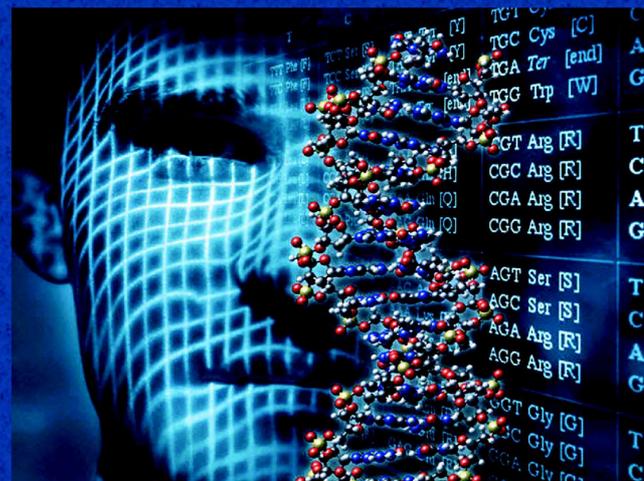


# ГЕНЕТИКА



Ленинградский государственный университет  
имени А.С. Пушкина

*А. А. Сазанов*

# Г Е Н Е Т И К А

*Учебное пособие*

Санкт-Петербург  
2011

УДК 575 (075.8)  
ББК 28.03я73

*Рецензенты:* **Е. К. Потокина**, доктор биологических наук  
(Всероссийский институт растениеводства РАСХН  
имени Н.И. Вавилова);

**Я. М. Галл**, доктор биологических наук, профессор  
(Ленинградский государственный университет  
имени А.С. Пушкина)

**Сазанов А.А.**

Генетика: учеб. пособие / А.А. Сазанов – СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2011. – 264 с.

ISBN

В учебном пособии раскрываются основные положения классической и молекулярной генетики на примерах различных биологических видов, преимущественно являющихся наиболее известными объектами науки о наследственности – горох, дрозофила, домовая мышь, человек. Существенное внимание уделено наследственным заболеваниям и генетическим особенностям человека, анализу родословных, использованию геномных баз данных, современным методам молекулярной генетики. В отдельных главах рассмотрены генетические аспекты селекции и проблемы медицинской генетики.

Издание предназначено в первую очередь для будущих биологов как педагогических вузов, так и классических университетов, а также студентов-медиков, специалистов в области биологии, биотехнологии, медицины и сельского хозяйства.

*Печатается по решению редакционно-издательского совета  
Ленинградского государственного университета  
имени А.С. Пушкина*

ISBN

© Ленинградский государственный  
университет (ЛГУ)  
имени А. С. Пушкина, 2011

## Оглавление

ПРЕДИСЛОВИЕ .....	7
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	9
<b>Глава 1. Предмет, краткая история и основные положения генетики .....</b>	<b>10</b>
<b>Глава 2. Классический генетический анализ .....</b>	<b>17</b>
2.1. Моногенные различия .....	17
2.2. Типы взаимодействия аллелей .....	19
2.3. Генеалогический метод.....	22
2.4. Типы наследования .....	25
2.5. Полигенные различия.....	30
2.6. Взаимодействие генов .....	35
2.7. Сцепленное наследование, кроссинговер и генетическая интерференция.....	40
2.8. Генетический анализ у микроорганизмов .....	46
<b>Глава 3. Молекулярные носители наследственности .....</b>	<b>55</b>
3.1. Структура ДНК и РНК.....	55
3.2. Репликация ДНК .....	61
3.3. Транскрипция .....	63
3.4. Процессинг РНК .....	64
3.5. Трансляция .....	65

<b>Глава 4. Основы цитогенетики</b> .....	69
4.1. Внутриклеточные носители наследственной информации – ядро, митохондрии и пластиды .....	69
4.2. Митоз, мейоз и особенности созревания половых клеток человека .....	76
4.3. Структурно-функциональная организация хромосом.....	83
4.4. Дифференциальное окрашивание и блочная организация хромосом .....	87
4.5. Гибридизация <i>in situ</i> , хромосомный пейнтинг и сравнительная геномная гибридизация (CGH).....	96
4.6. Теория старения в связи с динамикой структуры теломеры.....	102
4.7. Нормальный кариотип человека .....	103
4.8. Политенные хромосомы.....	106
4.9. Хромосомы типа ламповых щеток.....	111
<b>Глава 5. Основы генетики пола</b> .....	114
<b>Глава 6. Основные методы и подходы молекулярной генетики</b> .....	120
6.1. Клонирование нуклеиновых кислот .....	120
6.2. Гибридизация нуклеиновых кислот .....	120
6.3. Геномные библиотеки .....	122
6.4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) .....	126

6.5. Секвенирование ДНК.....	132
6.6. Сборка сиквенсов геномов.....	134
6.7 Биоинформатика и системная биология .....	136
<b>Глава 7. Геномика .....</b>	<b>139</b>
7.1. Понятия геномики, транскриптомики и протеомики.....	139
7.2. Повторяющиеся и уникальные последовательности ДНК .....	143
7.3 Композиционная гетерогенность .....	148
7.4. Ортология и паралогия .....	156
7.5. Геномные базы данных .....	162
<b>Глава 8. Генетическая изменчивость.....</b>	<b>169</b>
8.1. Понятие и классификация генетической изменчивости.....	169
8.2. Рекомбинация .....	169
8.3. Геномные мутации.....	170
8.4. Внутрихромосомные перестройки .....	171
8.5. Генные мутации .....	182
8.6. Репарация ДНК .....	186
8.7. Генная конверсия .....	186
8.8. Подвижные элементы генома .....	188

<b>Глава 9. Основы популяционной генетики</b> .....	193
<b>Глава 10. Эпигенетика</b> .....	197
<b>Глава 11. Генетика и селекция</b> .....	203
11.1. Отбор, подбор и оценка генотипа в селекции.....	203
11.2. Селекция на основе молекулярных маркеров и геномная оценка .....	205
<b>Глава 12. Генетика и медицина</b> .....	208
12.1. Близнецовый метод.....	208
12.2. Молекулярные маркеры в изучении наследственной патологии .....	210
12.3. Лабораторная диагностика наследственных заболеваний.....	215
12.4. Хромосомные болезни.....	219
12.5. Моногенные заболевания человека .....	233
12.6. Генетика эмоционально-личностных расстройств и девиантного поведения.....	246
12.7. Современные подходы к лечению и профилактике наследственных заболеваний .....	248
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	253
<b>ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ</b> .....	254

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Генетика традиционно считается одним из наиболее существенных компонентов общебиологической подготовки студентов-педагогов. Наряду с теорией эволюции и экологией эта дисциплина формирует комплексный взгляд на живую природу. Предметом генетики являются наследственность и изменчивость – наиболее общие свойства живых организмов. Концептуальный характер генетики позволяет считать ее точной наукой наряду с математикой, физикой и химией. Таким образом, связывая биологию с другими естественнонаучными дисциплинами, генетика дает возможность формировать у студентов научное мышление. Освоение логики генетического анализа содействует развитию интеллектуальной дисциплины. Прикладное значение генетики стремительно возрастает, что настоятельно требует качественного повышения уровня генетического образования. Будучи теоретической основой биотехнологии, биофармакологии, медицины, животноводства и растениеводства, генетика все больше входит в жизнь современного человека. Проблемы биоэтики, стволовых эмбриональных клеток, генетически модифицированных организмов широко обсуждаются в обществе, причем часто высказываемые мнения свидетельствуют о явно недостаточной генетической грамотности значительного числа участников дискуссии. Современные методы селекции растений и животных на основе молекулярно-генетических маркеров, ставшая общепринятой в некоторых странах геномная оценка племенных качеств сельскохозяйственных животных при благоприятных условиях будут восприняты и в нашем Отечестве. Развитие пренатальной диагностики, медико-генетического консультирования, индивидуальной терапии предполагает и некоторое повышение медико-биологической грамотности населения, что неразрывно связано с уровнем преподавания генетики в средней школе и качеством подготовки в этой области учителей-естественников.

Знакомство с классическим генетическим анализом и классическими цитогенетическими методами позволит получить глубокое представление о природе наследственности и путях ее изучения. Владение аппаратом понятий геномики, транскриптомики, протеомики и системной биологии открывает перед учащимися возможность постоянно расширять и пополнять свои биологические познания как с помощью специальной научной литературы, так и из ресурсов геномных баз данных, размещенных в сети Интернет.

Знание изложенных в учебном пособии основных методов и подходов молекулярной цитогенетики, сравнительной и функциональной геномики может стать основой для пробуждения интереса к научно-исследовательской деятельности в этих наиболее стремительно развивающихся в последние годы направлениях биологической науки.

Особое внимание в книге уделено составлению и анализу родословных, поскольку генеалогический метод лежит в основе генетического анализа у человека и служит как для понимания наследственной природы многих заболеваний, так и для прогнозирования генетического риска.

Автор искренне благодарен Анне Львовне Сазановой, оказавшей бесценную помощь при сборе материала, составлении иллюстраций и подготовке рукописи к печати.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	– пара нуклеотидов аденин-тимин
ГЦ	– пара нуклеотидов гуанин-цитозин
кДНК	– комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
пг	– пикограмм
п.н.	– пара нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
т.п.н.	– тысяча пар нуклеотидов
см	– сантиметр
ЯОР	– район ядрышкового организатора
ВАС	– искусственная бактериальная хромосома
CGH	– сравнительная геномная гибридизация
EST	– экспрессирующаяся нуклеотидная последовательность
FISH	– флуоресцентная гибридизация ДНК-ДНК <i>in situ</i>
FLpter	– фракционное расстояния от теломера короткого плеча хромосомы (выражается в долях единицы)
GTG	– G-окраска при помощи трипсина и красителя Романовского-Гимзы
HSA	– хромосома человека
ORF	– открытая рамка считывания
SNP	– сайт мононуклеотидного полиморфизма

## **Глава 1. Предмет, краткая история и основные положения генетики**

Генетика – это комплекс наук о свойствах живых организмов передавать свои признаки в ряду поколений (наследственность) и изменять свои признаки в силу различных причин (изменчивость).

Указанные выше свойства живых организмов привлекали внимание людей в течение тысячелетий. Однако до открытия законов Менделя все они имели умозрительный характер. Очевидный факт наследуемого сходства особей одного вида, родителей и потомков, братьев и сестер находил иногда мифологические интерпретации. Во многих сказках фигурируют гибриды человека и животных и самые труднообразимые гибриды различных видов животных. Нелепые теории вроде «телегонии» (влияния предыдущих половых партнеров на признаки потомков) или «волновой генетики» (существования наследственных физических полей, независимых от структуры ДНК) из глубины веков дошли до нашего времени в псевдонаучных изданиях.

Теория прямого наследования, выдвинутая Гиппократом (460 до н. э. – 377 до н. э.) господствовала в научном и философском сознании долгое время. Согласно этой теории каждый орган, ткань, клетка влияет на формирование половых задатков, которые передаются потомкам. Болезнь или здоровье родителей непосредственно передаются детям. Ж.-Б. Ламарк (1744–1829) – создатель одной из первых эволюционных теорий – в вопросах генетики следовал учению о прямом наследовании. Непосредственное влияние окружающей среды на органы, либо стимулирование организмов к упражнению органов вызывало, по его мнению, стойкие наследуемые изменения. По Ламарку, «благоприобретенные» признаки служили основой для возникновения более совершенных существ. Основные положения ламаркизма – влияние среды на наследственность, превращения видов, отрицание роли естественного отбора – стали постулатами

«мичуринской биологии» в СССР в 1930–1960 гг. Отдельные сторонники неоламаркизма встречаются до сих пор, несмотря на очевидность вреда от господства этого направления в биологии – уничтожения наиболее прогрессивных генетических школ в СССР и отставания от развитых стран в области биотехнологии, фармакологии, медицины и сельского хозяйства более чем на 50 лет.

