Термин «денатурация» также используется для обозначения утраты белками их функционально-активной структуры; таким образом, этот общий термин характеризует превращение активной структуры макромолекулы в нефункциональную форму.

Спиральная структура молекулы ДНК, вовлеченной в репликацию, изображена на **РИС. 1.16**. Регион молекулы, еще не вовлеченный в репликацию, состоит из материнского дуплекса, а в регионе, где идет репликация, формируется два дочерних дуплекса. Структуру ДНК, возникающую на промежуточном участке между этими регионами, называют **репликативной вилкой**. По мере синтеза дочерних молекул репликативная вилка продвигается вдоль материнской ДНК, в результате чего материнские цепи постоянно денатурируют, формируя дочерние дуплексы.

Синтез нуклеиновых кислот катализируется специальными ферментами (**ДНК-полимеразами**), распознающими матрицу и обеспечивающими встраивание мономеров в синтезируемую полинуклеотидную цепь. Кроме ДНК-полимераз в репликации участвуют и другие ферменты, например хеликаза, раскручивающая дуплекс ДНК, праймаза, с помощью которой образуются РНК-затравки, необходимые для работы ДНК-полимераз, и лигаза, воссоединяющая разрывы в цепях ДНК. Разрушение нуклеиновых кислот тоже требует участия специальных ферментов: **дезоксирибонуклеаз (ДНКаз)**, которые разрушают ДНК, и **рибонуклеаз (РНКаз)**, разрушающих РНК. Нуклеазы принято делить на два основных класса: **эндонуклеазы** и **экзонуклеазы**.

- Эндонуклеазы разрушают фосфодиэфирные связи в молекулах ДНК и РНК, формируя отдельные фрагменты. Некоторые ДНКазы вносят разрыв в обе цепи дуплекса ДНК, а некоторые — лишь в одну из двух цепей. На **РИС. 1.17** показано, как эндонуклеазы осуществляют расщепление ДНК.



РИС. 1.17 Эндонуклеаза разрезает связь в пределах нуклеиновой кислоты. На рисунке изображен фермент, атакующий одну из цепей ДНК-дуплекса

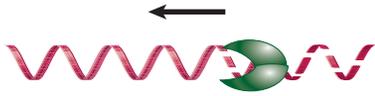


РИС. 1.18 Экзонуклеаза удаляет основания одно за другим путем разрезания крайней связи в полинуклеотидной цепи

- Экзонуклеазы удаляют основания с концов молекулы одно за другим, приводя к высвобождению мононуклеотидов. (Некоторые экзонуклеазы отщепляют от ДНК короткие фрагменты. — *Прим. ред.*) Они всегда работают на одной цепи нуклеиновой кислоты и в специфичном для них направлении: начинают с 5'- или 3'-конца, продвигаются к противоположному концу. На **РИС. 1.18** показан принцип работы экзонуклеаз.

1.9 Генетическая информация может быть закодирована в ДНК или РНК

Основные положения

- Большинство геномов представляют собой ДНК, однако геномы вирусов и вириодов могут состоять из РНК.
- Перевод информации из ДНК в РНК происходит в результате транскрипции, а из РНК в ДНК — в ходе обратной транскрипции.
- Трансляция РНК в белок однонаправленна.

Парадигму молекулярной биологии определяет ее **центральная догма**. Структурные гены представлены последовательностью нуклеотидов, кодирующих полипептиды. Репликация отвечает за передачу генетической информации по наследству, а транскрипция и трансляция — за перевод этой информации из одной формы в другую.

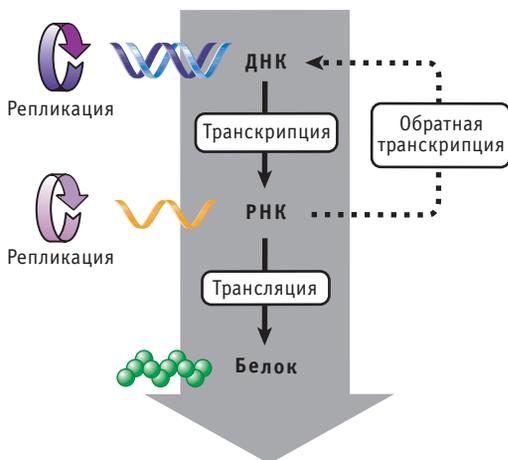


РИС. 1.19 Центральная догма гласит, что информация может сохраняться или переноситься между нуклеиновыми кислотами, однако перенос информации в белок носит необратимый характер

