

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по выполнению лабораторных работ по дисциплине

Механизмы регуляции экспрессии генов

для студентов направления подготовки 06.03.01 Биология
направленность (профиль) Генетика, селекция и биоинформатика

СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Лабораторная работа №1

Тема: «Регуляция генной активности на уровне транскрипции. Этапы транскрипции. Регуляция транскрипции у прокариот. Негативная и позитивная регуляция генной активности».

Цель занятия: изучить особенности экспрессии генов у прокариот;

Теоретическая часть

Прокариотная клетка - это простейший тип живой клетки. К прокариотическим (или доядерным) организмам относят бактерии и археи.

Регуляцию активности генов осуществляют молекулярно-генетические системы управления. На индукцию и репрессию могут влиять самые разнообразные факторы, которые называются эффекторами. Одни из них прямо закодированы в геноме организма (например, белки теплового шока; см. ниже), другие образуются как промежуточные продукты обмена веществ, третьи поступают в клетку в готовом виде из внешней среды или из других клеток (тканей) организма, четвертые образуются в клетке под влиянием физических факторов (экстремальных температур, ультрафиолета) и т.д. Особую группу эффекторов составляют белки теплового шока, которые синтезируются в клетке при различных видах стресса (при повышении температуры, при воздействии других неблагоприятных факторов). Эти белки эволюционно консервативны, они обнаружены у самых различных организмов; вероятно, они являются универсальными эффекторами. Именно регуляцией активности генов объясняется тот факт, что, несмотря на идентичность генотипов клеток многоклеточного организма, они значительно различаются по строению и функции. Переключение синтеза с одних белков на другие лежит в основе всякого развития, будь то репродукция вирусов в зараженных клетках, рост и спорообразование у бактерий, развитие эмбрионов или дифференцировка тканей. На каждом этапе этих процессов синтезируются специфичные белки.

Существуют лишь два типа регуляции экспрессии генов - *позитивная и негативная*. Когда благодаря действию специфических регуляторных элементов уровень экспрессии генетической информации количественно возрастает, регуляция называется позитивной. Если уровень экспрессии благодаря действию иных регуляторных элементов понижается, говорят о негативной регуляции. Регуляторный элемент или молекулу, участвующие в качестве «посредников» в негативной регуляции, называют негативными регуляторами; элементы, осуществляющие позитивную регуляцию - позитивными регуляторами. *Единицей регуляции экспрессии генов у прокариот является оперон.*

В 1961 году общие принципы регуляции активности генов в оперонах разработали Франсуа Жакоб и Жак Моно, французские биохимики и микробиологи, лауреаты Нобелевской премии (1965 г.) «за открытия, касающиеся генетического контроля синтеза ферментов и вирусов».

Франсуа Жакоб и Жак Моно описали ставшую теперь классической модель оперона. Их концепция в значительной мере была основана на изучении регуляции метаболизма лактозы у кишечной палочки *E. coli*. Молекулярный механизм регуляции генов, участвующих в метаболизме лактозы, на сегодняшний день наиболее изучен.

Оперон - функциональная единица генома у прокариот, в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами. Такая функциональная организация позволяет эффективнее регулировать экспрессию (транскрипцию) этих генов. Таким образом, оперон - это участок бактериальной хромосомы, включающий следующие участки ДНК: Р - промотор, О - оператор, Z, Y, А - структурные гены, Т - терминатор. (В состав других оперонов может входить до 10 структурных генов и более.).

Промотор - это регуляторный участок ДНК, который служит для присоединения РНК-полимеразы к молекуле ДНК. В лактозном опероне присоединение РНК-полимеразы

33 происходит с помощью комплекса CAP-цАМФ (CAP - это специфический белок; в свободной форме является неактивным активатором, цАМФ - циклоаденозинмонофосфат - циклическая форма аденозинмонофосфорной кислоты). Типичный пример - TTGACA - 17 bp - TATAAT. В зависимости от типа промотора (а точнее, от типа распознающей его сигма - субъединицы РНК полимеразы) конкретная последовательность промотора варьирует. Размер - около 20 bp. Располагается в непосредственной близости к промотору или же перекрывается с ним. В случае негативных регуляторов, или репрессоров, оператор, как правило, располагается непосредственно за промотором, или перекрывается с ним. В случае позитивных регуляторов (активаторов) оператор обычно располагается перед промотором. В любом случае связывание регуляторного белка с оператором меняет частоту инициации транскрипции. У многих (возможно, у большинства) оперонов имеется не один, а несколько сайтов связывания с регуляторными белками, которые не обязательно располагаются рядом и могут вообще находиться по разные стороны от промотора. В этих случаях термин "оператор" в классическом смысле становится неудобным, в связи с чем, сейчас чаще просто говорят о сайтах связывания регуляторов.

Структурные гены. Кодируют белки, непосредственно производящие фенотипический эффект. Именно для контроля их экспрессии, собственно, и существуют оперонные структуры вместе со своими регуляторами.

Терминатор транскрипции. Здесь заканчивается синтез мРНК.

Ген-регулятор не входит в оперон, но является необходимой частью регуляторной системы, кодирующий регуляторный белок, связывающийся с оператором. Ген-регулятор может находиться рядом с контролируемым им опероном, но часто располагается совсем в другом участке хромосомы. Почти всегда у гена-регулятора свой промотор и терминатор.

В регуляции участвуют, как правило, и низкомолекулярные вещества-эффекторы, являющиеся либо индукторами, либо корепрессорами структурных генов. В зависимости от влияния на их работу низкомолекулярных молекул-эффекторов различают индуцибельные и репрессибельные (-руемые) опероны. В зависимости от эффекта связывания регуляторного белка с оператором опероны могут иметь негативный или позитивный контроль.

Биологическое значение оперонов.

С одной стороны, оперонная организация дает преимущество с точки зрения регуляции генов, объединенных функционально. Однако оперонная организация не отражает генезиса генов, так как гены в оперонах не являются родственными по происхождению. Поэтому для клетки проблема скорее заключается в том, чтобы дифференцировать действие единой регуляторной системы на каждый отдельный ген.

Объединение функционально близких генов в опероны, видимо, постепенно сложилось в эволюции бактерий по той причине, что у них перенос генетической информации обычно осуществляется небольшими порциями (например, при трансдукции или посредством плазмид). Значение имеет само по себе сцепление функционально родственных генов, что позволяет бактериям приобретать необходимую функцию в один этап.

Регуляция транскрипции в клетках осуществляется на уровне индивидуальных генов, их блоков и даже целых хромосом. Возможность управления многими генами, как правило, обеспечивается наличием у них общих регуляторных последовательностей нуклеотидов, с которыми взаимодействуют однотипные факторы транскрипции. В ответ на действие специфических эффекторов такие факторы приобретают способность с высокой точностью связываться с регуляторными последовательностями генов. Следствием этого является ослабление или усиление транскрипции (репрессия или активация) соответствующих генов.

Три основных этапа транскрипции - инициация, элонгация и терминация - используются бактериальными клетками для регуляции синтеза РНК. То же, по-видимому, характерно и для остальных живых организмов.

Основные термины по теме: оперон, промотор, ген-регулятор, терминатор

транскрипции, негативная регуляция генной активности, позитивная регуляция генной активности.

Задание №1. Схема оперона.

Изучить и зарисовать схему оперона. Определить функции отдельных структур оперона, сделать вывод.

Оперон

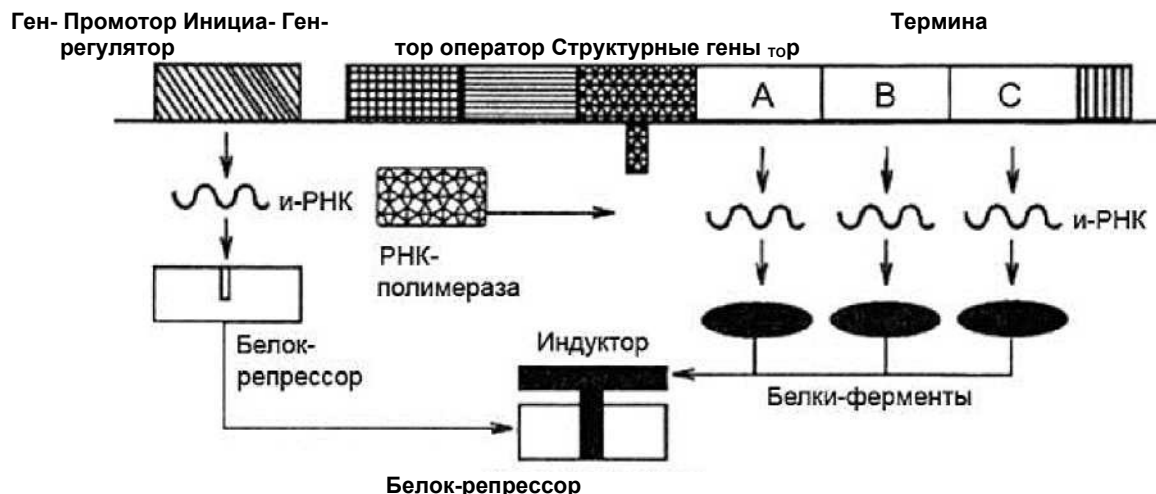


Рис. 1. Схема оперона

Задание №2. Механизм работы лактозного оперона.

Опишите механизм работы лактозного оперона на примере Лас-оперона E. Coli.

Ешерихия коли (*Escherichia coli*) - бактерия, которая синтезирует триптофан - важную аминокислоту. Эта бактерия использует в производстве триптофана пять энзимов. Рассмотрим сначала регуляцию синтеза тремя из них.

В состав Лас-оперона *E. Coli* входят 3 структурных гена, кодирующие ферменты: Р-галактозидазу, Р-галактозидпермеазу и Р-галактозидтрансацилазу, которые принимают участие в утилизации и метаболизме лактозы, промотор, оператор.

Клетки *E. coli* обычно растут на среде, используя в качестве источника углерода глюкозу. Если в среде культивирования глюкозу заменить на лактозу, то клетки адаптируются к новым условиям, начав синтез трех ферментов, которые обеспечивают утилизацию и метаболизм лактозы. При отсутствии индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. РНК-полимераза не может присоединиться к промотору, транскрипция структурных генов оперона не идет. В присутствии лактозы белок-репрессор присоединяет ее, изменяет свою конформацию и теряет сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены.

Задание №3. Механизмы работы генов у прокариот.

Рассмотреть механизмы работы генов у прокариот на примере активации генов, отвечающих за синтез лактозы и триптофана.

Задание №4. Организация генома прокариот.

Заполните таблицу «Организация генома прокариот».

Таблица 1

Организация генома прокариот

Структура генома	Особенности организации
Оперон	
Интрон-экзонная организация	
мРНК	

Вопросы к лабораторной работе:

1. Дайте определение: экспрессия гена, транскрипция, промотор, экзон, интрон, фактор транскрипции, ТАТА-бокс, РНК-полимераза II, первичный транскрипт, промРНК, мРНК, сплайсинг, сплайсосома, энхансер, сайленсер, позитивный контроль, негативный контроль транскрипции.
2. Каковы этапы транскрипции структурных генов?
3. Как образуются комплексы инициации транскрипции?
4. В чем особенности активности РНК-полимеразы II?
5. В чем состоит процессинг про-мРНК?
6. Каковы уровни регуляции транскрипции у эукариот?

Лабораторная работа №2

Тема: «Регуляция экспрессии генов эукариот. Специфическая регуляция генной активности. Неспецифическая регуляция генной активности»

Цель занятия: изучить особенности экспрессии генов у эукариот

Теоретическая часть

Несмотря на то, что основные принципы регуляции транскрипции генов у прокариотических и эукариотических организмов остаются неизменными - через специфические взаимодействия белков и нуклеиновых кислот друг с другом, а также между собой, данный процесс у эукариот характеризуется рядом существенных особенностей. Это связано, прежде всего, с необходимостью поддержания координированной экспрессии эукариотических генов в более сложноорганизованной генетической системе. Достаточно вспомнить, что в организме человека гистологически различают, по крайней мере, 100 типов клеток, формирующих его органы и ткани. Для любого типа клеток характерен свой уникальный набор экспрессирующихся генов, которые начинают функционировать во время дифференцировки клеток-предшественников. Кроме того, сам процесс формирования органов и тканей сопровождается пролиферацией строго определенных групп клеток, а также упорядоченным во времени и пространстве перемещением клеток. Все эти особенности жизнедеятельности клеток высших организмов обеспечиваются функционированием их генов.

Гены тех продуктов, которые необходимы клетке постоянно, такие как гены ферментов основных метаболических путей, экспрессируются на более-менее постоянном уровне в каждой клетке организма. Такие гены называют генами «домашнего хозяйства». *Постоянная экспрессия гена называется конститутивной экспрессией.*

Концентрация продуктов других генов увеличивается и уменьшается в ответ на молекулярные сигналы - это регулируемая экспрессия гена. *Гены, концентрация продуктов которых увеличивается при особых обстоятельствах, относятся к индуцибельным; увеличение экспрессии называется индукцией.*

Генная экспрессия - это процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.

Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях процесса: и во время транскрипции, и во время трансляции, и на стадии посттрансляционных модификаций белков.

Регуляция экспрессии генов позволяет клеткам контролировать собственную структуру и функцию и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации. Экспрессия генов является субстратом для эволюционных изменений, так как

контроль за временем, местом и количественными характеристиками экспрессии одного гена может иметь влияние на функции других генов в целом организме.

Контроль экспрессии генов осуществляется на следующих уровнях:

- на уровне транскрипции (контролируется время и характер транскрипции гена)
- на уровне процессинга первичного транскрипта
- при отборе зрелых мРНК для их транспорта в цитоплазму
- на уровне трансляции - отбор в цитоплазме мРНК для трансляции на рибосомах •

на уровне активности белка - селективная активация, инактивация или компартментация молекул белка после их синтеза.

Особенности экспрессии генов у эукариот

В клетках эукариот ядерная оболочка разделяет в пространстве процессы транскрипции и трансляции (прокариотическая транскрипция и белковый синтез являются единым процессом).

Сложность жизненного цикла многоклеточных организмов накладывает свои требования на особенности функционирования их генов. В частности, большое число генов и даже целые блоки их функционируют лишь на определенных стадиях эмбриогенеза и не транскрибируются в клетках взрослого организма. У человека к ним относятся, например гены α -фетопротеина. Экспрессия этих генов в клетках взрослого организма свидетельствует о развитии патологического процесса, в частности злокачественных новообразований в печени. Еще более ярким примером такого рода является избирательная инактивация одной из X-хромосом у самок млекопитающих.

Уникальна способность эукариот использовать для регуляции транскрипции своих генов изменения структуры хроматина. С помощью таких эффективных механизмов осуществляется репрессия и дерепрессия генов во время дифференцировки клеток, и соответствующее функциональное состояние отдельных генов, их больших массивов и даже целых хромосом может поддерживаться на протяжении всей жизни организма. Перестройки хроматина в окрестностях регуляторных участков генов происходят и в связи с более тонкой регуляцией их транскрипции.

На экспрессию эукариотических генов влияет амплификация генов - многократное увеличение числа копий одинаковых генов с целью интенсификации синтеза молекул, необходимых к определенному моменту времени, и рекомбинации ДНК.