Интересно, что Ч. Дарвин (1809–1882) придерживался в общем-то ламаркистских взглядов на наследственность. Он верил, что в крови циркулируют «геммулы» (гипотетические частицы генетической информации), которые собирают сведения о состоянии органов и систем и несут ее в половые клетки, затем после оплодотворения из них развиваются клетки нового организма. Несмотря на то что эта теория была опровергнута уже современниками Дарвина, до сих пор в языке присутствуют анахроничные понятия «кровность», «кровные родственники», «полукровки» и т. д., отражающие стойкость человеческих заблуждений о связи наследственности с кровью.

Аристотель (384 до н. э. – 322 до н. э.) позволил себе усомниться в господствовавшей теории прямого наследования и предположить, что половые продукты образуются независимо от органов тела. Развитие эта идея получила в трудах немецкого зоолога А. Вейсмана (1834–1914), который экспериментально показал ненаследуемость механических повреждений. Он писал: «Как же могут сообщиться зародышевой клетке, лежащей внутри тела, изменения, произошедшие в мускуле благодаря его упражнению, или уменьшение, испытанное органом от неупотребления, и притом ещё сообщаться так, чтобы впоследствии, когда эта клетка вырастет в новый организм, она на соответствующем мускуле и на соответствующей части тела из самой себя произвела те же самые изменения, какие возникли у родителей в результате употребления или неупотребления? Вот вопрос, который встал передо мной уже давно и который, по дальнейшем его обдумывании, привел меня к полному отрица-

нию такой наследственной передачи приобретенных свойств». Этой идее суждено было принести плод в форме современных представлений о наследственности и изменчивости.

Настоятель монастыря в Моравии Г.И. Мендель (1822–1884), будучи естествоиспытателем-любителем, в свободное от работы время ставил опыты над горохом. Систематичность и упорядоченность этих опытов позволили ему найти наиболее фундаментальные принципы наследования признаков. Он руководствовался следующими соображениями:

- изучаемые признаки должны быть дискретны, т. е. без оттенков – либо есть, либо нет, либо белый, либо красный;
- признаки должны быть константны, т. е. неизменны в ряду поколений (Мендель проводил проверку в течение двух лет);
- в эксперименте должны использоваться родительские формы, различающиеся только по одному признаку;
- необходимо учитывать всех потомков от скрещивания, дабы исключить влияние случайных событий.

Крупная научная удача Менделя состояла в том, что выбранные им семь признаков определялись генами на разных хромосомах, что исключало возможное сцепленное наследование. Он обнаружил, что:

- у гибридов первого поколения присутствует признак только одной родительской формы, а другой «исчезает». Это закон *единообразия гибридов* первого поколения;
- во втором поколении наблюдается расщепление: три четверти потомков имеют признак гибридов первого поколения, а четверть – «исчезнувший» в первом поколении признак. Это закон расщепления.
- каждая пара признаков наследуется независимо от другой пары. Это закон независимого наследования.

Разумеется, Мендель не знал, что эти положения со временем назовут *первым, вторым и третьим законами Менделя*. На этом научное везение великого генетика закончилось, последующие опыты на ястребинке не увенчались успехом

из-за незнания биологии объекта. Современники-профессионалы дружно проигнорировали монаха-самоучку, и естественным наукам оставалось только накапливать экспериментальный материал, ожидая второго открытия законов Менделя через 37 лет после первой публикации.

Начало XX столетия стало рубежом развития генетики – законы Менделя были переоткрыты в 1900 г. Г. Де Фризом, К. Корренсом и Э. Чермаком на растениях, а в 1902 г. У. Бэтсон и Е.Р. Саундерс подтвердили справедливость этих законов для животных в опытах на домашней курице. Немного позднее У. Бэтсон дополнил законы Менделя правилом чистоты гамет – каждая половая клетка (гамета) несет только один аллель из пары, присутствующей у диплоидной родительской особи. Им же было предложено название науки о наследственности и изменчивости – *генетика*.

Понятия «ген» (элементарный наследственный фактор), «генотип» (совокупность генов организма), «фенотип» (совокупность признаков организма) введены В. Иогансеном (1857–1927). Он же предложил термин «чистая линия» для организмов с практически одинаковым генотипом, полученных путем близкородственного скрещивания (инбридинга).

Явление сцепления – совместного ассоциированного наследования признаков, определяемых двумя или несколькими генами – было открыто У. Бэтсоном и Р. Пеннетом в 1906 г. Было также известно о связи наследования некоторых признаков с полом. Эти наблюдения стали основой для создания группой Т. Моргана, в которую входили А. Стертевант, К. Бриджес и Г. Меллер, хромосомной теории в 1910 г. Они проводили исследования на плодовой мушке дрозофиле (*Drosophila melanogaster*) – небольшом насекомом (2–3 мм) с удивительным разнообразием наследуемых признаков, малым числом хромосом (всего четыре пары) и возможностью отбора девственных самок. Другим подарком научной Фортуны стало наличие политенных хромосом в некоторых тканях двукрылых насекомых, к которым относится дрозофила, отличающихся от обычных митотических хромосом на несколь-

ко порядков по длине и имеющих поперечную исчерченность, которая позволяет проводить тонкое картирование (определение местоположения) генов. Все это позволило сформулировать хромосомную теорию:

- гены находятся в хромосомах и расположены линейно;
- полученные от каждого из родителей гомологичные хромосомы содержат парные аллели каждого гена;
- сцепление зависит от расстояния между генами и измеряется в сантиморганах – процентах рекомбинантных (имеющих сочетание аллелей, отличное от обеих родительских форм) особей;
- гены, расположенные в одной хромосоме, образуют группу сцепления и наследуются совместно при условии, что расстояние между ними менее 50 сантиморганов.

Молекулярная эра развития генетики началась в 1944 г., когда группой американских исследователей было показано, что для превращения непатогенного штамма пневмококков в патогенный (отличающиеся наличием полисахаридной капсулы, которая позволяет закрепляться на тканях высших организмов), иными словами, для генетической трансформации, достаточно обработки клеток первого штамма ДНК, выделенной из второго штамма. Супруги Ледерберг и Н. Циндер в начале 1950-х гг. выделили ДНК вируса кишечной палочки (бактериофаг лямбда) и описали явление трансдукции – переноса генов из одной бактерии в другую при помощи вирусов. Открытие явлений трансформации и трансдукции стало основанием для признания ДНК носителем генетической информации. В 1945 г. Дж. Бидлом и Э. Тагумом было сформулировано положение «один ген – один фермент», которое после открытия доменной организации белков было исправлено на «один ген – один полипептид».

Структура ДНК была расшифрована Дж. Уотсоном и Ф. Криком, что наряду с данными, полученными М. Ниренбергом (он синтезировал полиурациловую РНК и показал, что с нее считывается только фенилаланин) и С. Очоа (впервые провел синтез РНК с различным составом азотистых ос-

нований и расшифровал коды для 11-ти аминокислот), дало возможность сформулировать следующие свойства генетического кода:

- каждая аминокислота в составе белка кодируется тремя азотистыми основаниями (триплетом);
- триплеты не перекрываются;
- считывание начинается со стартового триплета, знаки прерывания в ДНК отсутствуют;
- одной аминокислоте может соответствовать один и более одного триплета (генетический код является вырожденным).

Центральная догма молекулярной биологии, гласящая о том, что наследственная информация передается от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении, была сформулирована группой исследователей под руководством Ф. Крика в 1961 г.

Первый искусственный ген был синтезирован группой Х.Г. Кхорана в 1969 г. Примерно в это же время развивается генная инженерия – совокупность методов изменения нуклеиновых кислот в живых организмах. Техника рекомбинантной ДНК (объединенной из двух или более источников) позволила провести клонирование (получение большого числа идентичных копий) многих генов различных организмов, убедиться в универсальности генетического кода, изучить молекулярно-генетические механизмы физиологических процессов и патологических состояний.

Следующий этап развития генетики – «постгеномная эра» – начался в 2003 г. после выхода первого релиза полной последовательности ДНК (сиквенса) генома человека. Хотя некоторые участки генома, в первую очередь прицентромерные районы хромосом, которые содержат препятствующие клонированию повторы, остаются до сих пор непрочитанными (данные на 2011 г.), комплекс данных полного сиквенса позволил создать геномные базы данных, что перевело исследования по генетике на качественно новый уровень. Вместо разрозненных сведений в отдельных экспериментальных

статьях появился комплекс систематизированных данных по структуре нуклеиновых кислот, соответствующим им белковым продуктам, связанным с ними физиологическим особенностям и заболеваниям, месте и времени экспрессии, взаимном расположении, выявленных мутациях и о многих других важных биологических особенностях. Секвенирование геномов других организмов позволило применять сравнительный подход для поиска и характеристики наследственных патологических состояний и физиологических особенностей.

### *Контрольные вопросы и задания*

1. Сформулируйте основное различие между концепциями прямого и непрямого наследования.
2. Изложите законы Менделя и раскройте их содержание.
3. В чем состоят основные положения хромосомной теории?
4. Сохраняет ли центральная догма молекулярной биологии значение в настоящее время?

## Глава 2. Классический генетический анализ

Генетический анализ – это система наблюдений и опытов, которая ставит целью вскрытие генотипической структуры особи, популяции или вида. Классическими методами генетического анализа считаются генеалогический – анализ родословных – у человека и гибридологический метод – постановка скрещиваний – у всех остальных живых существ. Основанием для проведения генетического анализа является установление факта наследования признака.

### 2.1. Моногенные различия

Вторым после установления факта наследования признака этапом генетического анализа является выяснение числа генов, определяющих альтернативное проявление признака. Для выяснения числа генов, вовлеченных в формирование признака необходимо определить число фенотипических классов у гибридов первого поколения и зачастую у потомков возвратного скрещивания (т. е. скрещивания с одной из родительских форм). Гибридами считаются потомки скрещивания особей с разным генотипом. Скрещивание родительских форм, различающихся аллелями одного гена, называется моногибридным. Различия таких форм называются моногенными. Диплоидный организм (с двойным набором хромосом), в геноме которого присутствуют два одинаковых аллеля одного гена, называется гомозиготным. Гетерозиготным является диплоидный организм с разными аллелями одного гена. Гемизиготной называют диплоидную особь, имеющую только один из аллелей данного гена.

Родительские формы обозначаются латинской буквой P (от лат. *parento* – родители), гибриды – буквой F (*fillii* – дети). Гибриды первого поколения – F<sub>1</sub>, второго – F<sub>2</sub> и т.д. Гибриды, полученные от возвратного скрещивания – F<sub>б</sub> (от англ. *back-cross* – возвратное скрещивание). Если при возвратном скрещивании используется рецессивная родительская форма, такое скрещивание называется анализирующим, а его потом-

ки обозначаются  $F_a$  (от англ. *analyse* – анализ). Женский пол обозначается астрологическим знаком Венеры – ♀, а мужской – знаком Марса – ♂. Скрещивание обозначают знаком умножения – X. Обычно первыми записывают особей женского пола, поскольку материнство всегда является установленным фактом, а отцовство имеет вероятностный характер. Например,  $P \text{ ♀ AA X ♂ Aa}$  – скрещивание гомозиготной самки с гетерозиготным самцом. Мендель предложил записывать доминантных гомозигот двумя прописными буквами (AA), гетерозигот – одной прописной и одной строчной буквами (Aa), а гомозиготных рецессивов – двумя строчными буквами (aa). Для обозначения доминантного фенотипического класса, включающего доминантных гомозигот AA и гетерозигот Aa, используется обозначение A-. Понятно, что рецессивный фенотипический класс, включающий только гомозиготных рецессивов, обозначается aa.

Итак, по Менделю:

$P \text{ ♀ AA X ♂ aa}$

$F_1 \text{ Aa}$

$F_2 \text{ 3 A- : 1 aa (1 AA : 2 Aa : 1 aa)}$

$F_A \text{ 1 A- : 1 aa (1 Aa : 1 aa)}$ .

Следует обратить внимание, что в случае гибридов второго поколения ( $F_2$ ) доминантный фенотипический класс A – представлен двумя генотипическими классами – AA и Aa – в соотношении 1 : 2, а в случае анализирующего скрещивания – только гетерозиготами Aa.