На **РИС. 1.19** продемонстрирована роль репликации, транскрипции и трансляции с точки зрения центральной догмы молекулярной биологии:

- При транскрипции ДНК ДНК-зависимой **РНК-полимеразой** образуются молекулы РНК. Информационная РНК (мРНК) транслируется с образованием полипептидов. Остальные формы РНК, такие как рРНК и тРНК, сами по себе функционально активны и не транслируются.
- Генетический материал сохраняется в виде ДНК или РНК. Клетки в качестве «архива» используют только ДНК. Некоторые вирусы используют РНК, а репликация вирусной РНК происходит в инфицированной клетке.
- Процесс реализации генетической информации обычно носит однонаправленный характер. При транскрипции ДНК образуются молекулы РНК; исключение составляет обратная транскрипция у ретровирусов при их попадании в клетку (см. ниже). Полипептиды нельзя рассматривать в качестве носителей генетической информации; трансляция РНК в полипептид всегда носит необратимый характер.

Описываемые механизмы обладают одинаковой эффективностью как для генетической информации прокариот и эукариот, так и для информации, содержащейся в вирусах. Геномы всех клеточных организмов представляют собой ДНК-дуплексы. Геномы вирусов могут состоять из ДНК или РНК, причем независимо от типа нуклеиновой кислоты геном вируса может быть как двух-, так и одноцепочечным (дц и оц). Детали механизма репликации нуклеиновых кислот варьируют в различных вирусных системах, однако все они базируются на принципе комплементарности (**РИС. 1.20**).

Клетки воспроизводят свою геномную ДНК по механизму полуконсервативной репликации. Двухцепочечные геномы РНК- и ДНК-содержащих вирусов также реплицируются с использованием отдельных

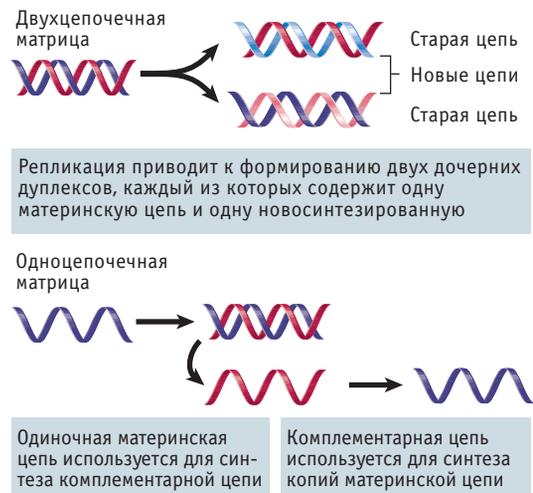


РИС. 1.20 И двухцепочечные, и одноцепочечные нуклеиновые кислоты реплицируются путем синтеза комплементарных цепей с учетом принципа спаривания оснований

цепей дуплекса в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи.

Вирусы, несущие одноцепочечные геномы, для синтеза комплементарной цепи используют свою единственную цепь в качестве матрицы. А уже новая, комплементарная исходному геному цепь, в свою очередь, используется для синтеза молекул, идентичных оригинальной матрице. В процессе вирусной репликации на некоторых стадиях могут формироваться стабильные или временные двухцепочечные нуклеиновые кислоты.

Ограничение, касающееся однонаправленности переноса информации от ДНК к РНК, не является абсолютным. Оно нарушается **ретровирусами**, чьи геномы состоят из одноцепочечных молекул РНК. В процессе жизненного цикла РНК ретровирусов переводится в ДНК по механизму **обратной транскрипции** с участием фермента *обратной транскриптазы* (РНК-зависимой ДНК-полимеразы). В свою очередь, одноцепочечная ДНК переходит в двухцепочечную форму. Двухцепочечная ДНК становится частью генома клетки-хозяина и наследуется так же, как другие гены. Таким образом, обратная транскрипция позволяет РНК переносить генетическую информацию и предоставлять ее клетке в виде ДНК.

Существование механизмов обратной транскрипции и репликации РНК устанавливает важный принцип: *информация, содержащаяся в нуклеиновых кислотах любого типа, может быть переведена из одной формы в другую*. Чаще всего клетка использует процессы репликации ДНК, транскрипции и трансляции. Одна-

ко в редких случаях (вероятно, опосредованных РНК-содержащими вирусами) информация клеточной РНК переводится в ДНК и встраивается обратно в геном.

Несмотря на то что обратная транскрипция не играет значительной роли во внутриклеточных процессах, она приобретает значимость при рассмотрении вопроса эволюции генома.