У эукариот не установлено полной оперонной организации генетического материала. Гены ферментов определенной метаболической цепи могут быть расположены в разных хромосомах. Они обычно не имеют системы регуляции в виде гена-регулятора, оператора и промотора, поэтому синтезированные в ядрах эукариот мРНК моноцистронные. Регуляция активности генов у эукариот сложнее. В этом процессе принимают участие сразу несколько генов-регуляторов, то есть регуляция транскрипции эукариот является комбинативной.

Еще одна особенность генома эукариот - наличие специальных «усиливающих» сайтов ДНК - энхансеров. Они могут располагаться на большом расстоянии от промотора. Их функция - участие в регуляции активности структурных генов.

Геном эукариот подвергается регуляторному влиянию со стороны эндокринной системы организма. Многие гормоны являются индукторами транскрипции. В частности, это касается стероидных гормонов, которые обратимо связываются с белками-рецепторами, которые транслоцируют их в ядро.

Известно, что регуляция активности генов эукариот связана с образованием комплекса ДНК с белками хроматина. В таком виде гены нуклеосом не способны к транскрипции. Поэтому необходимым условием является частичная декомпактизация хроматина и ослабление связей с гистоновыми белками (система посттрансляционной модификации гистонов: ацетилирование, метилирование специфических остатков Lys).

Контроль экспрессии генов у эукариот осуществляется также на стадии трансляции (влияние ковалентной модификации на белковые факторы инициации).

Некоторые гены эукариот несколько раз повторяются, а определенные участки ДНК

вообще не играют генетической роли, например, сателлитная ДНК. Геном эукариот «избыточный». Кроме этого, в геномах эукариот содержатся последовательности, повторяющиеся несколько десятков, сотен и даже миллионов раз. Они находятся среди уникальной ДНК. К таким последовательностям принадлежат элементы с непостоянной локализацией. Их называют транспозонами или мобильными элементами. Повторяющиеся гены выполняют разнообразную биологическую роль: регуляция воспроизводства ДНК, участие в кроссинговере, обозначение границы между экзонами и интронами и т.д.

Наряду с обычными нуклеотидными последовательностями промоторной и терминаторной областей транскрипции у эукариот обнаружены такие специфические элементы регуляции, как усилители (энхансеры), и глушители (сайленсеры).

Энхансеры - это участки ДНК, которые действуют как усилители транскрипции, находясь на расстоянии нескольких сот и даже тысяч пар нуклеотидов от регулируемого гена; в других случаях энхансеры находятся в самих структурных генах в составе интронов. Вероятно, механизм действия энхансеров связан с изменением нуклеосомной структуры хроматина.

Сайленсеры - это участки ДНК, которые, располагаясь в нескольких сотнях пар нуклеотидов до или после регулируемого гена, выключают транскрипцию, изменяя структуру хроматина. Существуют мутации, которые не затрагивая сам глушитель, делают его неактивным и тем самым «разрешают» транскрипцию с промотора регулируемого гена.

Регуляция экспрессии (выражения) генов может осуществляться на нескольких уровнях: генном, транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном (функциональном).

- Первый из них связан с изменением количества или локализации генов, контролируемых данным признаком.

- Второй определяет, какие и сколько мРНК должны синтезироваться в данный момент.

- Третий обеспечивает отбор мРНК, транслирующихся на рибосомах.

- Четвертый связан с аллостерической (пространственной) регуляцией активности ферментов.

- Наконец, контроль действия генов может осуществляться путем посттрансляционной модификации полипептидов, посттранскрипционной модификации мРНК, и другими путями.

Основные термины по теме: экспрессия генов, хроматин, промотор, терминатор, энхансеры, сайленсеры, транскриптон.

Задание №1. Структура транскриптона.

Изучить и описать структуру транскриптона эукариот. Определить функции отдельных структур транскриптона, сделать вывод.

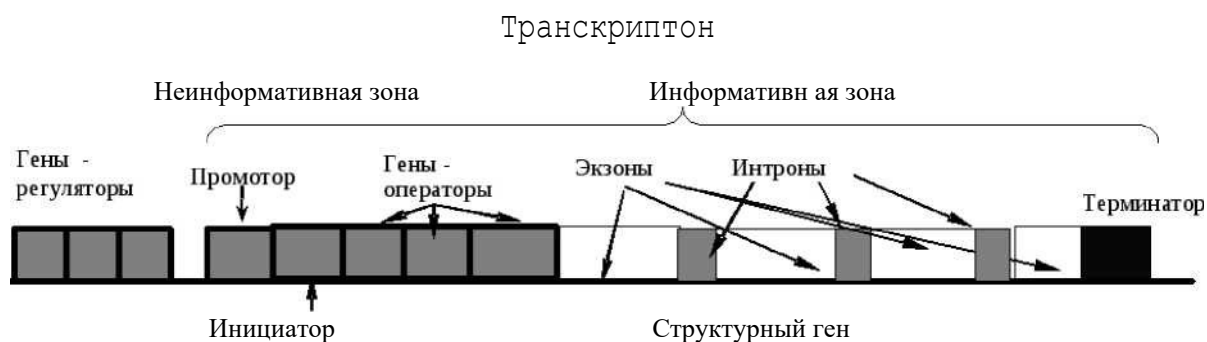


Рис. 9. Структура транскриптона

Задание №2. Сравнительная характеристика прокариот и эукариот.

Заполните таблицу 1, указав различия между прокариотами и эукариотами.

Таблица 1

Разница между прокариотами и эукариотами

	Прокариоты	Эукариоты
Структура генома		
Размер генома		
Локализация транскрипции и трансляции		
Организация генов		
Статус транскрипции по умолчанию		

Вопросы к лабораторной работе:

- Особенность функционирования генов прокариот и эукариот в отношении количества генов, реагирующих на регуляторный сигнал.
- Различия в организации большинства структурных генов эукариот и их рибосомных генов с позиции уровней регуляции экспрессии гена.
- Основные отличия регуляции транскрипции у про- и эукариот.
- Посттранскрипционная регуляция активности генов.
- Регуляции экспрессии гена на посттрансляционном уровне
- Сопоставление уровней регуляции экспрессии гена в отношении степени их инерционности и оперативности.
- Сравнительный анализ принципов регуляции экспрессии гена у прокариот и эукариот.
- Какую структуру имеет ген у эукариотических клеток?
- Какой процент ДНК эукариот отвечает за экспрессию генов?
- Какие молекулы принимают участие в регулировании работы генов у эукариот?

Лабораторная работа №3

Тема: «Регуляция экспрессии генов у эукариот. Конденсация и деконденсация хроматина. Альтернативные промоторы»

Цель занятия: изучить особенности экспрессии генов у эукариот.

Теоретическая часть

Конденсация и деконденсация хроматина. Это наиболее универсальный метод регуляции транскрипции. Когда нужно экспрессировать определенные гены, хроматин в этом месте деконденсируется.

Альтернативные промоторы. У гена может быть несколько промоторов, каждый из которых начинает транскрипцию с разных его экзонов в зависимости от типа клетки. В

конечном итоге будут синтезированы разные белки.

Система регуляции экспрессии генов у эукариот связана с особенностями функционирования эукариотического генома. Хотя и у прокариот, и у эукариот функционируют системы регуляторных белков, наличие ядра и нуклеосомная организация хроматина эукариот дают намного больше возможностей для регуляции.

Ядро явилось важнейшим эволюционным приобретением эукариот. Благодаря ядерной мембране, разделяются зоны транскрипции и трансляции, что позволяет осуществлять сложную и многообразную регуляцию экспрессии генов. Такая регуляция происходит на всех этапах.

Регуляция на уровне транскрипции. Основным уровнем регуляции экспрессии у эукариот является регуляция на уровне транскрипции. Варианты такой регуляции весьма разнообразны.

Наиболее универсальным методом регуляции транскрипции служит конденсация-деконденсация хроматина. Хорошо известно, что при активации генетического материала он деконденсируется. С другой стороны, далеко не весь эухроматин транскрибируется. Поэтому имеются и другие пути контроля транскрипции.

Для эукариот характерна дифференциальная экспрессия генов в разных клетках организма, поэтому многоклеточные организмы имеют разнообразные дифференцированные клетки. Хотя во всех клетках содержатся одинаковые гены, экспрессируются они не одинаково.

Основное направление регуляции клеточной дифференцировки осуществляется при помощи тканеспецифических транскрипционных факторов. Они представляют собой белки регуляторных генов, контролирующие дифференциальную активность других генов.

Иным направлением является использование альтернативных промоторов. В разных типах клеток с одного гена могут быть образованы разные белки. Так, ген белка *дистрофина* содержит 7 промоторов, которые считывают информацию, начиная с разных экзонов.

Большое значение в регуляции экспрессии генов у эукариот придается фактору метилирования ДНК внутри регуляторных областей. Метилированию подвергается цитозин в составе ЦГ-динуклеотида, что обычно приводит к инактивации гена. Деметилирование ДНК восстанавливает активность. Этот важный процесс регулируют ферменты *метилтрансферазы*.

Частным случаем регуляции на уровне транскрипции является гормональная регуляция, при которой гены «включаются» в ответ на внешний сигнал. Сигнал запускает экспрессию только тех генов, которые имеют специфические последовательности ДНК в своих регуляторных областях.

Весьма загадочным способом регуляции является геномный импринтинг - дифференциальное проявление отцовских и материнских генов в организме. Геномы будто бы «запоминают» свое происхождение. Механизм этого явления не установлен.

С данным явлением схожа инактивация X-хромосомы в соматических клетках женского организма млекопитающих. Правда, одна из двух X-хромосом в клетках плода инактивируется случайным образом, поэтому в разных клетках женского организма экспрессируются как отцовские, так и материнские X-хромосомы.

На процессы «включения» и «выключения» генов, их конденсации и деконденсации ощутимое влияние оказывают различные хромосомные перестройки, МГЭ, изменяющие эффект положения гена.

Для эукариот не характерна регуляция по типу оперона. Большинство м-РНК эукариот - моностронные. Более того, гены, контролирующие один метаболический путь, у эукариот часто разбросаны по всему геному. Но в этом правиле есть исключение.

Гены р-РНК и митохондрий транскрибируются на единую транскрипционную единицу, которая разрезается после процессинга. Считается, что такой способ позволяет унифицировать регуляцию схожих генов.

При наблюдении некоторых живых клеток, особенно растительных, или же клеток

после фиксации и окраски внутри ядра выявляются зоны плотного вещества, которое хорошо окрашивается разными красителями, особенно основными. Благодаря этому свойству выявленный компонент получил название «хроматин» (Флемминг, 1880).

Хроматин интерфазных ядер представляет собой несущие ДНК тельца (хромосомы), которые теряют в это время свою компактную форму, разрыхляются, деконденсируются. Степень деконденсации хромосом в ядрах разных клеток может быть различной. Когда хромосома или ее участок деконденсированы полностью, эти зоны называют диффузным хроматином. При неполном разрыхлении хромосом в интерфазном ядре видны участки конденсированного хроматина (иногда называемого гетерохроматином).

Степень деконденсации хроматина в интерфазе может отражать функциональную нагрузку этой структуры: чем более диффузен хроматин, тем выше в нем синтетические процессы. Так, в клетках лимфоцитов хроматин образует значительные скопления по периферии клеточного ядра. При стимуляции этих клеток к синтезу ДНК по мере включения предшественников ДНК (Н³-тимидина) наблюдается постепенная деконденсация хроматина. Таким же образом меняется структура хроматина при синтезе РНК. Падение синтеза РНК в клетках обычно сопровождается увеличением зон конденсированного хроматина. Так, в эритроцитах низших позвоночных практически весь хроматин ядер находится в конденсированном состоянии, и в этих ядрах не происходит синтеза ни РНК, ни ДНК. Если же ядра этих клеток стимулировать к синтезу РНК, то они переходят в диффузное состояние.

Максимальная конденсация хроматина отмечается во время митотического деления клеток, когда он образует плотные тельца — хромосомы. В этот период хромосомы не несут никаких синтетических нагрузок. Исходя из сказанного, можно считать, что хромосомы клеток могут находиться в двух структурно-функциональных состояниях: в рабочем, частично или полностью деконденсированном, когда в интерфазном ядре при их участии происходят процессы транскрипции и редупликации, и в неактивном — в состоянии метаболического покоя при максимальной их конденсации, когда они выполняют функцию распределения и переноса генетического материала, в дочерние клетки.

Альтернативный промотор [франц. *alternative*, от лат. *alter* - один из двух; лат. *promovere* — продвигать], состоящий из двух или более независимо функционирующих частей, расположенных перед одним или разными экзонами гена; обеспечивает образование на одном и том же гене разных по размерам молекул мРНК. Например, ген миодистрофии Дюшенна человека содержит не менее 5 элементов, осуществляющих специфическую транскрипцию первых экзонов этого гена в разных тканях и на разных стадиях эмбрионального развития.

Ключевые слова: *регуляция экспрессии генов, конденсация хроматина, деконденсация хроматина, хромосомные перестройки, альтернативный промотор.*

Задание 1. Строение эукариотического гена

Изучите рис. 1, зарисуйте схему строения эукариотического гена.

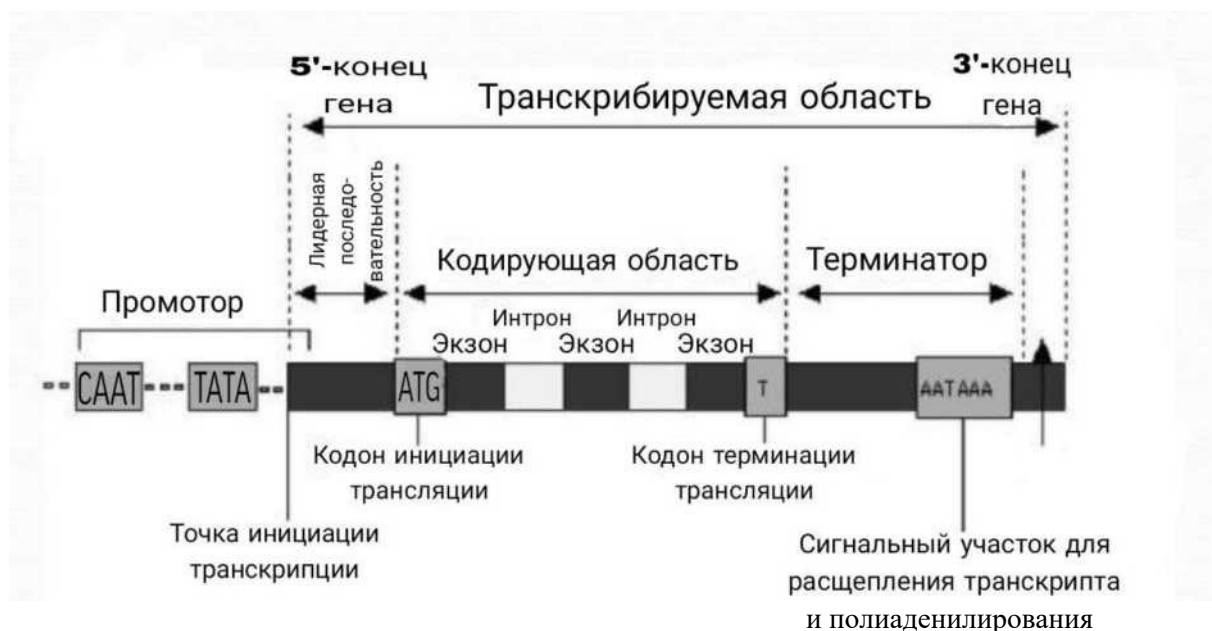


Рис. 1. Строение эукариотического гена

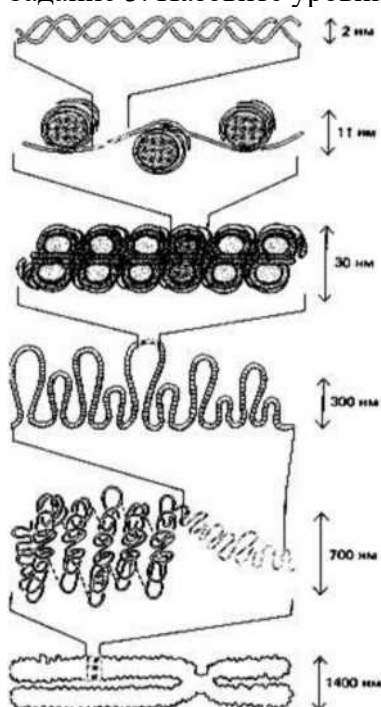
Задание 2. Строение эукариотического гена.