Таким образом, наличие расщепления 3 : 1 во втором поколении и 1 : 1 в анализирующем скрещивании однозначно указывает на моногенные различия родительских форм.

Аллель, наиболее часто встречающийся в популяции, называется аллелем дикого типа, а более редкие аллели – мутантными. Аллель дикого типа обозначают буквенным символом гена со значком +, например: s+, w+.

Степень проявления признака у отдельных носителей определенного генотипа называется экспрессивность, а частота проявления признака среди носителей определенного генотипа – пенетрантность.

*Примеры:*

1. Дисплазия тазобедренного сустава у собак (особенно часто встречается у крупных пород) – наследственное заболевание с варьирующей экспрессивностью. Это значит, что при правильном рационе кормления щенка, гомозиготного по мутантному аллелю гена, вызывающего это заболевание, можно избежать данной аномалии развития конечностей.

2. Предрасположенность к ретинобластому – злокачественной опухоли сетчатки глаза – имеет пенетрантность 60 %. Это значит, что только у трех из пяти носителей доминантного мутантного аллеля под влиянием факторов внешней среды развивается это заболевание.

## ***2.2. Типы взаимодействия аллелей***

Существует пять типов взаимодействия аллелей – доминирование, неполное доминирование, кодоминирование, сверхдоминирование и межаллельная комплементация.

Классическим случаем взаимодействия аллелей, описанным Менделем, является доминирование. При этом у гибридов первого поколения проявляется признак только одной родительской формы, которая считается по этой причине доминантной (от лат. *dominatio* – господство). Признак родительской формы, «исчезающий» у гибридов первого поколения – рецессивный (от лат. *recessus* – отступление, удаление).

*Примеры:*

1. При скрещивании короткошерстных (LL) и длинношерстных (ll) кошек наблюдаем следующую картину:

P ♀ LL X ♂ ll

F<sub>1</sub> Ll (короткошерстные)

F<sub>2</sub> 3 L- : 1 ll (3 части короткошерстных и 1 часть длинношерстных)

F<sub>A</sub> 1 L- : 1 ll (1 часть короткошерстных и 1 часть длинношерстных).

2. Родительские формы серых (AA) и черных (aa) мышей дают потомков:

P ♀ AA X ♂ aa

F<sub>1</sub> Aa (серые)

F<sub>2</sub> 3 A- : 1 aa (3 части серых и 1 часть черных)

F<sub>A</sub> 1 Aa : 1 aa (1 часть серых и 1 часть черных).

При неполном доминировании у гибридов первого поколения наблюдается проявление признака, промежуточное между двумя родительскими формами, а во втором поколении и у потомков анализирующего скрещивания расщепление по фенотипу полностью повторяет расщепление по генотипу.

P ♀ AA X ♂ aa

F<sub>1</sub> Aa

F<sub>2</sub> 1 AA : 2 Aa : 1 aa

F<sub>A</sub> 1 Aa : 1 aa.

*Примеры:*

1. При скрещивании черных (BB) и белых (bb) кур получаем в F<sub>1</sub> голубых (андалузских) птиц, во втором поколении – 1 часть черных, 2 части андалузских и 1 часть белых кур.

2. Если у родительских форм львиного зева большого (*Antirrhinum majus*) лепестки венчика имеют красную (AA) и белую (aa) окраску, то у гибридов первого поколения все цветки будут розовыми (Aa), а во втором поколении будут наблюдаться три фенотипических класса – 1 – с красными : 2 – с розовыми : 1 – с белыми лепестками венчика, которые как и всегда при неполном доминировании соответствуют генотипическим классам – 1 AA : 2 Aa : 1 aa.

При кодоминировании два или более аллелей доминируют по отношению к рецессивному. Наиболее известный пример – наследование групп крови системы АВ0 у человека.

- I группа крови соответствует генотипу I<sup>0</sup> I<sup>0</sup>;
- II группа крови – I<sup>A</sup> I<sup>A</sup> или I<sup>A</sup> I<sup>0</sup>;
- III группа крови – I<sup>B</sup> I<sup>B</sup> или I<sup>B</sup> I<sup>0</sup>;
- IV группа крови – только I<sup>A</sup> I<sup>B</sup>.

Этот тип взаимодействия аллелей характерен для полиморфных вариантов белков и некоторых молекулярно-генетических маркеров, о которых речь пойдет ниже.

Биохимический механизм типов взаимодействия аллелей следующий:

- при полном доминировании проявление признака определяется присутствием одного из двух доминантных аллелей, каждый из которых кодирует полнофункциональный белок, необходимый для проявления признака;
- при неполном доминировании проявление признака является дозозависимым – половина количества функционального белка приводит к частичному проявлению признака;
- при кодоминировании две или более активные формы белка, кодируемые кодоминирующими аллелями, дают возможность проявиться соответствующему признаку независимо от наличия рецессивного аллеля.

Очень редко наблюдаются явления сверхдоминирования (когда гибриды первого поколения превосходят по степени проявления признака обе родительские формы) и межаллельной комплементации (когда у гибридов первого поколения появляется новый признак). Интересно, что биохимические механизмы сверхдоминирования и межаллельной комплементации близки – в обоих случаях аллели содержат мутации в участках, кодирующих разные домены белковых продуктов, которые являются функциональными аналогами. Объединение аллелей у гибридов первого поколения приводит к появлению продукта с новыми свойствами: большей степенью проявления признака (сверхдоминирование) или новой формой проявления признака (межаллельная комплементация).

*Примеры:*

1. Активность алкогольдегидрогеназы у гетерозиготных дрозофил выше, чем у обеих гомозиготных родительских форм – сверхдоминирование.

2. При скрещивании форм льна с белыми и розовыми цветками получаются растения с голубой окраской лепестков венчика – межаллельная комплементация.

Если присутствует серия множественных аллелей, то они последовательно проявляют по отношению друг к другу доминантность или рецессивность. Например, в локусе агутти у собак присутствует следующая иерархия доминирования:  $a^y > a^w > a^t > a$  (соболиный окрас шерсти > зонарный окрас > черно-подпалый окрас > черный окрас).

Функциональный тест на аллелизм используется в случае необходимости определить относятся ли две мутации к одному гену или к разным. Его проводят путем скрещивания двух мутантных форм. Если у гибридов первого поколения проявляется один из признаков – нет сомнений, что мутации аллельны. Если в  $F_1$  наблюдается признак, отсутствовавший у обеих родительских форм (новообразование), то мутации относятся к разным генам.

#### *Пример*

При скрещивании плодовых мушек *Drosophila melanogaster* с абрикосовыми и белыми глазами у потомков первого поколения глаза были абрикосовыми. На основании этого сделан вывод об аллельности этих мутаций.

### **2.3. Генеалогический метод**

Поскольку эксперименты на людях категорически неприемлемы, генетический анализ у человека традиционно был основан на использовании генеалогического метода, который позволяет систематизировать наблюдения путем составления и изучения родословных. Часто генеалогический метод используют и для генетического анализа у ценных животных с длительным циклом воспроизводства и относительно небольшим числом потомков (скаковые лошади, племенной крупный рогатый скот). У человека, как правило, родословные составляют на основе опросов, хотя по мере развития медицинской статистики и увеличения охвата населения системой медико-генетического консультирования все большую роль в этом играют компьютерные базы данных.

Генеалогическое древо – родословная, которая выстраивается от индивидуума, с которого начато исследование – пробанда, и включает всех родственников по нисходящей линии. Пробандом не обязательно является лицо, страдающее наследственным заболеванием, – им может быть любой человек, обратившийся в медико-генетическую консультацию или просто участник опроса. Сибсами называются полнокровные братья и сестры, полусибсами – братья и сестры, имеющие одного общего родителя. На рис. 1, 2 и 3 представлены основные обозначения, которые рекомендованы для составления родословных. При этом следует отметить, что единых правил составления родословных не существует и все обозначения должны быть отражены в легенде – списке использованных символов.

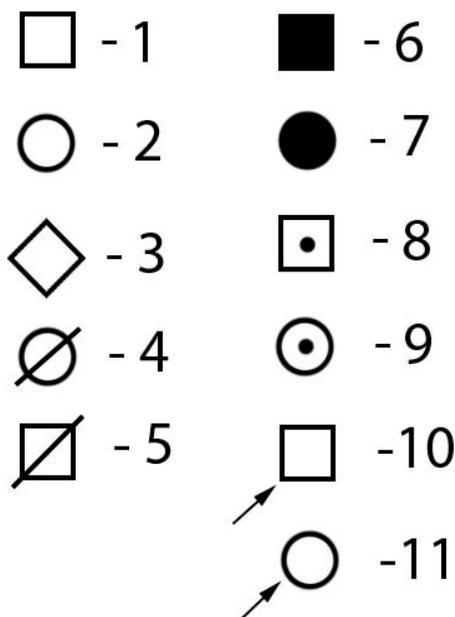


Рис. 1. Обозначения индивидуумов в родословных:

- 1 – мужчина, 2 – женщина, 3 – пол не определен, 4 – умершая женщина,  
 5 – умерший мужчина, 6 – мужчина – носитель признака,  
 7 – женщина – носитель признака, 8 – гетерозиготный мужчина,  
 9 – гетерозиготная женщина, 10 – мужчина-пробанд, 11 – женщина-пробанд

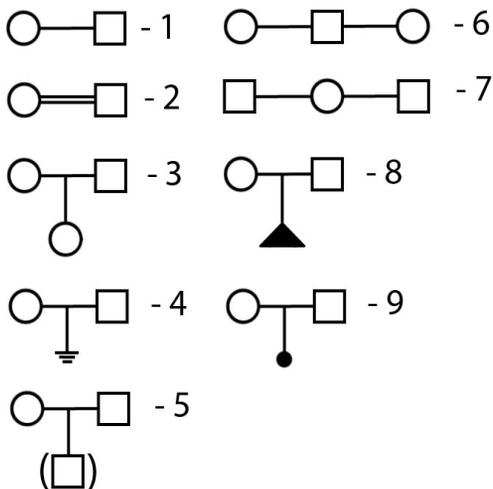


Рис. 2. Обозначения семей в родословных:

1 – брак (связь), 2 – кровнородственный брак, 3 – семья с одним ребенком – девочкой,  
 4 – бесплодный брак, 5 – семья с усыновленным ребенком – мальчиком,  
 6 – связь одного мужчины с двумя женщинами, 7 – связь одной женщины с двумя  
 мужчинами, 8 – выкидыш, 9 – медицинский аборт

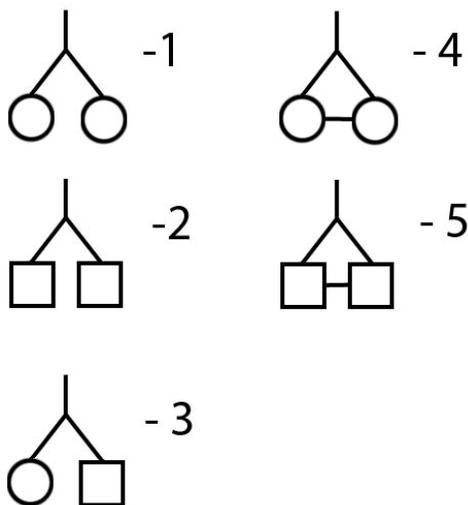


Рис. 3. Обозначения близнецов в родословных:

1 – разнойцовые (гетерозиготные) близнецы – девочки,  
 2 – разнойцовые (гетерозиготные) близнецы – мальчики,  
 3 – разнойцовые (гетерозиготные) близнецы – мальчик и девочка,  
 4 – однойцовые (монозиготные) близнецы – девочки,  
 5 – однойцовые (монозиготные) близнецы – мальчики

## 2.4. Типы наследования

Аутосомно-доминантный тип наследования признаков характеризуется проявлением признака во всех поколениях (без «проскока») и у обоих полов примерно с одинаковой частотой встречаемости (рис. 4). Ген, определяющий признак, находится в одной из 22 аутосом (т. е. тех хромосом, которые одинаковы у обоих полов), доминирование полное, мутантным является доминантный аллель, аллель дикого типа – рецессивный.