Те же принципы сохранения генетической информации справедливы и для больших геномов растений и амфибий, и для сравнительно небольшого генома микоплазмы, и для еще меньших по размеру геномов ДНК- и РНК-содержащих вирусов. На **рис. 1.21** представлены примеры разнообразия типов и размеров различных геномов. Причины столь значительных различий в величине геномов и в количестве генов обсуждаются в гл. 5 и 6.

Во всем разнообразии организмов, содержащих варьирующие в сотни тысяч раз по размеру геномы, принцип остается общим: ДНК кодирует все белки, которые должны синтезировать клетки организма. Белки прямо или опосредованно выполняют функции, необходимые для выживания организма. Похожий принцип описывает суть генетической информации и у вирусов (вне зависимости от того, содержат они ДНК или РНК): нуклеиновые кислоты кодируют белки, необходимые для упаковки генома и для выполнения любых других дополнительных (к выполняемым белками клетки-хозяина) функций, служащих цели репродукции вируса. Некоторые вирусы (например, сателлитный вирус некроза табака STNV) не могут реплицироваться без помощи других вирусов. Так, сателлитному вирусу некроза табака необходимо одновременное присутствие в клетке вспомогательного вируса — вируса некроза табака TNV, который сам по себе является полноценным инфекционным вирусом.

Геном	Число генов	Число нуклеотидов
Организмы		
Растения	<50 000	<10 ¹¹
Млекопитающие	30 000	~3 × 10 ⁹
Черви	14 000	~10 ⁸
Мушкетеры	12 000	1,6 × 10 ⁸
Грибы	6000	1,3 × 10 ⁷
Бактерии	2000–4000	<10 ⁷
Микоплазмы	500	<10 ⁶
Вирусы, содержащие двухцепочечную ДНК		
Коровья оспа	<300	187 000
Паповавирус (SV40)	~6	5226
Фаг T4	~200	165 000
Вирусы, содержащие одноцепочечную ДНК		
Парвовирус	5	5000
Фаг φX174	11	5387
Вирусы, содержащие двухцепочечную РНК		
Реовирус	22	23 000
Вирусы, содержащие одноцепочечную РНК		
Коронавирус	7	20 000
Вирус гриппа	12	13 500
Вирус табачной мозаики (TMV)	4	6400
Фаг MS2	4	3569
Сателлитный вирус некроза табака (STNV)	1	1300
Вироиды		
Вироид веретеновидности клубней картофеля (PSTV)	0	359

рис. 1.21 Размер составляющих геном нуклеиновых кислот варьирует в широком диапазоне

1.10 Нуклеиновые кислоты гибридизуются в соответствии с принципом комплементарности

Основные положения

- Нагревание приводит к разделению цепей ДНК-дуплекса.
- Температура плавления T_m — это температура разделения цепей дуплекса.
- Комплементарные одноцепочечные молекулы ДНК при понижении температуры могут ренатурировать (с образованием дуплекса).
- Процессы денатурации (плавления) и ренатурации (гибридизации) могут происходить как между однотипными молекулами, так и между молекулами разного типа. При этом могут формироваться дуплексы ДНК–ДНК, РНК–ДНК и РНК–РНК.
- Способность двух одноцепочечных нуклеиновых кислот гибридизоваться зависит от степени их комплементарности.

Способность разделяться на две цепи без разрушения ковалентных связей является важным свойством двойной спирали. Эта способность позволяет цепям разъ-

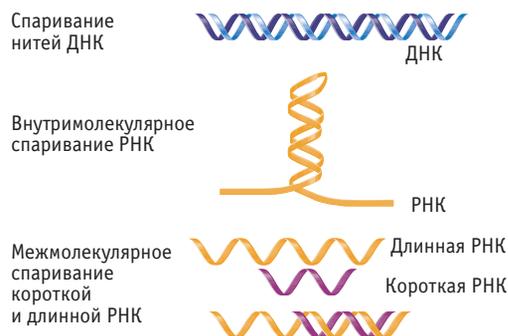


РИС. 1.22 Кроме ДНК-дуплексов, основания могут спариваться и при меж- и внутримолекулярных взаимодействиях одноцепочечных РНК (или ДНК)

единяться и снова воссоединяться с очень высокой скоростью, что необходимо для обеспечения генетических функций нуклеиновых кислот. Специфичность (точность) процесса денатурации и ренатурации определяется комплементарным спариванием оснований.