Название структуры гена	Функция
Промотор	
5' лидер	
Экзоны	
Интроны	
3' трейлер	
Терминатор	

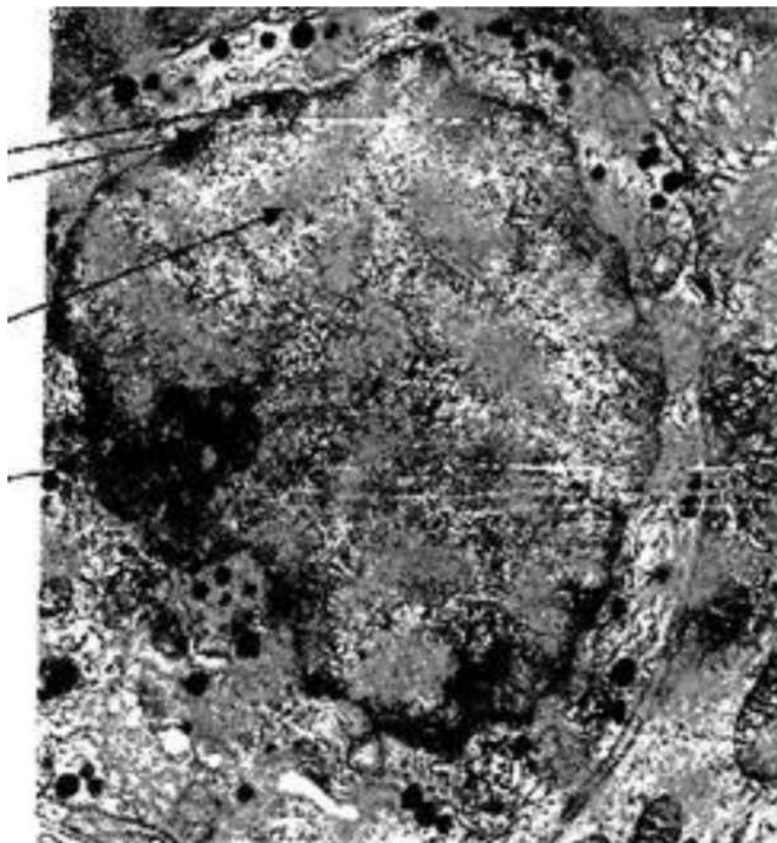
Таблица 1. Строение эукариотического гена

Заполните таблицу «Строение эукариотического гена».

Задание 3. Назовите уровни упаковки ДНК.



Задание 4. Хроматин в клетке эукариот. Подпишите: хроматин компактный; хроматин диффузный; ядрышко.



Лабораторная работа №4

Тема: «Метилирование и деметилирование ДНК. Гормональная регуляция»

Цель занятия: изучить особенности метилирования и деметилирования ДНК;

Знать виды гормонов;

Знать сущность гормональной регуляции;

Разные типы клеток, не похожие по функциям и морфологии друг на друга, дифференцируются из потомков одной плюрипотентной клетки (зиготы). Их дифференциация, основанная на практически идентичном генетическом материале, опосредована эпигенетическими модификациями. Каждая ткань организма обладает своим рисунком модификаций структуры хроматина, который сохраняется в ряду делений клетки. Наличие химических групп у определенных элементов генома может приводить как к индуцированию экспрессии генов, так и к ее блокированию.

Метилирование ДНК является одним из центральных регуляторных процессов в эпигенетике живых организмов, контролирует процессы репликации, транскрипции, трансляции, репарации ДНК, рекомбинации и транспозиции генов, служит механизмом дифференцировки клеток и тканей, дискриминации и репрессии генов, защищает геном от экспрессии генов экзогенных вирусных и эндогенных повторяющихся последовательностей ДНК. Два из четырех азотистых оснований - цитозин и аденин, могут быть метилированы, но метилирование аденина обнаруживается только у прокариот и растений. Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы в позиции С-5 или N-4 цитозина или позиции N-6 аденина. Процесс метилирования катализируют ДНК-метилтрансферазы, обеспечивающие регуляцию генов. Все известные ДНК-метилтрансферазы вовлекают S-аденозилметионин в качестве донора метильной группы в их процессы метилирования. Анализ геномов растений свидетельствует, что общая картина распределения 6mA в ДНК аналогична распределению 5mC, при этом данный показатель коррелирует с транскрипцией генов, как для 6mA, так и для 5mC. Анализ литературных источников показал, что обе метил-зависимые метки ДНК могут иметь определенную взаимозависимость, при этом увеличение 6mA в промоторных участках генов способствует их выключению.

Таким образом, механизмом эпигенетической регуляции является метилирование ДНК, в ходе которого метильная группа (CH₃) добавляется к цитозиновым основаниям ДНК. Особенностью метилирования у растений является то, что у них был обнаружен N6-метиладенин в геномной ДНК, в отличие от животных, для которых характерны цитозин-ДНК-метилтрансферазы, митохондрии растений обладают аденин-ДНКметилтрансферазами.

В последнее время удалось разработать биоинформационные инструменты для обнаружения и прогнозирования потенциальных сайтов метилирования с высокой специфичностью и точностью. Основными методами определения величины метильного статуса аденина в геномной ДНК являются: метил-зависимый рестрикционный анализ, SMRT и иммунопреципитация ДНК-аденин-метилтрансферазы.

Метилирование ДНК считается, в основном, присущим эукариотам. У человека метилировано около 1% геномной ДНК. В соматических клетках взрослого организма метилирование ДНК обычно происходит в CpG-динуклеотидах; В эмбриональных стволовых клетках встречается метилирование ДНК вне CpG-динуклеотидов; Около 60-70% всех CpG-динуклеотидов у млекопитающих метилированы; Остальные неметилированные CpG-динуклеотиды сгруппированы в CpG-островки (в 5' регуляторных областях многих генов).

Обратный процесс - деметилирование ДНК - может происходить пассивно и активно. В ходе пассивного деметилирования ДНК не происходит полное метилирование новосинтезированной цепочки ДНК по образцу старой в ходе последовательных циклов репликации. Таким образом, в дочерней цепи теряются метильные группы у числа цитозинов. Новый измененный рисунок будет наследоваться в ряду поколений, так как именно с него будут метилироваться последующие дочерние цепи ДНК.

В ходе активного деметилирования метильная группа удаляется с цитозина вне репликационного цикла. Активное деметилирование может происходить с помощью нескольких биохимических процессов. Основной путь активного деметилирования - ТЕТопосредованное окисление 5-метилцитозина. Продуктом окисления 5-метилцитозина является 5-гидроксиметилцитозин, который, в свою очередь, окисляется до 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина. Затем 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин вырезается, и апириимидиновый сайт репарируется вставкой цитозина. Каждый этап последовательного окисления 5- метилцитозина катализируется белками семейства ТЕТ - ТЕТ1, ТЕТ2 и ТЕТ3.

Активное деметилирование может пойти и по другому пути. Активность ферментов семейств AID/APOBEC приводят к дезаминированию 5-гидроксиметилцитозина с образованием 5-гидроксиметилурацила. При действии EDG/SMUG глюкозилаз осуществиться репарация с восстановлением цитозина. Кроме того, 5-метилцитозин в реакции дезаминирования может превращаться в тимин, который в дальнейшем будет также репарирован с вставкой цитозина.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов является важным элементом дифференцировки половых клеток во время сперматогенеза. Нарушения механизмов эпигенетического репрограммирования генома может привести к мужскому бесплодию. Эпигенетические события влияют на такие важные процессы по ходу сперматогенеза как конденсация хроматина, формирование XY-телец, сайленсинг ретротранспозонов, импринтинг генов, некоторые этапы мейоза и упаковка ДНК в ядрах сперматозоидов.

Гормональная регуляция. Установлено, что метилирование ДНК у животных подвержено гормональному (гидро-кортизон) контролю и модулируется антиоксидантами. Так, ионол (ВНТ) модулирует метилирование ДНК у крыс. Этот антиоксидант индуцирует de novo метилирующие ДНК--метилтрансферазы, а также увеличивает уровень транскрипции генов ЗЛМ--синтета-зы и P53. Высокоочищенные дексаметазон--рецепторные комплексы из печени крысы специфично связываются с ОС--обо-гащенными участками ДНК. Это - пер-вое указание на существование в ДНК особых сайтов связывания гормон--рецепторных комп-лексов (ГРК). ГРК преимущественно

связываются с гомологичной фракцией ДНК, транскрипция которой индуцируется кортизолом. В печени крысы кортизол индуцирует транспозицию специфических сайтов связывания ГРК из потенциально активной фракции ДНК в транскрибирующуюся фракцию ДНК. Очень важным было установление того факта, что метилирование ДНК эффективно контролирует гормональный сигнал: *in vitro* метилирование ядерной ДНК печени крысы гомологичной ДНК--метилтрансферазой препятствует связыванию ГРК. Таким образом, в клетках существует некий обоюдный контроль: с одной стороны, гормоны контролируют метилирование генома, а с другой - метилирование ДНК не безразлично для реализации гормональных сигналов.

Это оказалось справедливым и для растений, у которых метилирование ДНК контролируется разными гормонами (фитогормоны разных классов, специфические регуляторы роста и развития растений). Под действием разных фитогормонов у растений заметно уменьшается глобальное метилирование ДНК в клеточном цикле. Кроме того, фитогормоны подавляют метилирование вновь синтезируемых цепей ДНК. Таким образом, впервые было обнаружено воздействие фитогормонов на геном путем модуляции его метилирования. Модуляция метилирования ДНК - один из ведущих механизмов действия гормонов у растений и животных.

Ключевые слова: метилирование ДНК, аденин, цитозин, промотор, CpG-островок, экспрессия гена, фитогормоны, ГРК.

Задания для студентов

Задание №1. Термины.

Дайте определения терминам.

1. Активное деметилирование
2. Восстановление плюрипотентности
3. Пассивное деметилирование
4. Тератома
5. Метилирование ДНК *denovo*
6. CpG-островки.

Задание №2. Метилирования и деметилирования ДНК. Описать сущность и особенности процесса.

Задание №3. Функции белков, участвующих в метилировании цитозина.

Заполните таблицу 1. Опишите функции белков, участвующих в метилировании цитозина, и их функции.

Таблица 1

Белки, участвующие в метилировании цитозина.

Белок

Функция

AID

AROBEC1

DNMT1

DNMT2

DNMT3A

DNMT3B

DNMT3L

NP95

SmcHD1

TDG

TET1

TET2

TET3

Явление метилирования цитозина имеет определенное влияние на возникновение мутаций в ДНК и на эволюционные изменения геномов. Дело в том, что нуклеиновые

основания, содержащие аминокетильную группу - таковыми являются цитозин и аденин - могут подвергаться дезаминированию. Дезаминирование может в части случаев происходить спонтанно, а кроме того, в клетках эукариот присутствуют ферменты дезаминазы, которые могут катализировать реакцию дезаминирования. При дезаминировании цитозина образуется урацил. Если это происходит в цепочке ДНК, урацил обычно распознается и удаляется белками эксцизионной репарации, и на его место возвращается цитозин, поскольку он комплементарен гуанину, расположенному напротив в комплементарной цепи. Но при дезаминировании 5-метилцитозина образуется тимин. Возникает некомплементарная пара (гуанин-тимин), в которой оба основания являются обычными для ДНК. При репарации этого участка после восстановления комплементарности может с равной вероятностью произойти восстановление пары G-C или замещение ее на пару A-T. Вследствие описанного процесса мутации типа замены цитозина на тимин в динуклеотидах CpG возникают примерно в 10 раз чаще любой другой возможной замены. Это наблюдается и в ходе формирования опухолевых клонов, которые склонны быстро накапливать мутации, и при филогенетической реконструкции эволюционных преобразований геномов различных организмов.

Вопросы к лабораторной работе

1. Избирательность метилирования.
2. Волны метилирования в онтогенезе.
3. Возникновение импринтинга в эволюции.
4. Метилирование и инактивация X- хромосомы.
5. Метилирование и возникновения рака.

Лабораторная работа №5

Тема: «Геномный импринтинг. Альтернативный сплайсинг. Тканеспецифическое редактирование РНК»

Цель занятия: изучить особенности экспрессии генов у эукариот.

Теоретическая часть

Термин «импринтинг» впервые предложил американский генетик Х. Кроуз в 1960 г. для описания элиминации отцовских хромосом у насекомых.

Импринтинг - запечатление, широко распространенный феномен реактивного научения в живой природе. Классическим примером импринтинга могут служить поведенческие акты выводковых птиц: выращенные в течение первой недели жизни в изоляции от сородичей птенцы, предпочитали в будущем следовать за людьми, а не за взрослыми особями своего вида.

Геномный импринтинг - различная экспрессия у потомства гомологичных генов, полученных от отца или матери. Геномный импринтинг - широко распространенное явление, состоящее в том, что некоторые гены в половых клетках родителей особым образом «метятся», например, путем метилирования цитозиновых оснований. «Помеченный» ген у потомства просто не работает. Некоторые гены отключаются в сперматозоидах, другие в яйцеклетках. В результате часть признаков потомство наследует только от матери (если соответствующие гены отключены в сперматозоидах), часть - только от отца (если ген отключен в яйцеклетке). В половых клетках потомства старые метки удаляются и заменяются новыми. Поэтому у внуков могут проявиться признаки деда или бабушки, которые не были выражены у родителей.

Импринтинг - это пример так называемой «эпигенетической», или надгенетической наследственности, то есть наследственных свойств, не связанных с изменением основной структуры генов - последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК. Физически он обычно представляет метилирование отдельных нуклеотидов и/или модификацию белков, связанных с ДНК. Ставится эта метка в момент формирования половых клеток - сперматозоидов и яйцеклеток.

Следствием геномного импринтинга является различное течение заболевания в

зависимости от прохождения мутантного аллеля через мужской или женский гаметогенез. Для болезней геномного импринтинга характерным является разное клиническое проявление генетических нарушений, затрагивающих один и тот же район генома, в зависимости от того, имеют они материнское или отцовское происхождение. Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что феномену геномного импринтинга подвержены участки многих хромосом человека - 1, 5, 6, 7, 11, 13, 15, 19, 20, X-хромосома.