*Примеры:*

- свободная мочка уха по отношению к приросшей мочке;
- семейная гиперхолестеринемия;
- ахондроплазия.

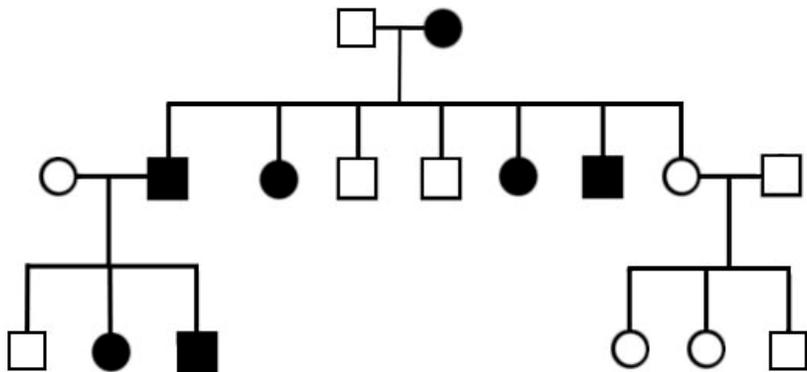


Рис. 4. Аутосомно-доминантный тип наследования

Аутосомно-рецессивный тип наследования признаков характеризуется проявлением признака у потомков родителей, которые не имели его – наблюдается «проскок поколений» (рис. 5). Представители обоих полов одинаково часто встречаются среди обладателей такого признака. Ген, определяющий признак, находится в одной из 22 аутосом, доминирование полное, мутантным является рецессивный аллель, аллель дикого типа – доминантный.

Примеры:

- муковисцедоз;
- фенилкетонурия;
- андро-генитальный синдром.

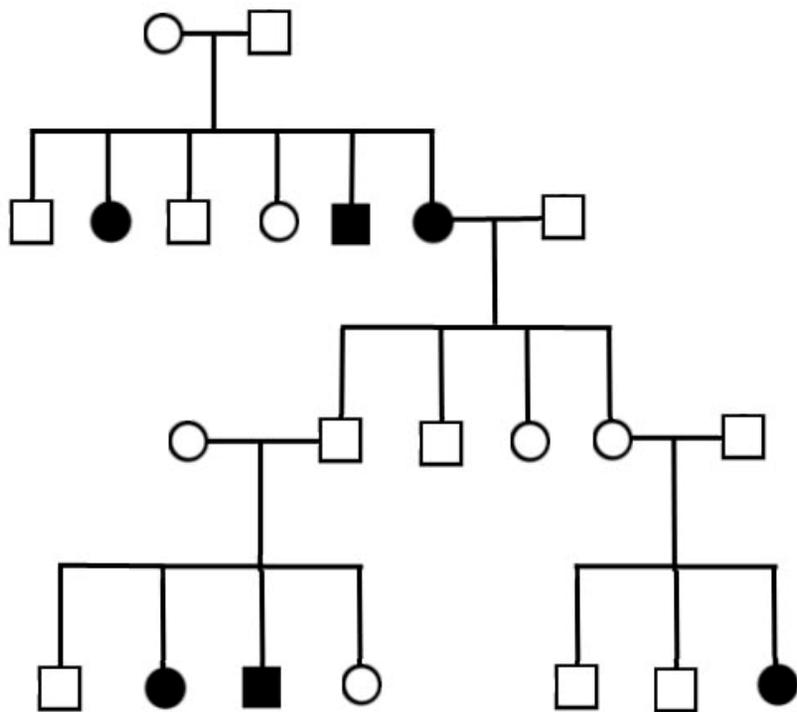


Рис. 5. Аутосомно-рецессивный тип наследования.  
Виден «проскок» поколений

Сцепленное с полом доминантное наследование имеет сходство с аутосомно-доминантным – признак проявляется во всех поколениях, без «проскоков», но у женщин в два раза чаще, чем у мужчин (рис. 6). Однако в этом случае от отцов признак может передаваться только дочерям, а от матерей – с равной вероятностью сыновьям и дочерям. Степень проявления признака у гетерозиготных женщин, как правило, ниже, чем у гемизиготных мужчин, что во многом объясняется инактивацией одной из X-хромосом у женщин. Ген, определяющий признак, находится в половой X-хромосоме, доми-

нирование полное, мутантным является доминантный аллель, аллель дикого типа – рецессивный.

*Примеры:*

- витамин-Д-резистентный рахит с гипофосфатемией;
- рото-лице-пальцевый синдром.

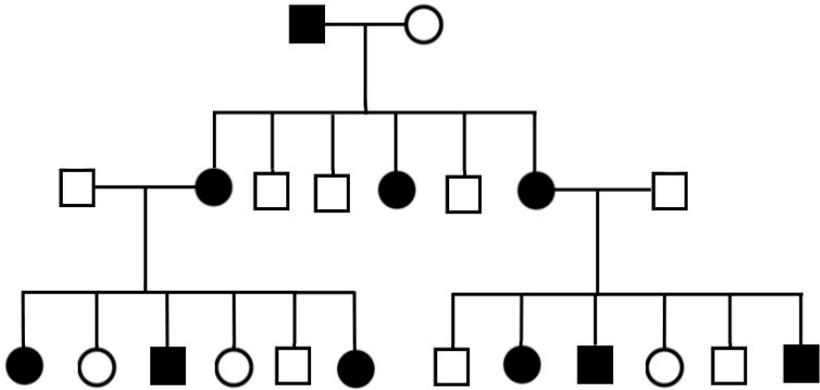


Рис. 6. Сцепленный с полом доминантный тип наследования

В случае сцепленного с полом рецессивного наследования, подобно аутосомно-рецессивному, могут появляться дети – обладатели признака у не имеющих этого признака родителей и часто наблюдается «проскок» поколений (рис. 7). Однако признак передается от отца к половине дочерей, если мать гетерозиготна (проявляется только в гомозиготном состоянии), и от гетерозиготной матери к половине сыновей (проявляется всегда, так как сыновья – гемизиготы). Никогда признак не передается от отца к сыну. Ген, определяющий признак, находится в половой X-хромосоме, доминирование полное, мутантным является рецессивный аллель, аллель дикого типа – доминантный.

*Примеры:*

- гемофилия А;
- синдром Леша-Нихена;
- дальтонизм.

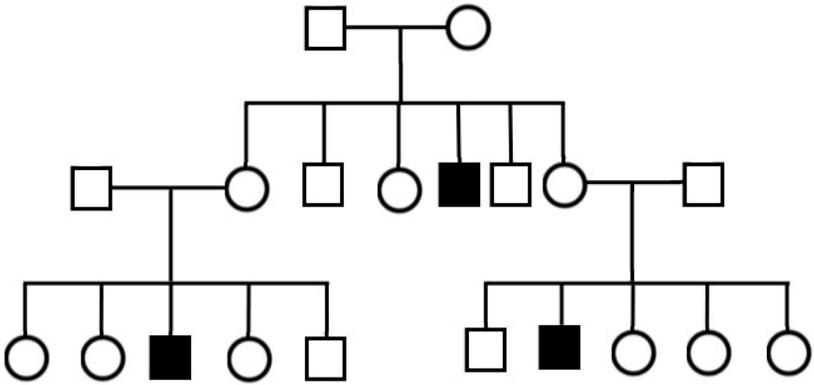


Рис. 7. Сцепленный с полом рецессивный тип наследования

Аутосомный, ограниченный полом тип наследования наблюдается в случаях аутосомной локализации гена, который его определяет, и физической возможности его проявления у особей только одного пола (процент белка в молоке или форма проявления вторичных половых признаков) (рис. 8). Этот тип наследования похож на сцепленное с полом рецессивное наследование. Главное отличие – при сцепленном с полом рецессивном наследовании признак никогда не передается от отца к сыну.

*Пример*

- моно- и билатеральный крипторхизм.

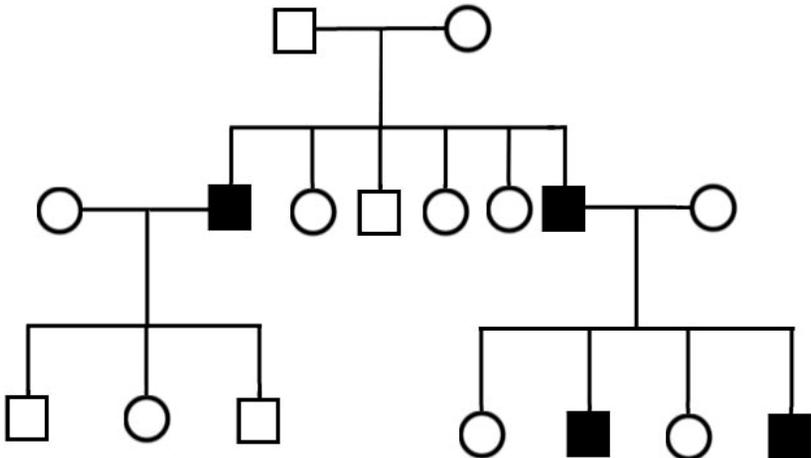


Рис. 8. Аутосомный, ограниченный полом, тип наследования

Голандрический тип наследования проявляется, если ген, определяющий признак, находится в Y-хромосоме. Поскольку в норме у мужчин только одна Y-хромосома, он всегда находится в гемизиготном состоянии. Все сыновья носителя такого признака также будут обладать им, а дочери – никогда (рис. 9).

*Примеры:*

- волосатые уши;
- оволосение средней фаланги пальцев.

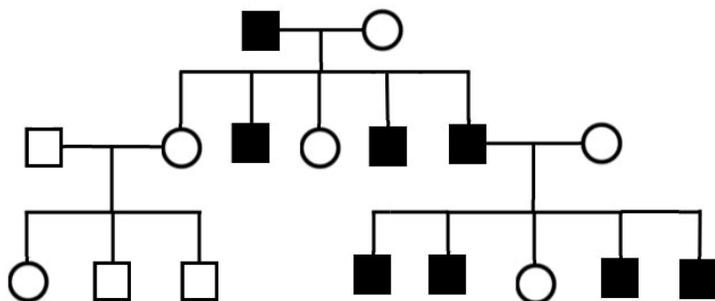


Рис. 9. Голандрический тип наследования

Митохондриальный тип объясняется цитоплазматической наследственностью, когда ген, определяющий признак, находится в геноме митохондрий. Поскольку при слиянии половых клеток от сперматозоида остается только пронуклеус (гаплоидное ядро), а вся цитоплазма оплодотворенной зиготы происходит от яйцеклетки, митохондриальный тип наследования означает передачу признака от матери ко всем ее потомкам (рис. 10). Мутации митохондриального генома, как правило, приводят к тяжелым нарушениям обмена веществ.

*Примеры:*

- митохондриальная миоэкзенцефалия;
- атрофия зрительного нерва Лебера;
- болезнь Кернса – Сейра.

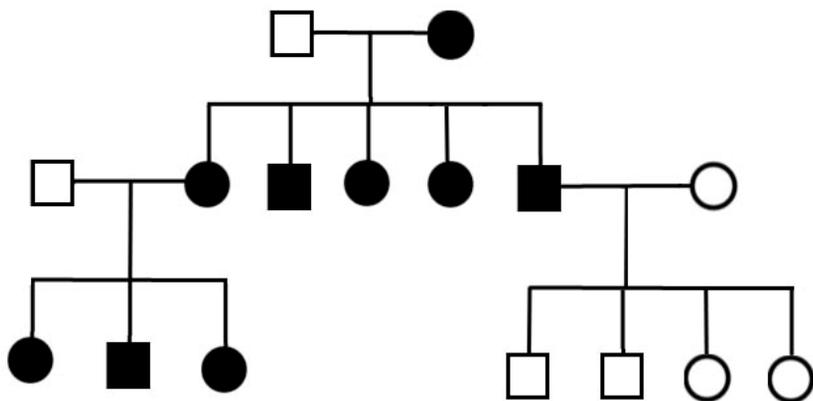


Рис. 10. Митохондриальный тип наследования

## 2.5. Полигенные различия

Если родительские формы различаются по двум признакам, то их скрещивание называется дигибридным. В этом случае говорят о дигенных различиях родительских форм. Если родительские формы различаются по трем и более признакам, то их скрещивание называется полигибридным. В этом случае говорят о полигенных различиях родительских форм.