Концепция комплементарного спаривания оснований служит основой для всех процессов, происходящих с нуклеиновыми кислотами. Разрушение связей между основаниями является критичным для функциональной активности двухцепочечной ДНК, а способность к образованию пар играет существенную роль в образовании дуплексов из одноцепочечных форм нуклеиновых кислот. На **РИС. 1.22** показано, что спаривание оснований позволяет комплементарным одноцепочечным нуклеиновым кислотам формировать дуплексы:

- Внутримолекулярный дуплекс может сформироваться путем спаривания оснований между двумя комплементарными участками одноцепочечной молекулы.
- Одноцепочечные молекулы могут спариваться друг с другом, формируя межмолекулярный дуплекс.

Формирование внутримолекулярных дуплексов чаще всего реализовано для РНК, однако одноцепочечная ДНК также встречается в природе (например, как форма вирусных геномов). Спаривание оснований между двумя независимыми комплементарными одиночными цепями не ограничивается формированием дуплексов ДНК–ДНК или РНК–РНК, а может возникать и между молекулами ДНК и РНК.

Отсутствие ковалентных связей между комплементарными цепями делает удобными манипуляции с ДНК *in vitro*. Водородные связи, стабилизирующие двойную спираль, могут быть легко разрушены путем нагревания или помещения ДНК в раствор с пониженной концентрацией солей. Если водородные связи между цепями ДНК разрушены, цепи разъединяются.

Денатурация ДНК происходит в сравнительно небольшом температурном диапазоне и приводит к серьезным изменениям ее физических свойств. Среднюю точку температурного диапазона, в котором про-

исходит разделение цепей ДНК, называют *температурой плавления* (T_m). Она зависит от соотношения в молекуле пар G–C и A–T. Поскольку каждую G–C-пару связывают три водородные связи, они более стабильны, чем пары A–T, соединенные лишь двумя водородными связями. Чем больше G–C-пар содержится в ДНК, тем большее количество энергии необходимо для разделения ее цепей. В растворе с определенными физиологическими условиями ДНК, на 40% состоящая из G–C-пар (типичное для геномов млекопитающих соотношение), денатурирует при T_m около 87 °C. Таким образом, в диапазоне физиологических температур дуплекс ДНК стабилен.

Денатурация ДНК обратима при соблюдении определенных условий. Процесс ренатурации зависит от специфичного (по последовательности) спаривания оснований в комплементарных цепях. Реакция происходит в две стадии (**РИС. 1.23**). На первом этапе одиночные цепи ДНК случайно сближаются друг с другом в растворе; если их последовательности комплементарны, две цепи формируют короткий участок двойной спирали. По мере спаривания оснований этот участок увеличивается (процесс можно сравнить с застегиванием молнии), в результате формируя длинный молекулярный дуплекс. Ренатурация двойной спирали ДНК восстанавливает исходные свойства молекулы, потерянные во время денатурации.

Ренатурация отражает реакцию между двумя комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот, которые ранее были разъединены в результате денатурации. Иногда это называют **отжигом**. Однако чаще, когда в реакцию вовлечены нуклеиновые кислоты из разных источников, процесс образования дуплекса называют **гибридизацией** (как, например, в том случае, когда один препарат состоит из ДНК, а другой — из РНК). Способность двух препаратов нуклеиновых кислот гибридизоваться служит точным тестом на их комплементарность, поскольку только комплементарные последовательности могут формировать дуплексы.

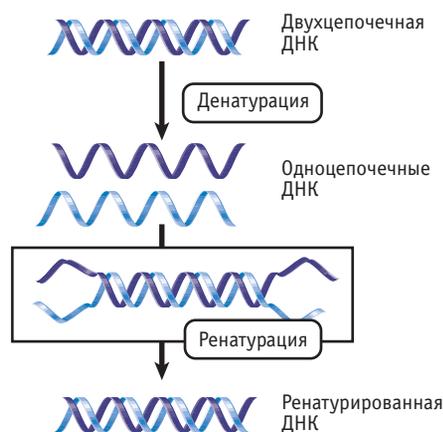


РИС. 1.23 Денатурированные цепи ДНК могут ренатурировать (воссоединяться), вновь образуя дуплекс

[. . .]

ДЖ. КРЕБС, Э. ГОЛДШТЕЙН, С. КИЛПАТРИК

ГЕНЫ ПО ЛЬЮИНУ

В книгу включена информация о последних достижениях в области молекулярной биологии и молекулярной генетики, включая структуру генов, последовательности, организацию и экспрессию. Издание дополнено новыми разделами, хорошо иллюстрировано и структурировано, что помогает студентам лучше ориентироваться в отдельных темах.

Для студентов, специализирующихся в области молекулярной генетики, молекулярной биологии, геной инженерии, а также для аспирантов, преподавателей, научных сотрудников.