Геномный импринтинг у млекопитающих (различия в степени метилирования отцовских и материнских аллелей гена) может обусловить функционирование только одного из аллелей (неметилированного или неометилированного). Дефект функционирующего аллеля приводит к наследственным заболеваниям. Классическим примером такого наследования являются синдромы Ангельмана и Прадера-Вилли, связанные с различными вариантами метилирования отцовских и материнских аллелей двух генов, расположенных близко друг к другу на длинном плече хромосомы 15.

Синдром Прадера-Вилли связан с инактивацией генов хромосомы 15q11-13, в 75 % случаев с делецией критического района хромосомы 15 отцовского происхождения, а в остальных 25 % наблюдаются однородительские дисомии материнского происхождения. И в том и другом случае инактивированными оказываются гены отцовского происхождения, локализованные в области 15q11-13.

Клиника: малый вес при рождении, мышечная гипотония, психомоторное развитие замедлено, у многих приступы апноэ во сне. После 6 месяцев наблюдается гиперфагия (повышенный аппетит), что приводит к ожирению. У многих развивается сахарный диабет, наблюдается снижение чувствительности к боли, половое развитие отстает от нормы, олигофрения разной степени выраженности.

Синдром Тернера. Другим ярким примером роли геномного импринтинга служит синдром Тернера, при котором, наряду с инактивацией практически всей X-хромосомы, у женщин наблюдается и родительский импринтинг отдельных генов X-хромосомы. Так, импринтингу подвергается ген человека, определяющий социальные контакты. Нарушение гена приводит к аномалии в поведении и к снижению величины IQ.

Больные с синдромом Тернера получают единственную X-хромосому либо от отца, либо от матери. Оказалось, что пациенты с X-хромосомой, полученной от отца, имеют существенно меньше аномалий в социальном поведении, они менее подвержены аутизму - уходу в себя, неспособности контактировать с внешним миром. Несомненно, велико влияние окружения и приобретенных навыков обучения, однако проведенный статистический анализ указывает на генетическую природу выявленных различий.

Сопоставление результатов психологических тестов с материнским или отцовским происхождением X-хромосомы у больных с синдромом Тернера позволило заключить, что в X-хромосоме человека расположен ген, подвергающийся родительскому импринтингу и определяющий особенности поведения и уровень интеллекта.

Связь геномного импринтинга с другими наследственными патологиями человека на уровне хромосом или отдельных генов в настоящее время широко изучается. Так, например, при хорее Гентингтона и спинно-мозжечковой атаксии I заболевание возникает раньше и протекает тяжелее, если унаследованные гены имеют отцовское происхождение. При нейрофиброматозе 1 и 2, миотонической дистрофии, наоборот, заболевание имеет более раннее начало и тяжелое течение при унаследовании мутантных генов от матери. Не вызывает сомнения причастность геномного импринтинга к этиологии опухолевого роста.

Альтернативный сплайсинг — процесс, позволяющий одному гену производить несколько мРНК и соответственно белков.

Большинство генов в эукариотических геномах содержат **экзоны** и **интроны**. После транскрипции в процессе **сплайсинга интроны** удаляются из пре-мРНК. А вот экзон может включаться (или нет) в состав конечного транскрипта. Таким образом, с помощью альтернативного сплайсинга можно получить множество транскриптов, а следовательно и белков.

Объединение различных сайтов сплайсинга позволяет индивидуальным генам экспрессировать множество мРНК, которые кодируют белки, порой, с антагонистическими функциями. Экзон одного варианта сплайсинга может оказаться интроном в альтернативном пути. Разные варианты сплайсинга могут приводить к образованию разных изоформ одного и того же белка. Например, ген тропонина состоит из 18 экзонов и кодирует многочисленные изоформы этого мышечного белка. Разные изоформы тропонина образуются в разных тканях и на определенных стадиях их развития.

Тканеспецифическое редактирование РНК также протекает на уровне процессинга. Выражается в замене отдельных нуклеотидов в РНК в определенных тканях организма.

Кроме того, у эукариот иРНК часто не подвергается процессингу вообще (а распадается) или подвергается с задержкой. Это также можно рассматривать как способ регуляции экспрессии генов.

Ключевые слова: геномный импринтинг, синдром Прадера—Вилли, синдром Тернера, альтернативный сплайсинг, экзоны, интроны, тканеспецифическое редактирование РНК.

Задание 1. Сплайсинг иРНК

Изучите рис.2. Используйте изображенную на нем схему альтернативного сплайсинга в качестве образца для выполнения задания 5.

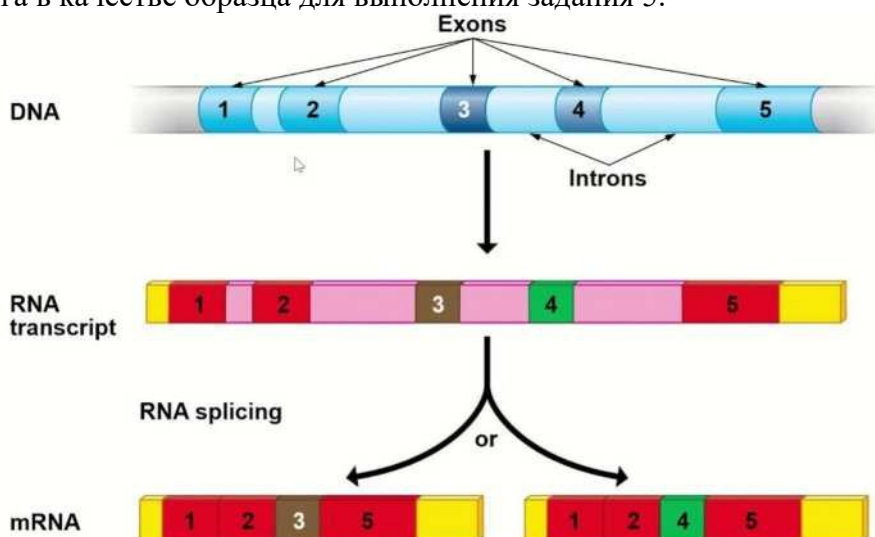


Рис.1. Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта

Задание 2. Составьте не менее 3 вариантов альтернативного сплайсинга первичного транскрипта, изображенного на рис. 2.

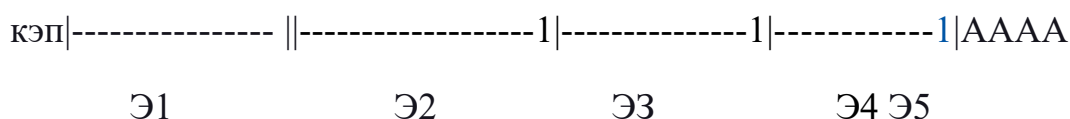


Рис.2. Первичный транскрипт

Вопросы к лабораторной работы

1. Синтез РНК на ДНКматрице. Общие принципы транскрипции.
2. Теории мозаичного строения генов эукариот.
3. Организация и функции промоторов.
4. Ферменты транскрипции.
5. Интроны и экзоны. Основные характеристики интронов.
6. Процессинг РНК эукариот и прокариот. Альтернативный сплайсинг
7. Обратная транскрипция, ее медицинское и хозяйственное значение
8. Трансляция у прокариот и у эукариот.

Лабораторная работа №6

Тема: «Регуляция стабильности иРНК. Посттрансляционная модификация белка. Риборегуляторы»

Цель занятия: изучить особенности регуляции стабильности иРНК; знать виды и механизмы посттрансляционной модификации (процессинга) пробелков; знать сущность риборегуляторов.

Задачи

Теоретическая часть

Транспорт РНК из ядра и последующее редактирование РНК могут быть объектом регуляции.

Длина первичных транскриптов РНК примерно в 10 раз больше длины молекул иРНК в цитоплазме. Значительная часть последовательностей нуклеотидов разрушается в ядре. Основную массу этой разрушаемой РНК составляют интронные отделы транскриптов, удаляемые при сплайсинге, однако не исключается возможность, что часть разрушаемой РНК может иметь значение для одних клеток и не использоваться другими. Транспорт через ядерную мембрану - активный процесс и требует определенных знаков структуры на РНК. Молекулы иРНК не покидают ядро до тех пор, пока не произойдет сплайсинг интронов и этот механизм задержки РНК в ядре несомненно должен быть регулируемым. иРНК попадающая в цитоплазму затем переносится в соответствующие отделы клетки, что определяется также определенными особенностями структуры 3' конца молекулы, который не используется в трансляции РНК.

Еще один механизм модификации РНК после ее попадания в цитоплазму это редактирование РНК. Процессы редактирования, т.е. изменения последовательности нуклеотидов в иРНК путем вставки, удаления или модификации оснований наблюдаются во многих случаях. Так, иРНК кодирующая белки митохондрий у трипаносом подвергается модификации в форме вставки одного или нескольких уридиловых нуклеотидов, что значительно изменяет «смысл» кодируемых белков. Активное редактирование иРНК обнаружено и у растений. При этом идет химическая замена Ц на У без вставки. Редактирование иРНК встречается и у млекопитающих. РНК, кодирующая аполипопротеин В в кишечнике подвергается редактированию путем дезаминирования Ц с образованием У, что вызывает образование терминирующего кодона в середине молекулы иРНК. При трансляции такой иРНК образуется укороченная копия аполипопротеина В-апо В-48. В печени эта иРНК не подвергается редактированию и клетки печени синтезируют полный апопротеин апоВ-100.

Продолжительность «жизни» иРНК можно регулировать.

Все бактериальные иРНК довольно быстро разрушаются и синтезируются. Время их полураспада не превышает 3 минут. Это обеспечивает быстрое приспособление микроорганизмов к меняющимся условиям окружающей среды. иРНК эукариотических клеток более стабильны. Стабильность иРНК определяется особенностями структуры самих РНК. Молекулы иРНК модифицируют свои 3' концы присоединением полиаденилового фрагмента. По мере участия иРНК в процессах трансляции, длина этого фрагмента уменьшается. Критическим для стабильности считается 30 адениловых

нуклеотидов. В частности сигналами для быстрого разрушения молекул могут служить последовательности богатые У и А на 3' концах этих РНК, которые являются сигналами для более быстрого удаления полиадениловых участков РНК. Стабильность РНК может усиливаться некоторыми гормонами стероидной природы, которые не только стимулируют образование новых молекул РНК, но и стабилизируют функционирующие. В ряде случаев стабильность РНК определяется скоростью трансляции и потребностью белков. Например, стабильность РНК, кодирующих гистоны, резко снижается, если замедляется синтез ДНК, с которой гистоны связываются. Этим поддерживаются определенные соотношения между двумя типами молекул.

Еще один пример регуляции продолжительности жизни РНК приводится на рис 1. в ответ на повышение поступления железа происходит усиление синтеза ферритина, связывающего и депонирующего железо в клетке и снижение синтеза рецептора трансферрина, что обеспечивает снижение поступления железа. Оба эффекта опосредованы одним и тем же чувствительным к железу белком аконитазой, которая участвует в двух разных механизмах.

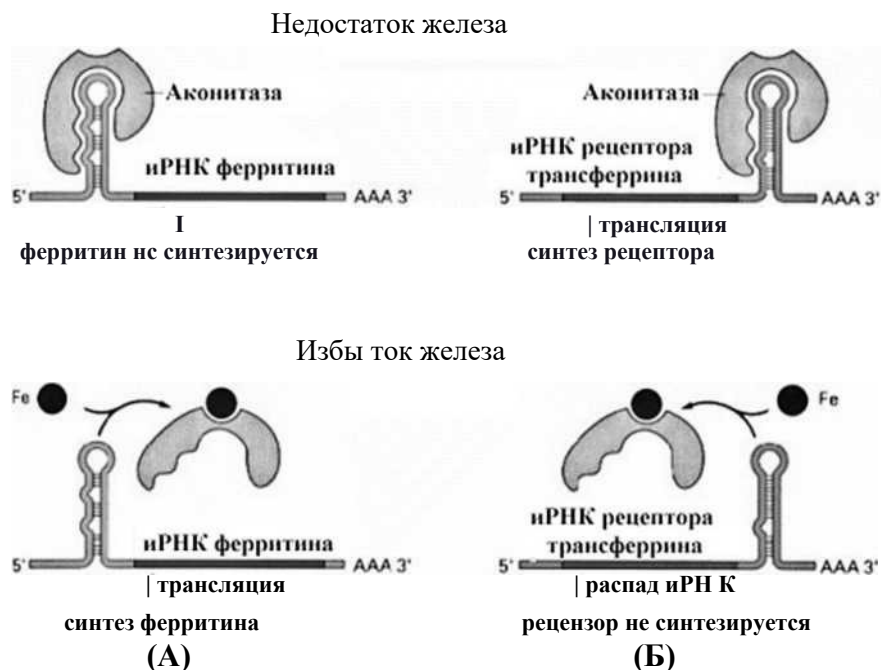


Рис 1. Влияние избытка и недостатка железа на синтез белков, участвующих в его обмене. Таким образом регуляция экспрессии генетической информации может быть направлена и на процессы транспорта молекул белков в клетке, а также на процессы посттрансляционной модификации молекул и процессы их распада.

Виды и механизмы посттрансляционной модификации (процессинга) пробелков:
химическая модификация (виды, примеры);
ограниченный протеолиз;
самосборка белка.

Многие белки синтезируются в неактивном виде (в виде предшественников) и после схождения с рибосом подвергаются постсинтетической модификации. Виды модификации белков:

1. **частичный (ограниченный) протеолиз** (удаление N-концевого метионина и сигнального пептида, образование активных форм ферментов и гормонов)
2. **ацетилирование:** в большинстве случаев иницирующий метионин удаляется путем гидролиза, и к новой N - концевой аминокислоте добавляется ацетильная группа. Ацетил-КоА - донор ацетильной группы для этих реакций.

Ацетилированию подвергаются гистоновые белки.