Р ♀ ААВВ × ♂ аавв

F<sub>1</sub> А-В- (по генотипу – АаВв)

F<sub>2</sub> 9 А-В- : 3 А-вв : 3 ааВ- : 1 аавв

F<sub>A</sub> 1 АаВв : 1 Аавв : 1 ааВВ : 1 аавв.

### Пример

При скрещивании гороха с желтыми гладкими семенами (ААВВ) и зелеными морщинистыми (аавв) Мендель получил в первом поколении все семена – желтые гладкие (А-В-, по генотипу – дигетерозиготы АаВв), во втором поколении 9 желтых гладких (А-В-) : 3 желтых морщинистых (А-вв) : 3 зеленых гладких (ааВ-) : 1 зеленых морщинистых (аавв).

Для выяснения генотипа потомков, исходя из генотипов родителей, служит решетка Пеннета. В верхней строке выписывают гаметы одного родителя, в левом столбце – гаметы другого. Во внутренних ячейках получаем генотипы потомков.

	AB	Ab	aB	ab
AB	ААВВ	ААВв	АаВВ	АаВв
Ab	ААВв	ААвв	АаВв	Аавв
aB	АаВВ	АаВв	aaВВ	aaВв
ab	АаВв	Аавв	aaВв	aавв

### Пример

У плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (рис. 11) цвет глаз сепия (как на старой фотографии) определяется рецессивным аллелем *se*, а *se<sup>+</sup>* – аллель дикого типа – определяет красную окраску глаз (рис. 12). Зачаточные крылья наблюдаются у гомозигот по аллелю *vg* (рис. 13). При скрещивании родительских форм, одна из которых имеет окраску глаз цвета сепия и нормальные крылья, а другая – красные глаза и зачаточные крылья, наблюдаем:

$P \quad \text{♀ } se/se \text{ } vg^+/vg^+ \quad \times \quad \text{♂ } se^+/se^+ \text{ } vg/vg$

$F_1 \quad se^+/- \text{ } vg^+/- \quad \text{красные глаза, нормальные крылья}$   
(по генотипу –  $se^+/se \text{ } vg^+/vg$ ).

Рисуем решетку Пеннета:

	<i>se<sup>+</sup> vg<sup>+</sup></i>	<i>se<sup>+</sup> vg</i>	<i>se vg<sup>+</sup></i>	<i>se vg</i>
<i>se<sup>+</sup> vg<sup>+</sup></i>	<i>se<sup>+</sup>/se<sup>+</sup> vg<sup>+</sup>/vg<sup>+</sup></i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se<sup>+</sup>/se<sup>+</sup> vg<sup>+</sup>/vg</i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se<sup>+</sup>/se vg<sup>+</sup>/vg<sup>+</sup></i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se<sup>+</sup>/se vg<sup>+</sup>/vg</i> красные глаза, нормальные крылья
<i>se<sup>+</sup> vg</i>	<i>se<sup>+</sup>/se<sup>+</sup> vg<sup>+</sup>/vg</i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se<sup>+</sup>/se<sup>+</sup> vg/vg</i> красные глаза, зачаточные крылья	<i>se<sup>+</sup>/se vg<sup>+</sup>/vg</i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se<sup>+</sup>/se vg/vg</i> красные глаза, зачаточные крылья
<i>se vg<sup>+</sup></i>	<i>se/se vg<sup>+</sup>/vg<sup>+</sup></i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se/se vg<sup>+</sup>/vg</i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se/se vg<sup>+</sup>/vg<sup>+</sup></i> глаза цвета сепия, нормальные крылья	<i>se/se vg<sup>+</sup>/vg</i> глаза цвета сепия, нормальные крылья
<i>se vg</i>	<i>se/se vg<sup>+</sup>/vg</i> красные глаза, нормальные крылья	<i>se/se vg/vg</i> красные глаза, зачаточные крылья	<i>se/se vg<sup>+</sup>/vg</i> глаза цвета сепия, нормальные крылья	<i>se/se vg/vg</i> глаза цвета сепия, зачаточные крылья

F<sub>2</sub> 9 se<sup>+</sup>/- vg<sup>+</sup>/- : 3 se<sup>+</sup>/se vg/vg : 3 se/se vg<sup>+</sup>/- : 1 se/se vg/vg

По фенотипу:

9 – красные глаза, нормальные крылья : 3 – красные глаза, зачаточные крылья : 3 – глаза цвета сепия, нормальные крылья : 1 – глаза цвета сепия, зачаточные крылья

F<sub>в1</sub> se<sup>+</sup>/- vg<sup>+</sup>/- : 1 se<sup>+</sup>/se vg/vg : 1 se/se vg<sup>+</sup>/- : 1 se/se vg/vg

По фенотипу:

1 – красные глаза, нормальные крылья : 1 – красные глаза, зачаточные крылья : 1 – глаза цвета сепия, нормальные крылья : 1 – глаза цвета сепия, зачаточные крылья.



Рис. 11. Дрозофила дикого типа\*

---

\* URL: <http://insider2d.livejournal.com/22315.html>



А



Б

Рис. 12. Окраска глаз у дрозофилы: А – дикий тип, Б – сепия\*

---

\* URL: <http://www.biologie.uni-halle.de/entwicklungsgenetik/lehre/studenten/drosophila/mutanten/?lang=en>.



А



Б

Рис. 13. Форма крыльев у дрозофилы: А – дикий тип, Б – мутация *vg\**

Иногда признак определяется аллелями двух и более генов. Тогда дигенные и полигенные различия характеризуют особей, различающихся по аллелям двух и более генов. Независимое комбинирование генотипов возможно, только если изучаемые гены расположены на разных хромосомах.

---

\* URL: <http://www.biologie.uni-halle.de/entwicklungsgenetik/lehre/studenten/drosophila/mutanten/?lang=en>.

## 2.6. Взаимодействие генов

Продукты генов могут по-разному взаимодействовать. В этом случае проявление признака будет определяться аллелями двух и более генов. Если продукты двух и более генов дополняют действие друг друга, приводя к формированию нового признака, такой тип взаимодействия генов называется комплементарность.

### Пример

У плодовой мушки *Drosophila melanogaster* коричневая окраска глаз определяется рецессивной мутацией *bw*, а аллелем дикого типа является *bw<sup>+</sup>*. Ярко алые глаза наблюдаются у гомозигот по мутантному аллелю *st*, в то время как присутствие в генотипе одного аллеля дикого типа *st<sup>+</sup>* приводит к формированию нормального (красного) цвета глаз. Скрещиваем дрозофил с коричневыми и ярко алыми глазами. В первом поколении наблюдается новообразование по сравнению с обеими родительскими формами – все гибриды имеют красные глаза (генотип *bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st*). Следует отметить, что наличие новообразования всегда говорит о взаимодействии генов. Для установления генотипов и фенотипов гибридов второго поколения рисуем решетку Пеннета:

	<i>bw<sup>+</sup> st<sup>+</sup></i>	<i>bw<sup>+</sup> st</i>	<i>bw st<sup>+</sup></i>	<i>bw st</i>
<i>bw<sup>+</sup> st<sup>+</sup></i>	<i>bw<sup>+</sup>/bw<sup>+</sup> st<sup>+</sup>/st<sup>+</sup></i> красные	<i>bw<sup>+</sup>/bw<sup>+</sup> st<sup>+</sup>/st</i> красные	<i>bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st<sup>+</sup></i> красные	<i>bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st</i> красные
<i>bw<sup>+</sup> st</i>	<i>bw<sup>+</sup>/bw<sup>+</sup> st<sup>+</sup>/st</i> красные	<i>bw<sup>+</sup>/bw<sup>+</sup> st/st</i> коричневые	<i>bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st</i> красные	<i>bw<sup>+</sup>/bw st/st</i> ярко алые
<i>bw st<sup>+</sup></i>	<i>bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st<sup>+</sup></i> красные	<i>bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st</i> красные	<i>bw/bw st<sup>+</sup>/st<sup>+</sup></i> коричневые	<i>bw/bw st<sup>+</sup>/st</i> коричневые
<i>bw st</i>	<i>bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st</i> красные	<i>bw<sup>+</sup>/bw st/st</i> коричневые	<i>bw/bw st<sup>+</sup>/st</i> коричневые	<i>bw/bw st/st</i> белые

P ♀ *bw/bw st<sup>+</sup>/st<sup>+</sup>* X ♂ *bw<sup>+</sup>/bw<sup>+</sup> st/st*

F<sub>1</sub> *bw<sup>+</sup>/- st<sup>+</sup>/-* (по генотипу – *bw<sup>+</sup>/bw st<sup>+</sup>/st*)

F<sub>2</sub> 9 *bw<sup>+</sup>/- st<sup>+</sup>/-* : 3 *bw<sup>+</sup>/bw st/st* : 3 *bw/bw st<sup>+</sup>/-* : 1 *bw/bw st/st*

*bw<sup>+</sup>/- st<sup>+</sup>/-* – красные глаза (дикий тип)

*bw<sup>+</sup>/bw st/st* – ярко алые глаза

*bw/bw st<sup>+</sup>/-* – коричневые глаза

*bw/bw st/st* – белые глаза.



А



Б

Рис. 14. Мутации *st* (А) и *bw* (Б) у дрозофилы\*

Биохимическое объяснение состоит в том, что цвет глаз у дрозофилы определяется взаимодействием коричневого и ярко алого пигментов. Мутация *bw* блокирует синтез ярко алого пигмента, а мутация *st* – коричневого. У гомозигот по обеим мутациям *bw/bw st/bw* нет пигмента вообще, и как следствие, глаза белые. У гомозигот по *bw* нет ярко алого

---

\* URL: <http://www.enasco.com/product/LM00649M>

пигмента – глаза коричневые (при условии наличия хотя бы одного доминантного аллеля  $st^+$ ), а у обладателей генотипов  $bw^+/bw^+ st/st$  и  $bw^+/bw st/st$  – ярко алые.

При комплементарном взаимодействии генов возможны расщепления по фенотипу  $9 : 3 : 3 : 1$ ,  $9 : 3 : 4$ ,  $9 : 7$ .

Примерами комплементарного взаимодействия генов у человека являются врожденная глухота и наследование иммунного ответа к синтетическим полипептидам. Другим типом взаимодействия генов является эпистаз, когда действие одного гена подавляет действие другого.

#### *Пример*

При скрещивании белых кур и белых петухов, имеющих различное происхождение, в первом поколении все птицы были белые, а во втором поколении – 13 частей белых и 3 части окрашенных. Появление новообразования говорит о взаимодействии генов, а соотношение  $13 : 3$  (общее число частей – 16) является видоизменением соотношения  $9 : 3 : 3 : 1$ , что свидетельствует о дигенных различиях. Наличие окраски у кур определяется доминантным аллелем  $C$ , у гомозигот  $cc$  окраска белая. Доминантный ингибитор окраски  $I$  действует независимо от генотипа по гену  $C$ , подавляя формирование окрашенных перьев.

$P \quad \text{♀} \quad IICC \quad \times \quad \text{♂} \quad iicc$

$F_1 \quad I-C-$  (по генотипу –  $IiCc$ )

$F_2$  13 белые ( $9 I-C- + 3 I-cc + 1 iicc$ ) : 3 окрашенным ( $3 iiC-$ ).

Частным случаем эпистаза является супрессия, когда подавляющим действием обладает рецессивный аллель эпистатирующего гена. При доминантном эпистазе отмечается расщепление 13 частей мутантных особей : 3 частям особей дикого типа (частный случай  $12 : 3 : 1$ ), а при супрессии – 13 частей особей дикого типа : 3 частям мутантных особей.

У человека эпистатические взаимодействия генов наблюдаются, например, при наследовании склонности к ожирению, предрасположенности к склерозу, риноконъюнктивиту.

Полимерным называется взаимодействие генов, которое изменяет проявление признака количественно. Иначе говоря, при совместном действии двух или более генов наблюдается изменение степени выраженности признака.

Различают некумулятивную и кумулятивную полимерию. В первом случае фенотипические отличия отмечаются только у гомозиготных рецессивов по двум генам (расщепление 15 : 1), а во втором случае у гибридов второго поколения присутствуют градуальные различия (1 : 4 : 6 : 4 : 1) пропорционально числу доминантных аллелей любого из двух генов-участников. Гены, взаимодействующие по типу полимерии, обычно обозначают одинаковыми буквами с разными цифровыми индексами –  $A_1, A_2, A_3$ .

*Примеры:*

1. Некумулятивная полимерия наблюдается, например, при наследовании признака форма плода у пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*). При скрещивании родительских форм с треугольными плодами (генотип  $A_1A_1A_2A_2$ ) и овальными плодами (генотип  $a_1a_1a_2a_2$ ) в первом поколении гибриды имеют треугольные плоды, во втором наблюдается расщепление 15 частей растений с треугольными плодами : 1 часть растений с овальными плодами. Для формирования рецессивного фенотипа необходимо полное отсутствие доминантных аллелей обоих генов –  $A_1$  и  $A_2$ .

$P \quad \text{♀ } A_1A_1A_2A_2 \times \text{♂ } a_1a_1a_2a_2$

$F_1$  треугольные плоды (по генотипу –  $A_1a_1A_2a_2$ )

$F_2$  15 треугольные плоды (все генотипы кроме  $a_1a_1a_2a_2$ ) : 1 овальные плоды ( $a_1a_1a_2a_2$ ).

2. Признак окраска кожи у человека наследуется по типу кумулятивной полимерии. Наличие четырех доминантных аллелей ( $A_1A_1A_2A_2$ ) приводит к формированию черной окраски кожи. В генотипе темных мулатов присутствуют три любых доминантных аллеля этой серии (т. е.  $A_1$  или  $A_2$  в любой комбинации). Для формирования окраски кожи, свойственной средним мулатам, достаточно двух доминантных аллелей,

а светлых мулатов – одного. Наконец, белый цвет кожи наблюдается у гомозиготных рецессивов по двум генам – генотип  $a_1a_1a_2a_2$ . На одном из островов у побережья Африки пираты провозгласили свободную республику. Все мужчины имели белую окраску кожи, а женщины – освобожденные рабы – черную:

$P \quad \text{♀} \quad A_1A_1A_2A_2 \quad \times \quad \text{♂} \quad a_1a_1a_2a_2$

$F_1$  средние мулаты (по генотипу –  $A_1a_1A_2a_2$ )

$F_2$  1 черные ( $A_1A_1A_2A_2$ ) : 4 темные ( $2 A_1A_1A_2a_2 + 2 A_1a_1A_2A_2$ ) : 6 средние ( $2 A_1A_1a_2a_2 + 2 a_1a_1A_2A_2 + 2 A_1a_1A_2a_2$ ) : 4 светлые ( $2 a_1a_1A_2a_2 + 2 A_1a_1a_2a_2$ ) : 1 белые ( $a_1a_1a_2a_2$ ).

Во втором поколении только  $1/8$  потомков имеет фенотип одной из родительских форм и  $3/8$  – фенотип гибридов первого поколения. Оставшиеся  $1/2$  – обладатели новых фенотипов по признаку «окраска кожи».

Иногда один ген имеет влияние на два и более признака. Такое явление называется плейотропией. Например, альбинизм у человека часто связан с ухудшением слуха, рыжая окраска волос – с более светлым цветом кожи и появлением веснушек, серповидноклеточная анемия – с устойчивостью к малярии. Особенно интересно рецессивное летальное (приводящее к смерти) действие некоторых доминантных мутаций (наличие хохолка у домашней канарейки, мраморный окрас у собак породы колли, укороченный хвост у кошек породы мэнкс, сложенные уши у кошек породы скоттиш фолд (рис. 15)). В этом случае признак проявляется только у гетерозигот, а мутантный аллель в гомозиготном состоянии приводит к гибели.



Рис. 15. Кошка породы скоттиш-фолд – носительница доминантной мутации с рецессивным летальным действием\*

## ***2.7. Сцепленное наследование, кроссинговер и генетическая интерференция***

Два типа наследования у человека – сцепленное с полом доминантное и сцепленное с полом рецессивное – объясняются локализацией исследуемых генов в половой X-хромосоме. Иными словами, пол, рассматриваемый как простой признак, и другой изучаемый признак наследуются совместно. Сцепление с полом – частный случай сцепленного наследования, смысл которого заключается в нарушении принципа независимого наследования двух и более признаков по причине нахождения обуславливающих их генов в одной хромосоме.

На вопрос о том, является ли наследование сцепленным с полом, могут ответить реципрокные скрещивания – когда родительские формы меняют местами. Например, вначале доминантной родительской формой являются самки, затем самцы. Различные результаты реципрокных скрещиваний свидетельствуют о сцеплении признака с полом.

---

\* URL: <http://cat.mau.ru/sfs/?p=care>

### Пример

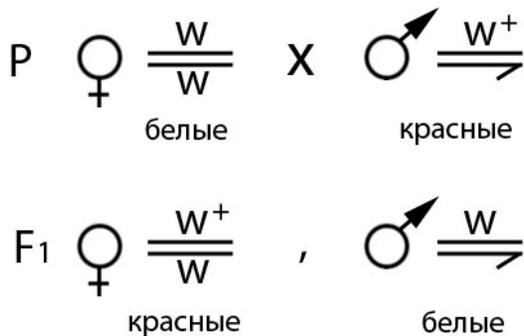
Белая окраска глаз у дрозофилы может определяться мутантным аллелем  $w$  (рис. 16). Ген  $w$  локализован в X-хромосоме и может быть представлен аллелем дикого типа  $w^+$  (красная окраска глаз) и мутантным аллелем  $w$ . Гомо- и гетерозиготными могут быть только самки, а самцы всегда гемизиготны по локусу  $w$ . Результаты реципрокных скрещиваний представлены на рис. 17. В случае скрещивания белоглазых самок с красноглазыми самцами в первом поколении все самки красноглазые, а все самцы – белоглазые. Если скрестить красноглазых самок с белоглазыми самцами, то все потомки независимо от пола будут иметь красную окраску глаз.



Рис. 16. Мутация  $w$  у дрозофилы\*

---

\* URL: <http://www.biologie.uni-halle.de/entwicklungsgenetik/lehre/studenten/drosophila/mutanten/?lang=en>



Реципрокно :

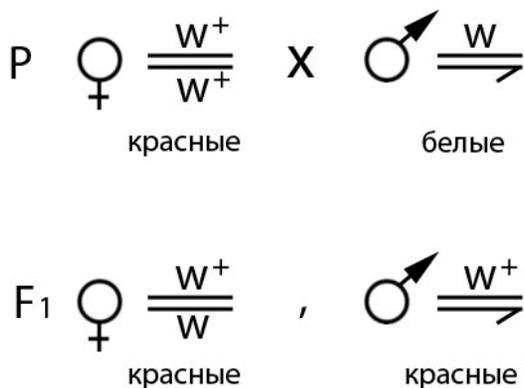
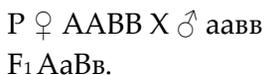


Рис. 17. Реципрокные скрещивания для установления типа наследования белой окраски глаз у *Drosophila melanogaster*

Если два или более признаков определяются генами, локализованными на одной аутосоме, то говорят об аутосомном сцеплении (или просто сцеплении).

Сцепление может быть полным, когда родительские комбинации аллелей всегда передаются потомкам, что объясняется отсутствием обмена участками хромосом (кроссинговера) в районе между исследуемыми генами. Предположим, между генами А и В – полное сцепление, тогда:



Гибриды первого поколения образуют следующие гаметы:

	АВ	ав
АВ	ААВВ	АаВв
ав	АаВв	аавв

F<sub>2</sub> 1 ААВВ : 2 АаВв: 1 аавв.

Если на участке между А и В происходит кроссинговер (рекомбинация), то кроме родительских сочетаний аллелей, например АВ и ав, будут появляться и рекомбинантные сочетания: Ав и аВ. Гаметы, несущие рекомбинантные сочетания аллелей, называются кроссоверными гаметами, а происшедшие в результате их слияния особи – кроссоверными особями. Соотношения кроссоверных и некроссоверных особей зависит от расстояния на хромосоме между изучаемыми генами – чем дальше они друг от друга, тем чаще случается кроссинговер на участке между местами их локализации и тем больше кроссоверных особей. Рекомбинационное расстояние между двумя генами – это отношение числа кроссоверных гамет к общему числу гамет, умноженное на сто. Единицей рекомбинационного расстояния является 1 сантиморган (сМ). Следует отметить, что в анализирующем скрещивании F<sub>A</sub> соотношение кроссоверных и некроссоверных гамет будет равно соотношению кроссоверных и некроссоверных особей. Если одна родительская форма несет два доминантных аллеля (АВ), а другая два рецессивных (ав) – это состояние притяжения, а если родительские формы несут по одному доминантному и одному рецессивному аллелю (Ав и аВ) – это состояние отталкивания.

### Пример

У дрозофилы черная окраска тела определяется аллелем  $b$ , а  $b^+$  – аллель дикого типа. Мутация  $rg$  в гомозиготе приводит к пурпурной окраске глаз, нормальный – красный цвет глаз определяется аллелем  $rg^+$ . Скрещиваем черных мух с пурпурными глазами ( $bbrgrg$ ) и серых мух с красными глазами ( $b^+b^+rg^+rg^+$ ). Обращаем внимание на то, что аллели находятся в состоянии притяжения. Все гибриды первого поколения гетерозиготны и имеют фенотип второй родительской формы. В анализирующем скрещивании получаем:

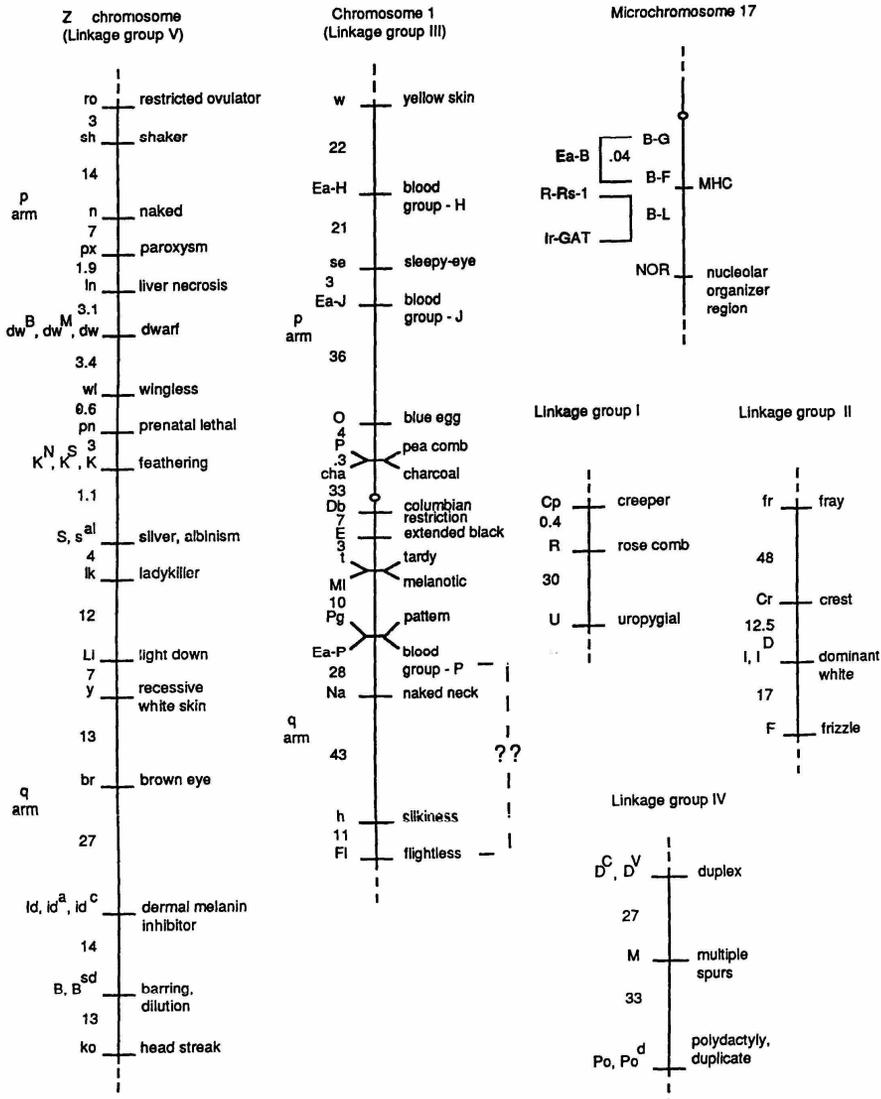
серое тело, красные глаза – 1000  
серое тело, пурпурные глаза – 64  
черное тело, красные глаза – 62  
черное тело, пурпурные глаза – 831.