3. **метилование** происходит по остаткам лизина в некоторых белках типа калмодулина и цитохрома с. S-аденозилметионин - донор активной метильной группы
4. **фосфорилирование** - одна из наиболее популярных модификаций белков, которые происходят в животных клетках. Реакции фосфорилирования белков составляют часть механизмов регуляции биологической активности белка и являются обратимыми. Реакции фосфорилирования катализируются **протеинкиназами**, а реакции отщепления остатков фосфата **протеинфосфатазами**. Примером такого рода реакций могут быть реакции фосфорилирования гликоген синтазы и гликоген фосфорилазы в гепатоцитах в ответ на действие глюкагона - гормона поджелудочной железы. Фосфорилирование синтазы ингибирует ее активность, в то время как активность фосфорилазы повышается. Эти два синхронные события ведут к повышению поступления печеночной глюкозы в кровь. Наоборот, дефосфорилирование вызывает обратное соотношение активностей и клетки печени активно синтезируют гликоген.
5. остатки тирозина в некоторых белках могут **сульфатироваться**. Примерами таких белков могут быть фибриноген или гастрин. Донором сульфата для белков, как и при сульфатировании других молекул является **3'-фосфоаденозил-5'-фосфосульфат (ФАФС)**. Присоединение сульфата к остаткам тирозина необходимо для проявления функции белков и является необратимым процессом в отличие от фосфорилирования тирозина, используемого в регуляторных механизмах клетки.
6. **Пренилирование** - присоединение 15-углеродной фарнезильной или 20 углеродной геранилгеранильной групп к акцепторным белкам. Фарнезил и геранилгеранил - изопреноиды, получаемые на пути синтеза холестерина. Изопреноидные группы присоединяются к остаткам цистеина на С конце белков тиоэфирной связью (C-S-S). Последовательность на С - конце белков, подвергающихся пренилированию: СААХ, где С - цистеин, А - любая алифатическая аминокислота (кроме аланина) и Х - С-концевая аминокислота. Для проведения реакции присоединения пренильных групп, три С- концевые аминокислоты молекулы предшественника (ААХ) удаляются, а цистеин активируется метилированием при участии S-аденозилметионина как донора метильной группы. Примерами пренилированных белков могут служить белки, связывающие и гидролизующие ГТФ. Многочисленные G-белки участвующие в передаче сигналов имеют гамма субъединицу, модифицированную геранил-геранилом.
7. Модификации белков, которые зависят от витамина С как кофактора, включают **гидроксилирование** пролина и лизина. Гидроксилирующие ферменты - **пролилгидроксилазы** и **лизилгидроксилазы**.
8. Витамин К - кофактор в **карбоксилировании** остатков ГЛУ. Результатом этой реакции является у-карбоксиглутаминовая кислота. Это соединение важно для функции ряда белков, участвующих в свертывании крови.

Посттрансляционная модификация полипептида и превращение его в функционально активную молекулу белка завершает процесс реализации генетической информации. Она представляет собой различные модификации определенных аминокислот (фосфорилирование, ацетилирование), удаление некоторых из них, и на этой основе формирование вторичной, третичной, четвертичной структуры белка. На

посттрансляционном уровне также возможна регуляция экспрессии. Широко

распространен механизм регуляции активности ферментов, основанный на присоединении молекул-эффекторов, в роли которых часто выступают конечные продукты биосинтеза.

В последние годы в геномах разных животных были обнаружены многочисленные РНК, выполняющие регуляторные функции. Они получили название риборегуляторов. Особое значение имеют короткие двуниевые микро-РНК. Их способность ослаблять работу отдельных генов получила название РНК-интерференции.

Примеров таких риборегуляторов уже сейчас можно привести немало. Так, установлено, что не кодирующий белок участок гена *H19* имеет отношение к ряду процессов, протекающих в клетках, и, в частности, к их злокачественному перерождению. Другой РНК-кодирующий ген контролирует работу белок-кодирующего гена *HFE*, вовлеченного в метаболизм железа и связанного с наследственным заболеванием хемохроматозом. В последнем случае РНК-продукт кодируется тем же самым геном, который он регулирует, но его образование осуществляется на другой нити ДНК. В результате так называемый антисмысловой (комплементарный) РНК-продукт способен взаимодействовать с мРНК, образуя гибриды, неспособные транслироваться в рибосомах с образованием белка. Еще один интересный ген — ген РНК-активатора стероидного рецептора. Он обеспечивает активность стероидных рецепторов за счет образования комплекса с этим белком.

Ключевые слова: сплайсинг, модификации РНК, посттрансляционная модификация белка, частичный (ограниченный) протеолиз, ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, сульфатирование, пренилирование, гидроксילирование, риборегуляторы.

Задание 1. Самосборка белка.

Рассмотрите и подпишите схему самосборки белка.

Сделайте обозначения:

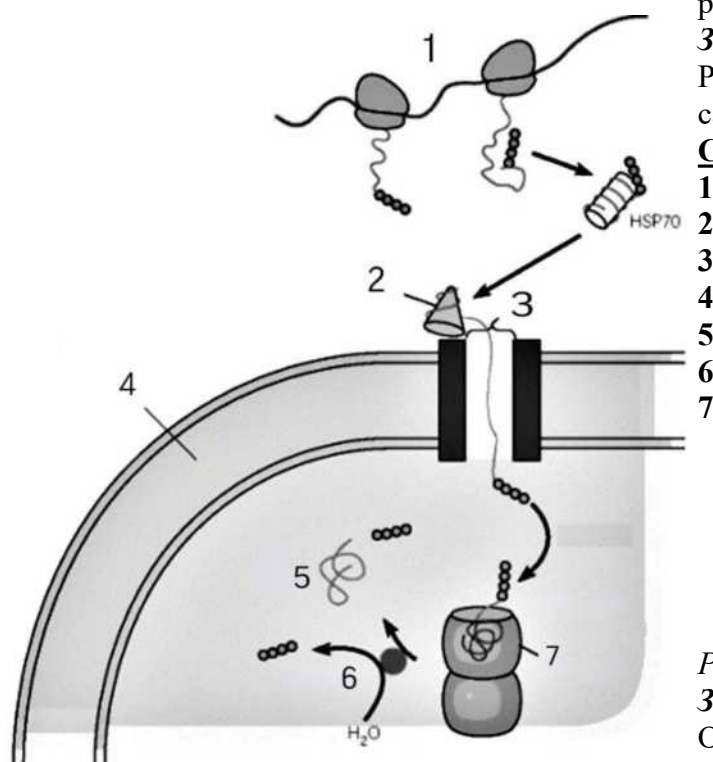


Рис 1. Самосборка белка

Задание 2. Самосборка белка.

Опишите процесс самосборки белка, укажите его особенности.

Лабораторная работа №7

Тема: «Компенсация дозы генов. Компенсация дозы генов у дрозофилы. Компенсация

дозы генов у млекопитающих»

Цель занятия:

Изучить особенности компенсации дозы генов у дрозофилы и млекопитающих.

Задачи занятия:

Изучить устройство

Уметь правильно оформлять лабораторную работу

Теоретическая часть

В генетическом смысле оба пола, как у дрозофилы, так и у млекопитающих различаются только числом и составом половых хромосом. При этом у самцов гены, локализованные в X-хромосоме, представлены в одной дозе, а у самок - в двух. Если бы X-хромосомные гены функционировали с одинаковой интенсивностью, количество продуктов этих генов у самок было бы вдвое больше, чем у самцов. Однако, этого не происходит. Существуют механизмы компенсации дозы генов. Разумно предположить, что для уравнивания интенсивности функционирования X-хромосомных генов можно заставить их функционировать вдвое интенсивнее у самцов, или же инактивировать одну из X-хромосом самок. Природа использовала оба механизма. У дрозофилы дополнительно активируется единственная X-хромосома самца до уровня двух X-хромосом самки, а у млекопитающих инактивируется одна X-хромосома, в результате чего уровень экспрессии у самок уменьшается до уровня единственной X-хромосомы самца.

Дозовая компенсация генов — эпигенетические механизмы, позволяющие уравнивать уровень экспрессии сцепленных с полом генов у самцов и самок тех видов, в которых определение пола происходит с помощью половых хромосом.

Задания для студентов.

Задание №1. Баланс хромосом и дифференцировка пола.

Составьте схему - Баланс хромосом и дифференцировка пола.

На начальных этапах формирования пола у эмбрионов действуют гены *sis-a*, *sis-b* и *da*. Белковые продукты этих генов образуют комплексную молекулу, которая включает транскрипцию гена *Sxl*.

Количество этих комплексных молекул зависит от дозы генов; доза генов в организме самки на ранней стадии развития эмбриона, когда еще не включен механизм дозовой компенсации, в 2 раза больше, чем в организме самца, поэтому ген *Sxl* включается только у зародышей самок. Продукт этого гена, в свою очередь, запускает каскад других генов; образующиеся белки направляют развитие в сторону формирования самки. Дифференцировка пола идет при этом по 3 м направлениям.

В организме зародыша самца количество комплексных молекул в 2 раза меньше и они могут запустить транскрипцию гена *Sxl* только с другого, более позднего промотора. В этом случае образуются другие транскрипты (с иными экзонами), другие белки, развитие идет по мужскому типу.

Уже первые эксперименты показали, что в единственной политенной X- хромосоме

самца количество негистоновых белков примерно в 1,5 раза больше, чем было бы в одной X-хромосоме самки. Разрыхленность структуры и обогащенность негистоновыми белками является структурной основой для дозовой компенсации. Действительно, интенсивность транскрипции в одной X-хромосоме самца в два раза выше, чем в одной X-хромосоме самки.

Оказалось, что существует целый механизм, контролирующий формирование разрыхленной структуры единственной X-хромосомы самца. Выделены продукты 4-х генов: *msl-1*, *msl-2*, *msl-3* и *mle* (MSL-белки), участвующих в этом процессе. Все четыре MSL белка образуют комплекс и связываются с сотнями участков X-хромосомы самца, обеспечивая диффузность ее структуры. Присутствие в комплексе каждого из MSL белков необходимо для нормального функционирования всего комплекса [4].

В белке **MSL-2** был обнаружен особый участок, имеющий способность интенсивно связываться с ДНК и называемый ринг-фингером, **MSL-3** белок по-видимому имеет другой активный участок - "хромо-домен" - особенность, характерную для белков, связывающихся с хроматином. Кроме MSL белков в этом процессе участвуют молекулы других белков - гистонов H4. Гистоны обычно выполняют обратную функцию - в комплексе с молекулой ДНК они образуют нуклеосомы, в составе которых ДНК упаковывается более плотно и становится более компактной. Гистоны H4, декомпактизирующие X-хромосому, отличаются от гистонов H4, компактизирующих ДНК тем, что они модифицированы: аминокислота лизин, находящаяся в 16 положении в молекуле H4, у них ацетилирована, т.е. содержит ацетильный остаток. Оказалось, что такие модифицированные, или *H4Ac16*, гистоны в хромосомах локализуются в тех же самых районах, что и MSL белки [1].

Предполагают, что белки MSL взаимодействуют с регуляторными элементами хромосом, контролирующими транскрипцию и структуру хроматина. Молекулярный анализ гена *mle* показал, что он имеет гомологию с известными ранее генами, участвующими в расплетании двух цепей ДНК - процесса, необходимого для транскрипции (фермент хеликаза) [1].

Дозовая компенсация у дрозофилы контролируется тем же геном *Sxl*, который осуществляет и общий контроль за развитием пола. Нормальный белок гена *Sxl* предотвращает дозовую компенсацию у самок, не позволяя белкам MSL расположиться на их X-хромосомах. В случае мутации гена *Sxl*, белки MSL появляются в X-хромосомах самок, нарушая тем самым весь процесс дозовой компенсации.

Полагают, что белок гена *Sxl* взаимодействует в первую очередь с геном *msl-2* (Рисунок 1).

У самок ген *Sxl* находится во "включенном" состоянии и он подавляет трансляцию мРНК гена *msl-2*. Небольшой интрон в 5' - нетранскрибируемом районе (UTR на Рисунке 1) удаляется в транскрипте гена *msl-2* у самца, но сохраняется в транскрипте самки. Таким образом, белок гена *Sxl* непосредственно контролирует альтернативный сплайсинг этого интрона. В гене *msl-2* есть ещё, один сайт связывания с белком SXL - на 3'-конце (3'UTR на Рисунке 1). Непонятно каким образом всё, это влияет на трансляцию гена *msl-2* у самок, тем не менее, продукт гена *msl-3не* поступает в ядро. В его отсутствие, другие белки не способны ассоциировать с X-хромосомами, ацетилированные формы гистонов H4Ac16 не накапливаются, и X-хромосома самки не становится сверхактивной в транскрипции (Рисунок 1).

У самцов ген *Sxl* выключен. В отсутствие белка *Sxl* ген *msl-2* экспрессируется полностью, и весь набор белков ассоциируется с X-хромосомой самца. В результате происходит и ацетилирование гистонов H4, и как следствие, изменение структуры хроматина с последующей гиперактивацией транскрипции.

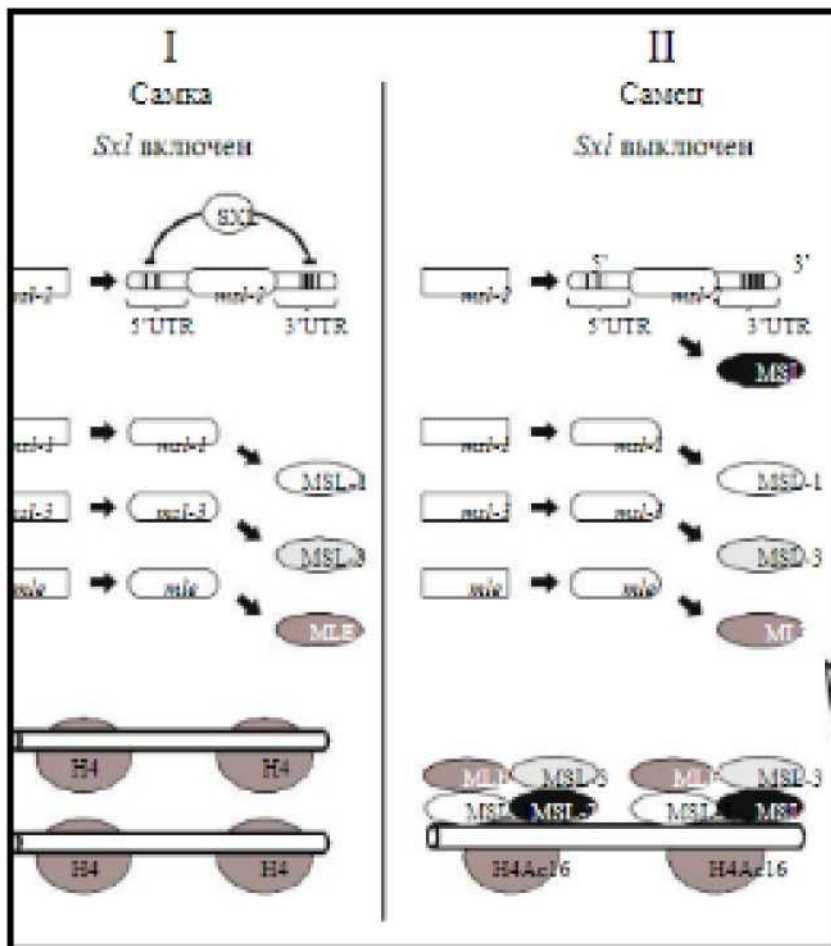


Рис. 1. Схема регуляции дозовой компенсации у дрозофилы

Компенсация дозы генов у млекопитающих

Как уже было отмечено выше, дозовая компенсация у млекопитающих происходит в результате инактивации одной из X-хромосом у самок.

В 1949 году М. Барр обнаружил компактные глыбки хромосомного материала в ядрах нервных клеток у кошек, у котов таких глыбок не было. По имени исследователя эти структуры были названы тельцами Барра. Через 10 лет С. Оно пришел к выводу, что тельце Барра формируется из одной X-хромосомы в каждой соматической клетке у самок млекопитающих.

В 1961 году М. Лайон сделала вывод о том, что дозовая компенсация генов, локализованных в X-хромосомах млекопитающих, осуществляется за счёт инактивации одной из двух родительских хромосом в каждой соматической клетке самки.