Следует отметить, гомозиготных рецессивов всегда несколько меньше, чем доминантных гомозигот из-за некоторого снижения жизнеспособности.

Нетрудно рассчитать рекомбинационное расстояние между генами  $b$  и  $rg$ .

$$(64 + 62) : (1000 + 64 + 62 + 831) \times 100 = 6,4 \text{ сМ.}$$

Используя большое число генов – маркеров генетического анализа – можно построить генетические карты хромосом с указанием взаимного расположения и расстояния между маркерами (рис. 18). Каждая хромосома будет соответствовать одной группе сцепления. Если расстояние между двумя маркерами больше 50 сМ (что соответствует проценту кроссинговера при независимом наследовании), маркеры наследуются, не проявляя сцепления друг с другом. Поэтому для повышения точности генетических карт необходимо использовать как можно большее число маркеров. На точность определения генетических расстояний влияет и явление генетической интерференции – подавления кроссинговера на участках, находящихся вблизи от участка, где уже происходит рекомбинация.



Linkage map of the domestic chicken (not to scale)

Рис. 18. Генетические карты домашней курицы\*

\* По Bitgood J.J., Somes R.G. Linkage relationships and gene mapping // In: Poultry Breeding and Genetics (R.D. Crawford ed.). Elsevier: Amsterdam. 1990. P. 469-495

## 2.8. Генетический анализ у микроорганизмов

Все вышесказанное в главе II относится к высшим эукариотам. При проведении генетического анализа у прокариот и низших эукариот следует руководствоваться несколькими принципами исходя из биологии объекта исследования. Несмотря на многообразие микроорганизмов, основные методические подходы – селективных сред и отпечатков, подходят для большинства из них.

При выращивании микроорганизмов (обычно на твердой среде) можно варьировать состав питательных веществ. Прототрофами называют микроорганизмы, способные расти на минимальной для своего вида среде, обычно они соответствуют дикому типу. Мутантные формы, которые утратили способность расти на среде без специальных добавок, называются ауксотрофами. Например, штамм дрожжей, не способный расти на среде без аденина, называют ауксотрофным по аденину. В качестве селективных маркеров можно использовать и антибиотики. Тогда устойчивость, либо чувствительность, к определенному антибиотику считается элементарным признаком. Для перенесения микроорганизмов с одной среды на другую используют метод отпечатков (рис. 19). Колонией микроорганизмов называют скопление клеток или разрастание мицелия, видимое невооруженным глазом, штаммом – изолированную в определенное время и в определенном месте культуру микроорганизмов, клоном – потомство одной клетки.

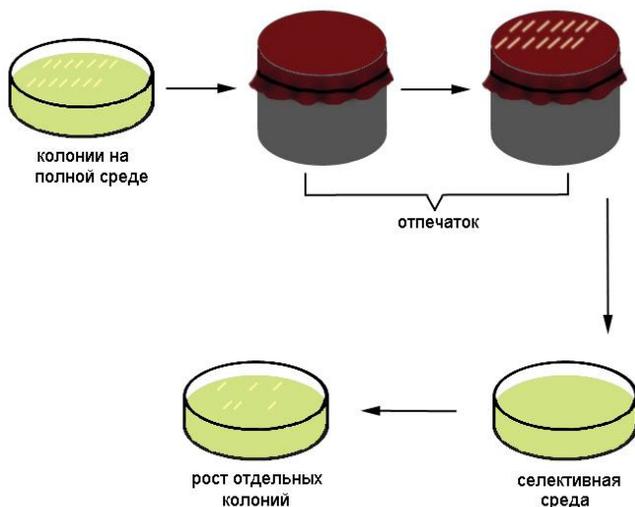


Рис. 19. Метод отпечатков

Из числа прокариот наиболее распространенным модельным объектом генетики является кишечная палочка *Escherichia coli* – граммотрицательная, факультативно анаэробная, не образующая эндоспор бактерия, которая обитает в нижней части кишечника теплокровных животных, как правило, в качестве симбионта. Половой процесс у кишечной палочки происходит путем конъюгации и переноса ДНК от клетки-донора (F-тип) к клетке-реципиенту (F<sup>-</sup> тип). Половой фактор (F-фактор) – внехромосомная кольцевая ДНК – эпизома, которая передается через половые волоски (F-пили). Клетки, в которых F-фактор интегрировался в хромосому, называются Hfr-клетки (high frequency of recombination – высокая частота рекомбинации). При смешении популяции клеток Hfr с избыточным числом F<sup>-</sup> – клеток практически все клетки найдут себе подходящих партнеров и начнут конъюгировать (рис. 20). Если клетки насильственно разъединять путем интенсивного встряхивания через определенные промежутки времени, можно определить порядок генов на хромосоме и расстояние между ними в единицах времени между встряхиваниями. Так строят генетические карты бактерий (рис. 21).

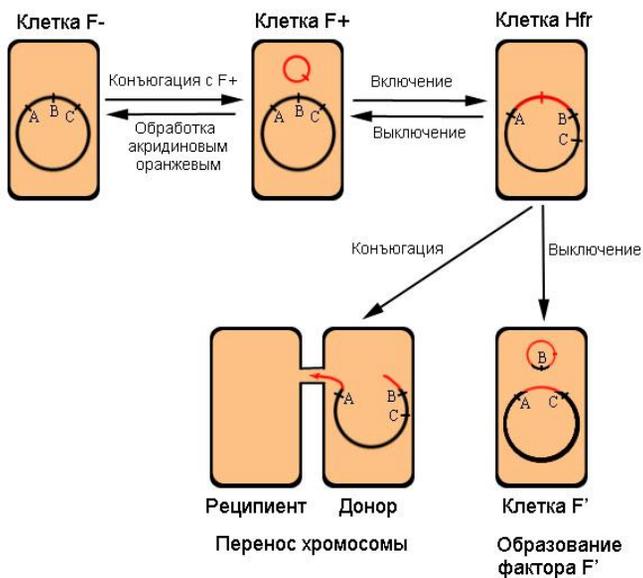


Рис. 20. Взаимоотношения между половыми типами *Escherichia coli*

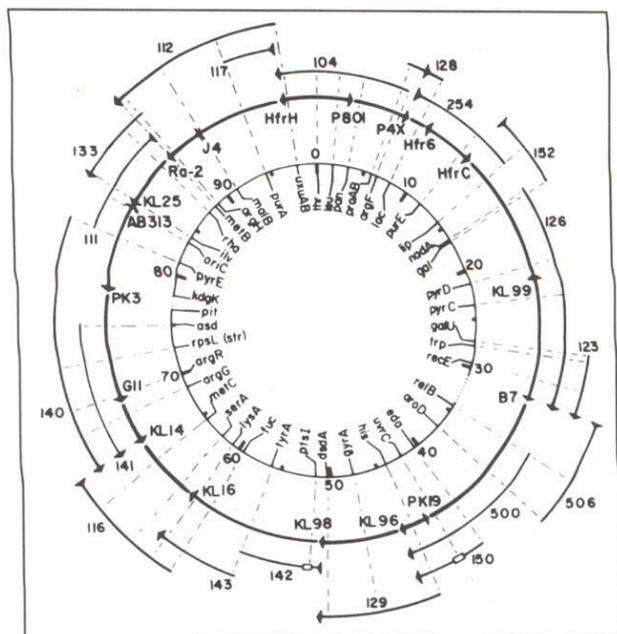


Рис. 21. Генетическая карта *Escherichia coli*\*

\* URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908>

Из числа низших эукариот наибольшее распространение в качестве модельного объекта генетики получили пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – одноклеточные микроскопические (5–10 микрон в диаметре) грибки из рода сахаромицетов, широко используемые в производстве алкогольной и хлебопекарной продукции. Особенности жизненного цикла этого микроорганизма (рис. 22) позволяют проводить тетрадный анализ – исследовать генотип продуктов мейоза путем разделения и индивидуального культивирования аскоспор. В лабораторных условиях культуры дрожжей поддерживают в гаплофазе. У *Saccharomyces cerevisiae* два половых типа – а и  $\alpha$ , которые, сливаясь друг с другом, образуют зиготу. Добавляя в культуральную среду ацетат натрия, можно стимулировать мейоз. Случайную выборку спор можно получить путем обработки асков пищеварительным соком виноградной улитки. Индивидуальное разделение спор проводят при помощи препаровальных игл.

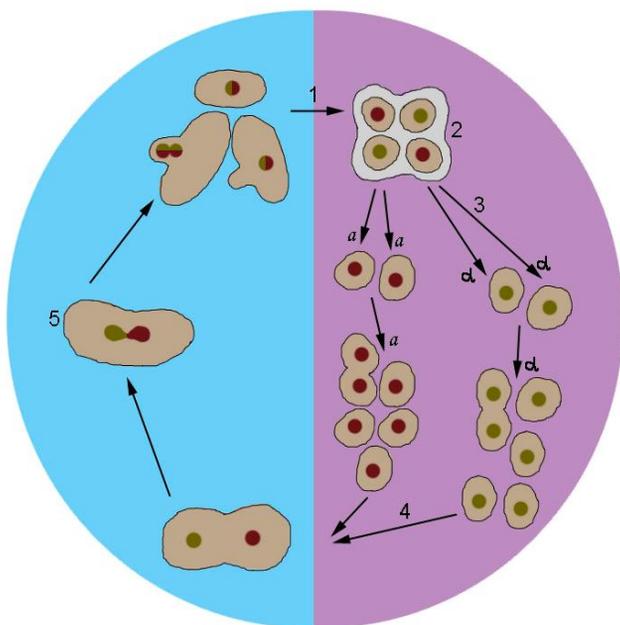


Рис. 22. Жизненный цикл *Saccharomyces cerevisiae*.

Голубым цветом обозначена диплофаза, сиреневым – гаплофаза;

а и  $\alpha$  – типы спаривания; 1- мейоз, 2 – аск, 3 – аскоспоры, 4 – копуляция, 5 – зигота

### *Контрольные вопросы и задания*

1. Определите типы наследования в родословных, приведенных на рис. 23.

2. При скрещивании кошек с разной окраской шерсти было получено:

$P$  самки черные  $\times$  самцы рыжие

$P$  самки рыжие  $\times$  самцы черные

$F_1$  самки черепаховые,  
самцы черные

$F_1$  самки черепаховые,  
самцы рыжие

$F_2$  самки черепаховые и черные,  
самцы черные и рыжие

$F_2$  самки черепаховые и рыжие,  
самцы черные и рыжие.

Определите генотипы скрещиваемых форм и локализацию генов.

3. Какие группы крови возможны у ребенка, если его родители имеют группы крови А и В и оба являются: а) гетерозиготами, б) один из родителей гетерозиготен.