Процесс инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих был назван лайонизацией. Лайонизация X-хромосомы происходит в раннем эмбриональном развитии. Инактивированная X-хромосома гетерохроматизирована и транскрипционно неактивна на протяжении всего клеточного цикла; она реплицируется в поздней S-фазе, позже аутомом и активной X-хромосомы. Таким образом, одна из X-хромосом самок млекопитающих приобретает компактное состояние и инактивируется, в результате чего число доз X-хромосомных генов у самцов и самок уравнивается и составляет одну дозу.

Оказалось, что в X-хромосомах млекопитающих существует особый центр инактивации (XIC - *Xhromosome inactivation center*). Инактивация инициируется в единственном центре инактивации XIC и затем прогрессивно распространяется вдоль всей длины X-хромосомы. Она происходит по закону "все или ничего". Установившись однажды в эмбриогенезе, неактивное состояние X-хромосомы передается дочерним клеткам во всех последующих клеточных генерациях. В пользу существования особого и единого центра инактивации X-хромосомы свидетельствуют два фактора:

- 1) Хромосома инактивируется целиком и только одна из двух.
- 2) Инактивируется только одна часть X-хромосомы, разделенная реципрокной транслокацией. Вторая часть X-хромосомы, отделенная от гипотетического центра не компактизуется.

Более того, в результате изучения различных X-аутосомных транслокаций было найдено, что только одна часть X- хромосомы, разделённая реципрокной транслокацией, способна инактивировать примыкающие аутосомные локусы.

Картируя таким образом многие транслокации, удалось локализовать центр инактивации на карте митотических хромосом человека и мыши. В этом центре расположен ген *Xist* (*X-inactivated-specific transcript*). Этот ген обладает рядом необычных особенностей: транскрипция его связана только с неактивной X-хромосомой самки, РНК гена *Xist* не находят у самцов и особей X⁰, имеющих только одну (активную) X-хромосому. Внутри клетки РНК *Xist* не находят ни в цитоплазме в целом, ни в рибосомах. Это свидетельствует о том, что данный ген не кодирует белок и его РНК не транслируется. Вместе с тем, РНК гена *Xist* легко выявляется в клеточном ядре, а именно в тельце Барра. Большинство исследователей предполагает, что эта РНК участвует непосредственно в процессах инактивации X-хромосомы.

Ген *Xist* у человека занимает около 45 т.п.н. геномной ДНК, однако суммарная длина его 8 экзонов составляет только 16,5 т.п.н.

Показано наличие альтернативного сплайсинга при экспрессии гена *Xist*. Множество выделенных кДНК клонов не содержали экзонов N4 или 6i, реже встречались клоны с отсутствием других экзонов. Данные Нозерн-Блот анализа позволило обнаружить ещё один любопытный факт: сигнал гибридизации выявляется не в виде дискретных полос, а был представлен непрерывным мазком, указывающим на наличие множественных транскриптов гена *Xist*, которые значительно варьируют по размерам, достигая 10 т.п.н. и выше. Результаты PCR-анализа, предпринятого с целью нахождения стартовой точки транскрипции, выявили несколько транскриптов различной длины, что свидетельствует о гетерогенности в инициации транскрипции гена *Xist* и, следовательно, о наличии нескольких сайтов инициации. Кроме того отсутствовал ТАТА- бокс поблизости от этого стартового сайта, хотя блок СААТ был расположен в положении -99. ТАТА-бокс был обнаружен в позиции -39 относительно минорного стартового сайта.

Ген *Xist* был найден у многих млекопитающих. У всех видов в экзонах нет длинных рамок считывания, самая длинная - 483 п.н., т.е. примерно 3% от общей длины экзона.

Согласно современным представлениям, продукты гена *Xist* (черные кружки на Рисунке 3) взаимодействуют локально с хроматином (светлые квадраты той X-хромосомы, с которой иницируется транскрипция *Xist*). Это приводит в результате к компактизации этой хромосомы (зигзаг на Рисунке 3) и связыванию ее с ядерной оболочкой в результате чего из одной X-хромосомы у самки млекопитающих формируется компактное образование, называемое половым хроматином или тельцем Барра, происходит инактивация всех генов в этой X-хромосоме и уравнивается число доз X-хромосом у обоих полов.

Лабораторная работа №8

Тема: «Регуляция генной активности на уровне репликации»

Цель занятия: изучить особенности экспрессии генов у эукариот.

Знать основы регуляции экспрессии генов у прокариотов.

Теоретическая часть

Согласно гипотезе Дж. Уотсона и Ф. Крика, каждая из цепей двойной спирали ДНК служит матрицей для репликации комплементарных дочерних цепей. При этом образуются две дочерние двухцепочечные молекулы ДНК, идентичные родительской, причем каждая из этих молекул содержит одну неизменную цепь родительской ДНК. Этот механизм

репликации ДНК, названный полуконсервативным, был подтвержден в опытах на клетках *E. coli* в 1957 г. М. Мезелсоном и Ф. Сталем. Исключены консервативный способ репликации, при котором одна дочерняя ДНК должна содержать обе исходные цепи, а вторая состоять из двух новосинтезированных цепей, и дисперсивный механизм репликации, при котором каждая дочерняя цепь ДНК состоит из участков родительской и новообразованной ДНК.

Основные принципы репликации ДНК:

1. субстратами, из которых синтезируются новые цепи ДНК, являются дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ), а не дезоксинуклеозидмонофосфаты (дНМФ), входящие в состав ДНК; в ходе включения в цепь ДНК от каждого нуклеотида отщепляются 2 фосфатных остатка (в виде пиродифосфата, который вскоре гидролизуются до фосфатов):

свободные дНТФ + остатки дНМФ в новых цепях ДНК + пиродифосфат

Использование дНТФ объясняется энергетическими причинами: образование межнуклеотидной связи требует энергии; источником ее и служит разрыв междифосфатной связи;

2. репликация ДНК - матричный процесс: каждая синтезируемая (дочерняя) цепь ДНК строится, используя в качестве матрицы одну из цепей исходной (родительской) ДНК. Основой при этом является принцип **комплементарности**.

3. процесс является симметричным: матрицами служат обе цепи родительской ДНК; также его можно назвать полуконсервативным;

4. удлинение цепи ДНК (или отдельного ее фрагмента) всегда происходит в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Это означает, что очередной новый нуклеотид присоединяется к 3'-концу растущей цепи. Кроме того, поскольку в любой молекуле ДНК комплементарные цепи антипараллельны, то и растущая цепь антипараллельна матричной цепи. Следовательно, последняя считывается в направлении 3'[^]5' (слайд 2 и 3).

5. неспаренная цепь ДНК, которая служит матрицей, и цепь-затравка, к которой присоединяются новые нуклеотиды;

Регуляция синтеза белка на стадии репликации

Регуляция на данной стадии возможна путем добавления (или удаления) кодирующих (или регуляторных) участков на ДНК. Суть данного способа заключается в следующем: если удалить матрицу ("деминуция"), то и синтеза белка с нее не будет, а если увеличить дозу определенного гена в ДНК ("амплификация", "мультипликация"), то появится возможность ускорить построение белков на многих одинаковых матрицах.

В большинстве случаев наличие избыточной генетической информации отрицательно сказывается на жизнеспособности клеток, а ее недостаток, возникающий из-за недорепликации ДНК, приводит к их гибели из-за отсутствия жизненно важных генов. Однако в природе известны изменения дозы генов в нормальном клеточном цикле или онтогенезе организма. Такие процессы в норме идут под жестким контролем специальных механизмов.

Пример деминуции генов наблюдается у аскариды, теряющей в онтогенезе значительное число генов соматических клеток. Устранение генов из состава ДНК приводит к прекращению синтеза всех закодированных в них белков.

Примеры влияния амплификации на синтез белков:

1) Известно токсичное вещество метотрексат, ингибирующее фермент дигидрофолатредуктазу и из-за этого блокирующее метаболизм витамина - фолиевой кислоты. Однако у клеток, находящихся в условиях действия метотрексата, возможна амплификация (возрастание числа копий) гена *dhfr*, кодирующего дигидрофолатредуктазу. Число генов *dhfr* в линии клеток, устойчивых к метотрексату, варьирует от 40 до 400 в зависимости от строгости селекции и индивидуальной клеточной линии. С возросшего числа генов синтезируется значительно больше молекул этого фермента, что позволяет клетке восстановить нарушенный обмен витамина.

2) Клетки, устойчивые к тяжелому металлу кадмию, содержат увеличенное число копий генов, кодирующих белки металлотионеины, осуществляющие обезвреживание этого токсичного металла.

Амплификация генов может происходить в несколько стадий, с постепенным увеличением числа копий данного гена.

Наиболее известный пример амплификации (умножения) - многократная избирательная репликация генов рРНК в ооцитах амфибий. Такой тип регуляции репликации обеспечивает накопление большого количества копий определенных генов и их дальнейшую транскрипцию.

В ооците один набор рибосомных генов каким-то образом отсоединяется от хромосомы (либо копируется) и сворачивается в кольцо. В одной из цепей этого кольца происходит разрыв (ник) и с этого ника начинается синтез ДНК в обоих направлениях. С помощью такого механизма «катящегося кольца» образуются идентичные копии рибосомных генов и разделяющих их последовательности спейсеров. На стадии пахитены в профазе мейоза образуются экстрахромосомные ядрышки за счет амплификации рибосомных генов, транскрипция с которых происходит на стадии диплотены. Первичные транскрипты рибосомных генов после процессинга и образования зрелых РНК используются для образования рибосом.

Известна амплификация генов белков хориона в фолликулярных клетках у дрозофилы, но в отличие от рибосомных эти гены остаются присоединенными к хромосоме. После многократных циклов репликации ДНК в этих областях образуются многоцепочечные структуры в виде ветвей, когда в пределах одной вилки репликации образуется новая вилка.

Ключевые слова: репликация ДНК, комплементарность, деминуция, амплификация, мультипликация.

Задания для студентов

Задание №1. Механизмы репликации ДНК.

Рассмотрите изображенные на рис.1. механизмы регуляции ДНК. Назовите их и опишите особенности каждого механизма.

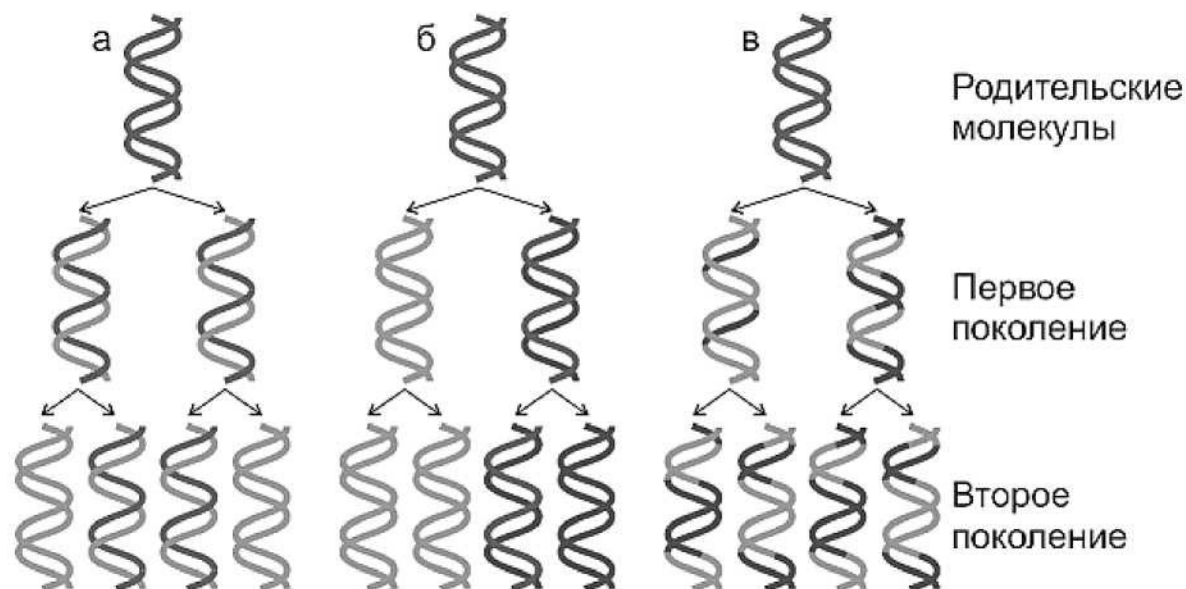


Рис.1. Механизмы репликации ДНК.

Задание №2. Регуляция активности генов у прокариот (схема Жакоба—Моно).

Рассмотрите и зарисуйте изображение регуляции синтеза белка путем индукции и репрессии.

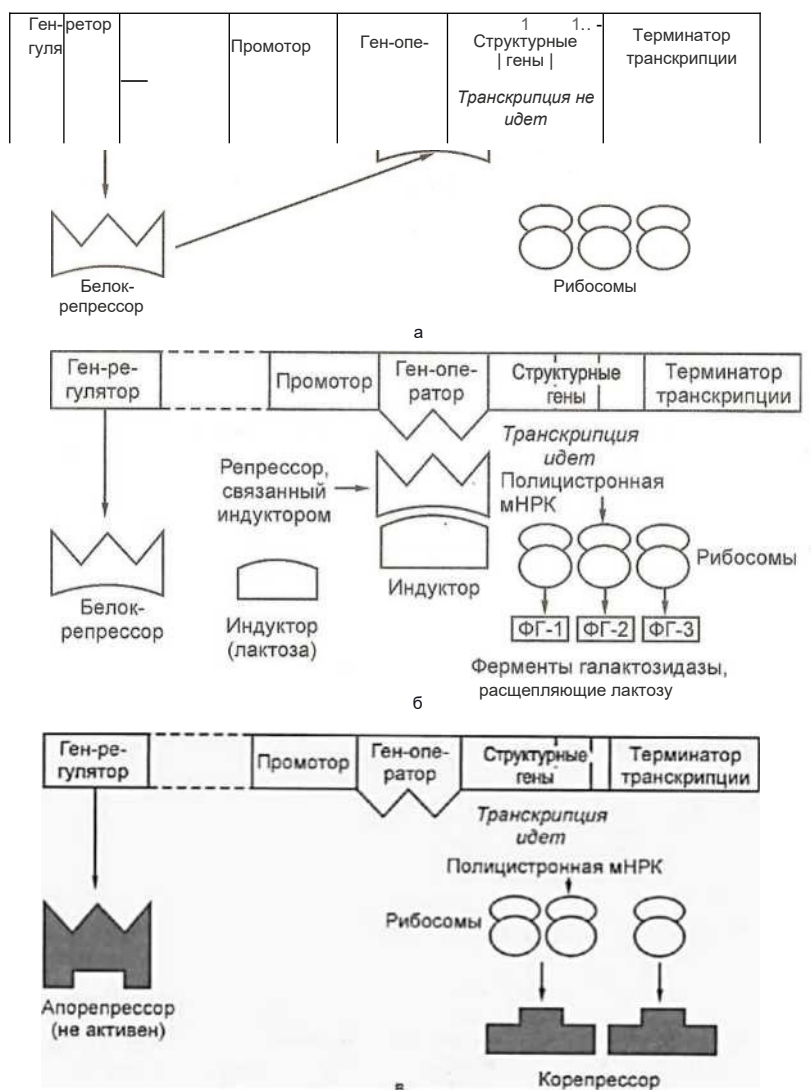


Рис. 2. Регуляция синтеза белка путем индукции (а, б) и репрессии (в, г). а - структурные гены оперона блокированы; б - дерепрессирование генов индуктором; в - при недостаточном количестве конечного продукта (корепрессора) оперон дерепрессирован.

Задание №3. Регуляция активности генов у эукариот.

Изучите рис. 3 и зарисуйте изображение.

У эукариот не установлено оперонной организации генов. Структурные гены имеют одну или несколько рецепторных областей (Р), которые «узнаются» белками-регуляторами (РБ).

Согласно представлениям Бриттена-Дэвидсона (1979), поступающий в клетку химический индукционный сигнал (ИС_{1,2}) - гормон или продукт соседних клеток - воспринимается сенсорным геном (С_{1,2}), продукт которого активирует.

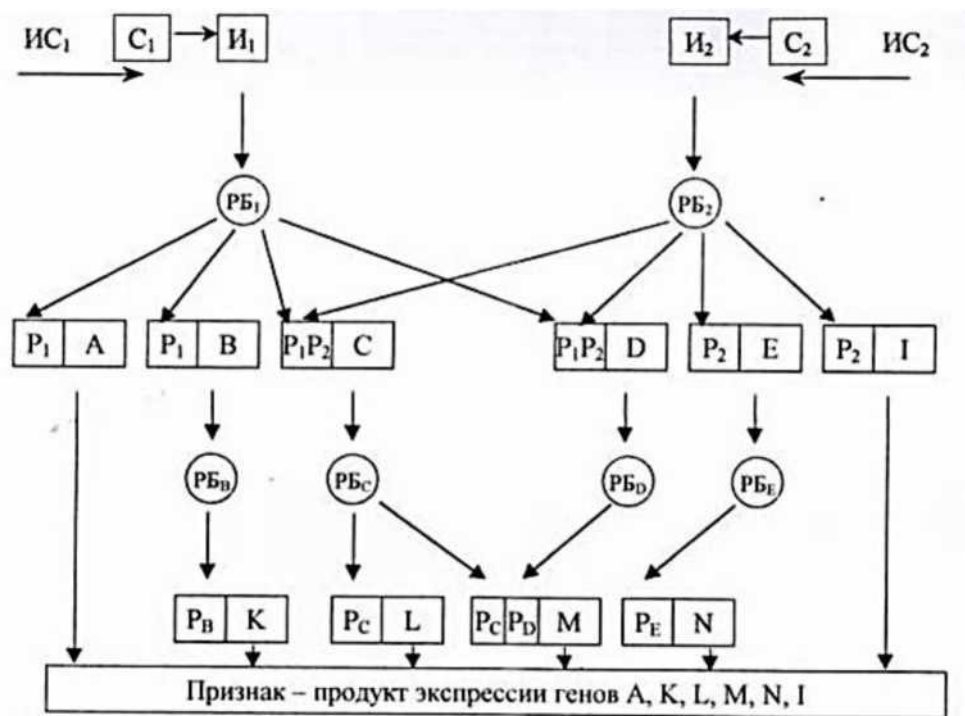


Рис 3. Регуляция генной активности у эукариот.

ИС₁, ИС₂ - индукционный сигнал; С_{1,2} - сенсорный ген; И₁И₂ - ген-интегратор; РБ - регуляторный белок; Р - рецепторная последовательность нуклеотидов - «зона узнавания» регуляторного белка. А, В, С, D, E, I, K, L, M, N - структурные гены.

ген-интегратор (И_{1,2}), контролирующей синтез главного регуляторного белка (РБ_{1,2}). Последний включает в функцию блок структурных генов А, В, С... . Структурные гены, имеющие несколько зон «узнавания», могут включаться несколькими индукционными сигналами.

Продукты некоторых структурных генов (регуляторные белки Р_{В,С,Д,Е}) включают последующий блок структурных генов К, L, M, N. Формируемый признак - результат экспрессии генов А, К, L, M, N, I.

Вопросы к лабораторной работе

1. Каковы особенности организации наследственного материала у про- и эукариот?
2. Какова молекулярная организация и функции нуклеиновых кислот?
3. Каковы особенности строения генов у про- и эукариот?
4. Каковы основные этапы биосинтеза белка, в чем их сущность?
5. Каковы механизмы регуляции генной активности у прокариот (схема Жакоба-Моно)?
6. Каковы механизмы регуляции генной активности у эукариот (схема Бриттена-Дэвидсона)?

Лабораторная работа №9

Тема: «Трансляционная и посттрансляционная регуляция генной экспрессии»

Цель занятия: изучить особенности трансляционной и посттрансляционной регуляции генной экспрессии.

Теоретическая часть

Механизм трансляции у прокариот (*E. coli*). Стартовым сигналом к началу синтеза белка служит расположенный на мРНК кодон AUG, кодирующий метионин (Met) [иногда это кодон GUC для валина (Val)]. В растущей полипептидной цепи первым аминокислотным остатком всегда будет либо Met, либо Val. Тогда возникает законный вопрос: каким образом клетка отличает стартовый сигнал от кодонов AUG или GUC,

расположенных в середине молекулы мРНК? Эта проблема решается с помощью модифицированной формы Met (или Val) и специальной иницирующей тРНК. Формилметионин (1^{f}Met) и является той модифицированной формой Met, с которой начинается синтез белка. Он присоединяется к молекулам тРНК определенного типа (тРНК^I), отличным от тРНК^{Met}, посредством которых Met включается в срединную часть полипептидной цепи. И тРНК^f, и тРНК^{Met} узнают кодон АИО, но лишь тРНК^f способна присоединяться к стартовому кодону АИО. Инициация синтеза белка начинается с момента образования иницирующего комплекса на 30S-субчастице, состоящего из мРНК, 30S- субчастицы рибосомы и молекулы аминоацил-тРНК^f с присоединенным [1^{f}Met], которая связывается с участком Р. Следующим шагом является присоединение 50S-субчастицы, в результате чего образуется 70S-иницирующий комплекс. Источником энергии для инициации синтеза белка служит реакция гидролиза ОТР до ОНР и Рф. На этом этапе необходимы еще несколько белков, называемых факторами инициации (IF1, IF2 и IF3).

Элонгация - это последовательное включение аминокислотных остатков в состав растущей полипептидной цепи. Каждый акт элонгации состоит из трех этапов: 1) узнавание кодона, 2) образование пептидной связи и 3) транслокация.

Узнавание кодона заключается в связывании антикодона очередной молекулы аминоацил - тРНК с кодоном свободного участка А на рибосоме. Чтобы прикрепиться к рибосоме, тРНК с присоединенной к ней аминокислотой должна сначала образовать комплекс с белком, называемым фактором элонгации EF-Tu, или EF1, который предварительно должен быть активирован с помощью ОТР. После того как произойдет связывание всего комплекса тРНК-EF1 -ОТР с участком А рибосомы, осуществляется гидролиз ОТР до ОНР и Рф, удовлетворяющий энергетические потребности на этом этапе элонгации. Фактор EF1 • ОНР, неспособный более связываться с тРНК, покидает рибосому, на которой остается аминоацил-тРНК. Регенерацию активированного фактора EF1 катализирует второй фактор элонгации, EF-Ts, или EF2, который замещает ОНР в неактивированном комплексе, в результате чего образуется комплекс EF1 • EF2.

Образование пептидной связи происходит лишь тогда, когда оба участка, А и Р, заняты молекулами аминоацил-тРНК. Часть 50S-субчастицы представляет собой фермент пептидилтрансферазу, катализирующий образование пептидной связи. В результате этой реакции растущая полипептидная цепь оказывается присоединенной к тРНК участка А, а тРНК участка Р высвобождается из комплекса с пептидом и несет на 3'-конце группу — ОН.

Транслокация включает три акта, катализируемых еще одним фактором элонгации, EF-G(EF3), и энергетически сопряженных с гидролизом ОТР. Сначала тРНК участка Р, не связанная с пептидом, покидает рибосому, затем молекула полипептидил-тРНК переходит с участка А на Р и, наконец, рибосома перемещается вдоль мРНК на три нуклеотидных остатка в сторону 3'-конца. В результате этих трех актов освобождается участок А и экспонируется очередной кодон, что позволяет начаться следующему циклу элонгации.

Терминация, т.е. окончание синтеза, происходит по команде кодонов ИАА, ИОА или ИАО. В природе не существует таких молекул тРНК, антикодоны которых соответствовали бы этим кодонам. Вместо продолжения синтеза цепи происходит терминация, катализируемая специальными белками, которые названы факторами терминации (RF1 и RF2) и которые узнают терминирующие кодоны, когда свободен участок А. Эти факторы изменяют специфичность фермента пептидилтрансферазы таким образом, что происходит гидролиз связи между концевым пептидом и тРНК, а освобожденная полипептидная цепь диффундирует от рибосомы. Вслед за этим происходит диссоциация комплекса мРНК- рибосома. Далее рибосома диссоциирует на 30S- и 50S-субчастицы. После реассоциации этих субчастиц с другой молекулой мРНК весь цикл синтеза белка начинается сначала.

Трансляция у эукариот, осуществляющаяся в цитоплазме, включает такие же

этапы, что и трансляция у прокариот. Основным отличием здесь является то, что первым остатком в растущей полипептидной цепи является Мер а не fMet. Тем не менее и в этом случае есть два типа молекул тРНК, узнающих кодон АИО: один- когда кодон инициирующий, а другой- когда он кодирует Мер который должен быть присоединен в середине растущей полипептидной цепи. В роли факторов инициации и элонгации выступают различные белки. Еще одно существенное отличие состоит в том, что в цитоплазме эукариот рибосомы более крупные (80S).

У митохондрий и хлоропластов трансляция осуществляется в самих этих органеллах. Рибосомы, которые они содержат, представляют собой 70S-частицы и похожи на рибосомы бактерий. При инициации используется 1Мек

Весь процесс трансляции идет с помощью дополнительных приблизительно 50 специальных белков: факторов инициации, элонгации, терминации. В общих чертах процесс трансляции одинаков у всех организмов.

Посттрансляционная модификация белков. Синтезированный из аминокислот полипептид - это практически прямолинейная молекула, не обладающая метаболической активностью. Далее белок самопроизвольно и с помощью шаперонов принимает II, III и другие структуры. Новая полипептидная цепь высвобождается в цитоплазму, эндоплазматическую сеть или комплекс Гольджи, где завершается построение белковой молекулы. В процессе «созревания» она может терять некоторые концевые аминокислоты при помощи фермента экзопептидазы, а затем образовывать вторичную и третичную структуры. Молекулы могут объединяться с другими полипептидами для образования четвертичной структуры. Синтезированные макромолекулы могут объединяться с углеводными или липидными молекулами, а также встраиваться в биомембраны или другие комплексы клетки. Процессы изменения первоначальной линейной структуры полипептида и формирования пространственной структуры белковых молекул называются посттрансляционной модификацией. В результате этого белки приобретают специфические свойства и функциональную активность.

Ключевые слова по теме: трансляция, посттрансляционный уровень, транслотация, кодон, элонгация, шаперон, инициация, элонгация, терминация.

Задание №1. Последовательность событий при трансляции у эукариот.

Опишите последовательность событий при трансляции у эукариот. Приведите не менее шести пунктов.

Задание №2. Регуляция на трансляционном и посттрансляционном уровне.

Приведите примеры регуляции и опишите их особенности на:

- 1) трансляционном у прокариот;
- 2) трансляционном уровне у эукариот;
- 3) посттрансляционном уровне у прокариот;
- 4) посттрансляционном уровне у эукариот.

Вопросы к лабораторной работе

1. Трансляция прокариотических РНК на полицистронной матрице.
2. Регуляция экспрессии гена на посттрансляционном уровне
3. Роль шаперонов в формировании бактериофагов

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Основы генетики: учебное пособие / составители Е. В. Кукушкина, И. А. Кукушкин. - 2-е изд. - Комсомольск-на-Амуре, Саратов: Амурский гуманитарно педагогический государственный университет, Ай Пи Ар Медиа, 2019. - 145 с. - ISBN 978-5-85094-490-2, 978-5-4497-0138-1. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/85823.html>

2. Нахаева, В.И. Практический курс общей генетики: учебное пособие для студентов биологических специальностей педагогических высших учебных заведений: [16+] / В. И. Нахаева. - 4-е изд., стереотип. - Москва: ФЛИНТА, 2021. - 210 с. - Режим доступа: по подписке.

3. Генетика: учебное пособие / М. Н. Ситников, З. И. Боготова, М. М. Биттуева [и др.]. - Нальчик: Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, 2019. - 119 с. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/110223.html>.

Асанов, А. Ю. Основы генетики: учебник для вузов / А.Ю. Асанов, Н.С. Демикова, В.Е. Голимбет. - Москва: Академия, 2012. - 281, [1] с.: ил.; 22. - (Высшее профессиональное образование. Психолого-педагогическое образование. Бакалавриат). - Библиогр.: с. 267. - ISBN 978-5-7695-8801-3.

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Костерин, О. Э. Основы генетики. В 2 частях. Часть 1. Основные понятия, определение пола и смежные вопросы, генетическая рекомбинация: учебник для СПО / О. Э. Костерин; под редакцией В. К. Шумного. - Саратов, Москва: Профобразование, Ай Пи Ар Медиа, 2020. - 408 с. - ISBN 978-5-4488-0792-3, 978-5-4497-0453-5. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/96019.html>

2. Костерин, О. Э. Основы генетики. В 2 частях. Часть 2. Хромосомные перестройки, полиплоидия и анеуплоидия, мобильные генетические элементы и генетическая трансформация, генетика количественных признаков и популяционная генетика: учебник для СПО / О. Э. Костерин; под редакцией В. К. Шумного. - Саратов, Москва: Профобразование, Ай Пи Ар Медиа, 2020. - 246 с. - ISBN 978-5-4488-0793-0, 978-5-4497-0454-2. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/96020.html>

3. Рубан, Э. Д. Генетика человека с основами медицинской генетики: учебник / Э. Д. Рубан; отв. ред. Д. В. Волкова. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2020. - 319 с.: ил. - (Среднее медицинское образование). - Режим доступа: по подписке. - URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=601619>.

4. Генетика: учебник для вузов / В.И. Иванов, Н.В. Барышникова, Дж.С. Билева [и др.]; под ред. акад. В.И. Иванова. - М.: Академкнига, 2006. - 640 с.: ил. - (Учебник для вузов). - Предм. указ.: с. 604-627. - ISBN 5-94628-146-1.

5. Генетика: учеб. пособие / под ред. А. А. Жученко. - М.: КолосС, 2004. - 480 с. - (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений). - Библиогр.: в тексте. - Предм. указ.: с. 469-476. - ISBN 5-9532-0069-2.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания

для обучающихся по организации и проведению самостоятельной работы
по дисциплине «Механизмы регуляции экспрессии генов»
для студентов специальности
06.03.01 «БИОЛОГИЯ»,
Направленность (профиль) Генетика, селекция и биоинформатика

ВВЕДЕНИЕ

Целью изучения данной дисциплины является ознакомить студентов с молекулярными механизмами экспрессии генов в прокариотической клетке, а также важной ролью пептидаз в регуляции различных биологических процессов на молекулярном и клеточном уровнях.

В результате освоения дисциплины студент должен:

- понимать основные механизмы экспрессии генов пептидаз;
- уметь ориентироваться в современной научной литературе по генетике, биоинженерии;
- обладать теоретическими знаниями о структуре генов и регуляции их действия, молекулярных механизмах генетических процессов, основах генетической инженерии, генетике развития, популяционной и эволюционной генетике, генетических основах селекции, особенностях генетики человека.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных.

Методические рекомендации при подготовке к собеседованию

Изучение основных разделов дисциплины заканчивается проведением контрольных занятий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Собеседование представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде семинара, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача - пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На занятие могут выноситься как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к собеседованию студенту отводится 1-3 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к лабораторным занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в лабораторном практикуме, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название лабораторной работы.

3. Цель работы.
4. Ход выполнения работы.
5. Результаты.
6. Выводы.

Методические рекомендации по подготовке презентаций и докладов

Доклад должен содержать элементы новизны, наряду с фундаментальным аспектом должен быть проведен анализ современного состояния изучаемой проблемы, а также включенность в региональную проблематику.

Доклад должен состоять из введения, теоретической части, заключения, списка литературы и презентации, раскрывающей суть темы в графиках, картинках, схемах, формулах.

Доклад рекомендуется представлять в объеме 1 печатный лист. Текст работы должен быть напечатан через 1,5 интервала на одной стороне стандартного листа белой бумаги (A4). Текст и другие отпечатанные элементы работы должны быть черными, контуры букв и знаков - четкими, без ореола и затенения. Шрифт Times New Roman, кегель 14. Названия глав и параграфов выделяются полужирным шрифтом. Лист с текстом должен иметь поля: слева - 30 мм, справа - 10 мм, сверху - 20 мм, снизу - 20 мм. Нумерация страниц текста делается в правом нижнем углу листа. Проставлять номер страницы необходимо со страницы, где печатается «Введение», на которой ставится цифра «3». После этого нумеруются все страницы, включая приложения.

Между названием главы и названием параграфа этой главы ставится пробел равный двум интервалам, а название параграфа не должно отделяться от текста этого параграфа пробелом. Названия параграфов отделяются от текста предыдущего параграфа пробелом, равным двум интервалам. Каждая глава, а также введение, выводы, приложения и список использованной литературы начинаются с новой страницы. Слово «Глава» не пишется. Главы имеют порядковые номера в пределах всей работы, обозначаемые арабскими цифрами (например: 1, 2, 3), после которых ставится точка. Слово «параграф» или значок параграфа в названии не ставятся. Параграфы имеют порядковые номера в пределах глав, обозначаемые арабскими цифрами (например: 1.1. и 1.2.). Заголовки глав и параграфов в тексте работы должны располагаться по центру, точку в конце названия главы и параграфа не ставят. Не допускается переносить часть слова в заголовке. 4.5. Нумерация таблиц и рисунков может быть сквозной или соотноситься с номером главы и параграфа. Например, если таблица или рисунок включены в текст первого параграфа второй главы, нумерация следующая: Таблица 2.1.1., рис. 2.1.1. Последняя цифра означает порядковый номер таблицы (или рисунка) в данном параграфе. Таблица помещается в качестве следующей страницы после первого упоминания о ней в тексте.

Методические рекомендации по подготовке к решению кейсов.

Кейс-задания - основной элемент метода case-study, который относится к неигровым имитационным активным методам обучения. кейс содержит схематическое словесное описание ситуации, статистические данные. Кейс дает возможность приблизиться к практике, встать на позицию человека, реально принимающего решения.

Кейсы наглядно демонстрируют, как на практике применяется теоретический материал. Метод case-study - инструмент, позволяющий применить теоретические знания к решению практических задач. С помощью этого метода студенты имеют возможность проявить и совершенствовать аналитические и оценочные навыки, научиться работать в команде, находить наиболее рациональное решение поставленной проблемы.

Учебными целями метода кейсов являются:

- развитие аналитического мышления;
- развитие практических навыков работы с информацией;
- развитие навыков разработки управленческих решений;

- освоение современных управленческих и социально-психологических технологий;
- повышение коммуникативной компетентности;
- развитие навыков конструктивной критики;
- повышение мотивации к обучению и профессиональному развитию.

Кейс-технология как метод обучения и активизации учебного процесса ориентированы на решение следующих задач:

- овладеть навыками и приемами всестороннего анализа ситуаций из сферы профессиональной деятельности;
- отработать умение востребовать дополнительную информацию, необходимую для уточнения исходной ситуации;
- приобрести навыки применения теоретических знаний для решения практических проблем;
- развить навыки принятия решений в ситуации неопределенности;
- приобрести навыки ясного и точного изложения собственной точки зрения в устной или письменной форме;
- выработать умение осуществлять презентацию, то есть убедительно преподносить, обосновывать и защищать свою точку зрения;
- отработать навыки конструктивного критического оценивания точки зрения других;
- научиться самостоятельно принимать решения на основе группового анализа ситуации.

Решение кейса представляет собой продукт самостоятельной индивидуальной или групповой работы студентов. Работа с кейсом осуществляется поэтапно:

Первый этап - знакомство с текстом кейса, изложенной в нем ситуацией, ее особенностями.

Второй этап - выявление фактов, указывающих на проблему(ы), выделение основной проблемы (основных проблем), выделение факторов и персоналий, которые могут реально воздействовать.

Третий этап - выстраивание иерархии проблем (выделение главной и второстепенных), выбор проблемы, которую необходимо будет решить.

Четвертый этап - генерация вариантов решения проблемы. Возможно проведение «мозгового штурма».

Пятый этап - оценка каждого альтернативного решения и анализ последствий принятия того или иного решения.

Шестой этап - принятие окончательного решения по кейсу, например, перечня действий или последовательности действий.

Седьмой этап - презентация индивидуальных или групповых решений и общее обсуждение.

Восьмой этап - подведение итогов в учебной группе под руководством преподавателя.

Ознакомление студентов с текстом кейса и последующий анализ кейса может осуществляться заранее (за несколько дней до его обсуждения) как самостоятельная работа студентов. Обсуждение небольших кейсов может быть включено в учебный процесс, и студенты могут знакомиться с ними непосредственно на занятиях.

Общая схема работы с кейсом на этапе анализа может быть представлена следующим образом: в первую очередь следует выявить проблемы кейса и понять, какие именно из представленных данных важны для решения; войти в ситуационный контекст кейса, определить, кто его главные действующие лица, отобрать информацию необходимую для анализа, понять, какие трудности могут возникнуть при решении задачи.

Максимальная польза из работы над кейсами будет извлечена в том случае, если студенты при предварительном знакомстве с ними будут придерживаться систематического подхода к их анализу, основные шаги которого представлены ниже.

1. Выпишите из соответствующих разделов учебной дисциплины ключевые идеи,

для того, чтобы освежить в памяти теоретические концепции и подходы, которые Вам предстоит использовать при анализе кейса.

2. Бегло прочтите кейс, чтобы составить о нем общее представление.

3. Внимательно прочтите вопросы к кейсу и убедитесь в том, что Вы хорошо поняли, что Вас просят сделать.

4. Вновь прочтите текст кейса, внимательно фиксируя все факторы или проблемы, имеющие отношение к поставленным вопросам.

5. Продумайте, какие идеи и концепции соотносятся с проблемами, которые Вам предлагается рассмотреть при работе с кейсом.

Для успешного анализа кейсов следует придерживаться ряда принципов: используйте знания, полученные в процессе лекционного курса; внимательно читайте кейс для ознакомления с имеющейся информацией, не торопитесь с выводами; не смешивайте предположения с фактами;

При проведении письменного анализа кейса помните, что основное требование, предъявляемое к нему, - краткость.

Презентация, или представление результатов анализа кейса, выступает очень важным элементом метода. При этом в *ease-study* используются два вида презентаций: устная (публичная) и письменный отчет-презентация.

Публичная (устная) презентация предполагает представление решений кейса группе.

Устная презентация требует навыков публичного выступления, умения кратко, но четко и полно изложить информацию, убедительно обосновать предлагаемое решение, корректно отвечать на критику и возражения. Одним из преимуществ публичной (устной) презентации является ее гибкость. Выступающий может откликаться на изменения окружающей обстановки, адаптировать свой стиль и материал, чувствуя настроение аудитории.

Письменный отчет-презентация требует проявления таких качеств, как умение подготовить текст, точно и аккуратно составить отчет, не допустить ошибки в расчетах и т.д. Подготовка письменного анализа кейса аналогична подготовке устного, с той разницей, что письменные отчеты-презентации обычно более структурированы и детализированы. Основное правило письменного анализа кейса заключается в том, чтобы избегать простого повторения информации из текста, информация должна быть представлена в переработанном виде. Самым важным при этом является собственный анализ представленного материала, его соответствующая интерпретация и сделанные предложения. Письменный отчет - презентация может сдаваться по истечении некоторого времени после устной презентации, что позволяет более тщательно проанализировать всю информацию, полученную в ходе дискуссии.

Рекомендуемая литература.

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. http://www.public-liceum.ru/files/File/Sbornik_zadach_po_genetike_s_resheniyami.pdf
2. Генетика. Учебник для вузов/ Под ред. академика РАН В. И. Иванова. - М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. - 638 с: ил. <https://studizba.com/files/show/pdf/37831-1-v-i-ivanov-genetika.html>
3. Основы генетики: учебное пособие / составители Е. В. Кукушкина, И. А. Кукушкин. - 2-е изд. - Комсомольск-на-Амуре, Саратов: Амурский гуманитарно-педагогический государственный университет, Ай Пи Ар Медиа, 2019. - 145 с. - ISBN 978-5-85094-490-2, 978-5-4497-0138-1. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/85823.html>
4. Нахаева, В. И. Практический курс общей генетики: учебное пособие для студентов биологических специальностей педагогических высших учебных заведений:

[16+] / В. И. Нахаева. - 4-е изд., стереотип. - Москва: ФЛИНТА, 2021. - 210 с. - Режим доступа: по подписке. - URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=83544>

5. Генетика: учебное пособие / М. Н. Ситников, З. И. Боготова, М. М. Биттуева [и др.]. - Нальчик: Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, 2019. - 119 с. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/110223.html>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Костерин, О. Э. Основы генетики. В 2 частях. Часть 1. Основные понятия, определение пола и смежные вопросы, генетическая рекомбинация: учебник для СПО / О. Э. Костерин; под редакцией В. К. Шумного. - Саратов, Москва: Профобразование, Ай Пи Ар Медиа, 2020. - 408 с. - ISBN 978-5-4488-0792-3, 978-5-4497-0453-5. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/96019.html>

2. Костерин, О. Э. Основы генетики. В 2 частях. Часть 2. Хромосомные перестройки, полиплоидия и анеуплоидия, мобильные генетические элементы и генетическая трансформация, генетика количественных признаков и популяционная генетика: учебник для СПО / О. Э. Костерин; под редакцией В. К. Шумного. - Саратов, Москва: Профобразование, Ай Пи Ар Медиа, 2020. - 246 с. - ISBN 978-5-4488-0793-0, 978-5-4497-0454-2. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/96020.html>

3. Рубан, Э. Д. Генетика человека с основами медицинской генетики: учебник / Э. Д. Рубан; отв. ред. Д. В. Волкова. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2020. - 319 с.: ил. - (Среднее медицинское образование). - Режим доступа: по подписке. - URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=601619>

Интернет-ресурсы:

1. www.elibrary.ru - электронная научная библиотека
2. medbiol.ru - База знаний биологии и медицины
3. biomolecula.ru - новости о достижениях в современной биологии и медицины
4. <https://biomolecula.ru/themes/gen-inzhenerija>
5. [iyr://genoфонд.pdf/](http://iyr.ru/genofond.pdf)
6. <http://www.sevin.ru/collections/>
7. <http://ugene.net/ru/>
8. <http://biomodelsgroup.ru/projects/>
9. <http://vigg.ru/database/>
10. <http://samurai.bionet.nsc.ru/pages/>
11. <http://groh.ru/imb/>
12. <http://www.bionet.nsc.ru/labs/theorylabmain/ltg.php?f=resources&p=resources>
13. <http://www.bionet.nsc.ru/bioinf/>
14. <http://molbiol.edu.ru/>
15. <http://res.tsu.ru/monograf/smonogr1.htm>
16. http://www.rtcб.iitp.ru/publ_r.htm
17. http://niib_old.sfedu.ru/dat/localized/rus/files/1.pdf
18. <http://germplasm.icbge.org.ua/ru/>
19. <http://forest.akadem.ru/Articles/LSVD/2/art.html>
20. http://chromosome2012.mcb.nsc.ru/chromosome_2012_abstracts.pdf
21. <http://ngsconference.ru/>
22. <http://igc.by/ru/purchase-ru/>
23. http://www.rtcб.iitp.ru/mg_r.htm
24. <https://elementy.ru/catalog/t59/Genetika?page=2>

Вопросы для самоконтроля

1. «История» открытия эпигенетических механизмов, современные направления науки, называемой «эпигенетика».

2. Общий обзор механизмов, обеспечивающих дифференциальную экспрессию генов.
3. Консервативность эпигенетических механизмов у эукариот.
4. Структура нуклеосомы. Структура коровых гистонов. Взаимодействие ДНК - нуклеосома.
5. Варианты гистонов.
6. Пост-трансляционные модификации гистонов.
7. Методы изучения распределение белков в хроматине? Иммунопреципитация хроматина, DAM-ID.
8. Сборка-разборка нуклеосом. Гистоновыешапероны.
9. Механизмы наследования «гистонового кода» в процессе репликации.
10. Кратковременные и локальные метки в хроматине (приветствуется привлечение сюда материалов из лекции про геномные картирования).
11. АТФ-зависимый ремоделинг хроматина.
12. Уровни организации хроматина.
13. Пространственная организация хроматина в ядре и ее наследование в митозе.
14. Энхансеры. Организация и механизмы работы.
15. Инсуляторы.
16. Хроматин при локус-специфической репрессии генов.
17. Формирование протяженных доменов репрессированного или активного хроматина.
18. Эпигеномика. Методологические подходы.
19. Эпигеномика. Проекты ENCODE и ModENCODE.
20. Эпигеномика. Представление о хроматиновых доменах.
21. Метилирование ДНК - направленная ковалентная модификация ДНК. Общие представления, встречаемость у разных эукариотических организмов.
22. ДНК-метилтрансферазы.
23. Белки, распознающие метилированный и неметилированныйцитозины.
24. Деметилирование ДНК.
25. Распределение метилирования ДНК в геномемлекопитающих и его динамика в жизненном цикле.
26. Метилирование ДНК. Подходы к анализу.
27. Понятие конститутивногетерохроматина.
28. Функции конститутивногетерохроматина.
29. Разнообразие типов малых регуляторных РНК эукариот, различающихся происхождением и способами процессинга.
30. Основные биологические активности малых регуляторных РНК
31. Разнообразие вариантов воздействия малых регуляторных РНК на экспрессию генов-мишеней.
32. “Классическая” РНК-интерференция с расщеплением РНК-мишени: общая схема (первая и вторая стадии, вторичная РНК-интерференция, роль Ago белков).
33. Индукторы РНК-интерференции - длинные двуцепочечные РНК: структура, происхождение.
34. РНК-интерференция, противовирусная защита и стабильность генома.
35. Основные способы взаимодействия микроРНК со своими мишенями.
36. Гены, транскрипция и процессинг микроРНК у животных.