4. Потемнение зубов определяется двумя доминантными генами, один из которых находится в X-хромосоме, а другой – в аутосоме. В семье, где родители имели темные зубы, родились девочка и мальчик с нормальным цветом зубов. Темные зубы матери определены геном, сцепленным с X-хромосомой, а темные зубы отца – аутосомным геном. Определите генотипы родителей и детей.

5. Заболевание обнаруживается у детей, родители которых являлись двоюродными братом и сестрой и не страдали от этого заболевания. Как наследуется болезнь?

6. Известно, что ген гемофилии и ген дальтонизма – рецессивные, локализованные в X-хромосоме; расстояние между ними – 9,8 сМ. Здоровая девушка, мать которой дальтоник, а отец – гемофилик, выходит замуж за здорового мужчину, родители которого здоровы. Определите, какова вероятность появления в этой семье здоровых детей.

7. Резус-положительность и эллиптоцитоз определяют доминантными аутосомными генами. Локус резус-фактора (D) и локус эллиптоцитоза (E), вызывающего овальную форму

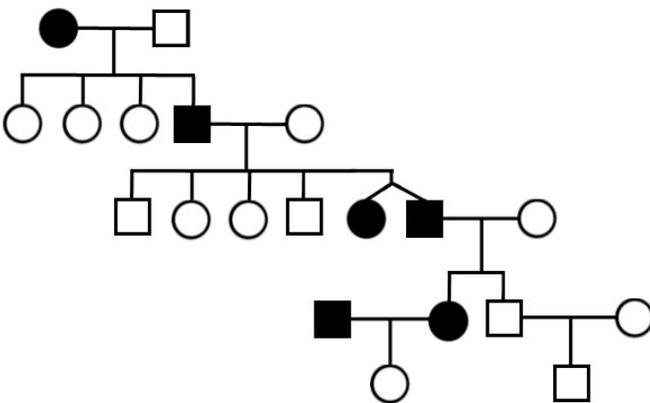
эритроцитов, находятся сцепленно в одной аутосоме на расстоянии 3 сМ. Мать гетерозиготна по обоим анализируемым признакам. Отец резус – отрицателен и имеет нормальные эритроциты. Определите процентное соотношение вероятных генотипов и фенотипов детей в семье.

8. Гипертрихоз передается через Y- хромосому, а полидактилия – как аутосомный признак. В семье, где отец имел гипертрихоз, а мать – полидактилию, родилась нормальная в отношении обоих признаков дочь. Какова вероятность рождения сына без обеих аномалий?

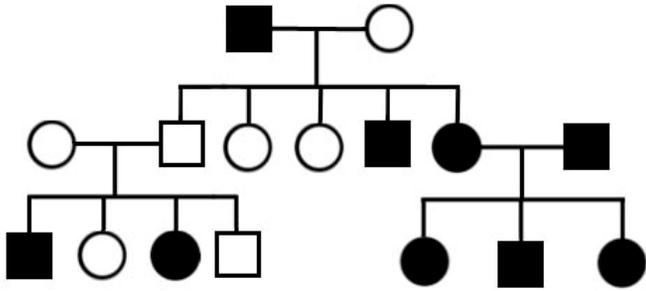
9. У супругов с нормальным зрением родилось два сына и две дочери. У первой дочери зрение нормальное; у нее три сына, два из которых дальтоники. У второй дочери и у ее пяти сыновей зрение нормальное. Первый сын дальтоник; у него две дочери и два сына, и все видят нормально. Второй сын и четверо его сыновей также имеют нормальное зрение. Каковы генотипы всех родственников?

10. На рис. 24 приведены генотипические данные особей второго поколения скрещивания дрозофил. Установите генотипы родителей.

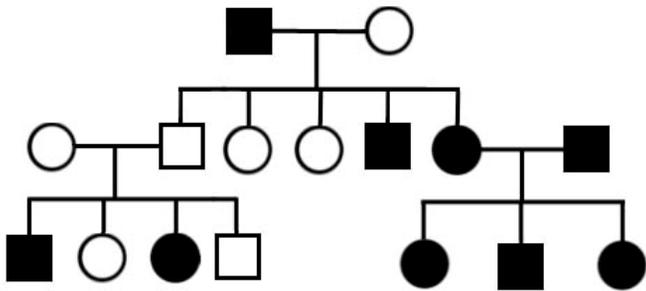
11. При каком типе взаимодействия аллелей фенотипические классы полностью соответствуют генотипическим?



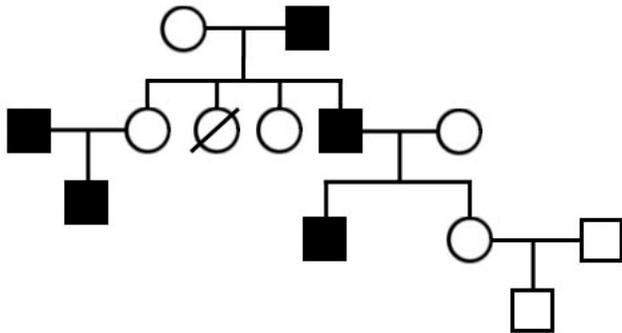
A.



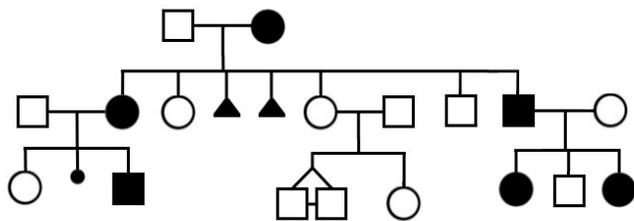
Б.



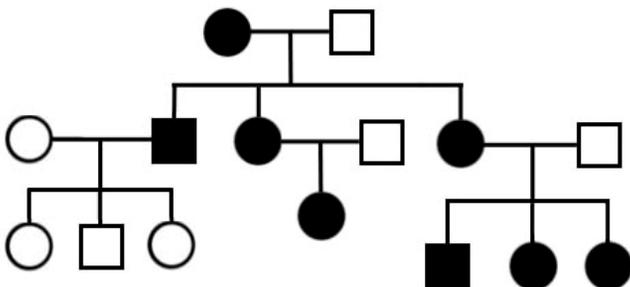
Б.



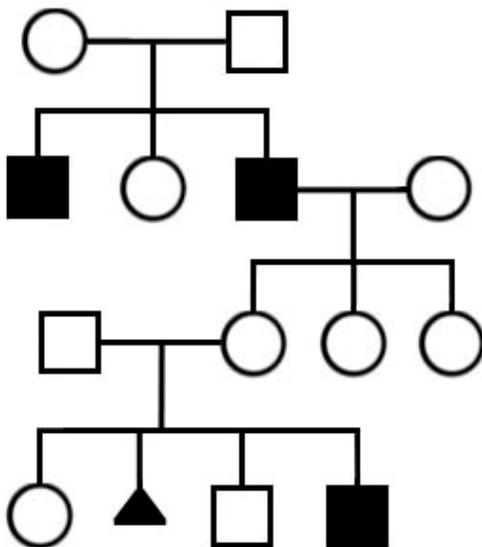
Г.



Д.



Е.



Ж.

Рис. 23. Примеры родословных (для задачи 1 к гл. II)

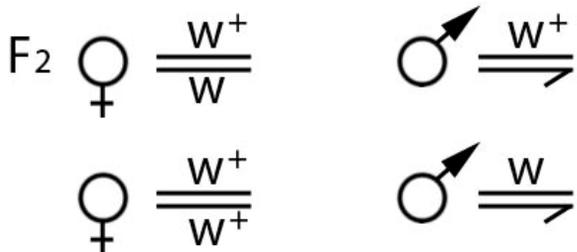


Рис. 24. Генотипические данные особей второго поколения скрещивания дрозофил  
(для задачи 10 к гл. II)

## Глава 3. Молекулярные носители наследственности

### 3.1. Структура ДНК и РНК

Нуклеиновые кислоты – полимерные (состоящие из повторяющихся единиц) химические вещества, содержащие информацию о структуре белковых молекул (кодирующие последовательности ДНК и матричная РНК), управлении их синтезом (регуляторные последовательности ДНК и сигнальные последовательности РНК) или выполняющие самостоятельные функции, так или иначе связанные с передачей наследственной информации (рибосомная РНК, транспортная РНК, малая ядерная РНК, малая интерферирующая РНК).

ДНК и РНК состоят из нуклеотидов – фосфорных эфиров нуклеозидов (связанных с сахаром – дезоксирибозой или рибозой азотистых оснований) аденозина (А), гуанидина (Г), тимидина (Т), уридина (У) и цитидина (Ц). Азотистые основания – гетероциклические органические соединения, производные пурина – аденин и гуанин, или пиримидина – тимин, урацил, цитозин. Комплементарность (образование связей между взаимодополняющими фрагментами молекул) пар АТ (АУ) и ГЦ обеспечивается наличием двух или трех водородных связей соответственно. В одной цепи нуклеотиды связаны путем образования 5'–3' сахарофосфатной ковалентной связи (рис. 25). При этом комплементарные цепи ориентированы в противоположных направлениях одна 5'→3', а другая – 3'→5' (они антипараллельны).

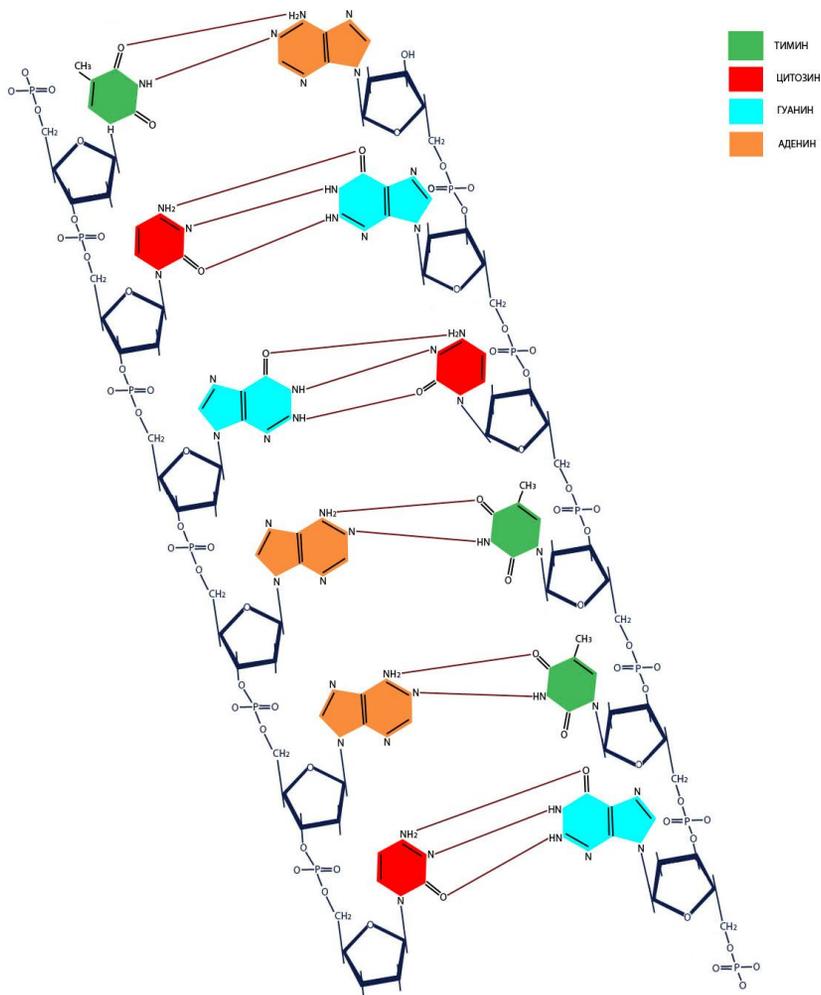


Рис. 25. Первичная структура ДНК

У всех живых существ, кроме некоторых вирусов, молекула ДНК имеет спиральную вторичную структуру, в которой азотистые основания находятся внутри, а сахарофосфатный остов – снаружи (рис. 26).

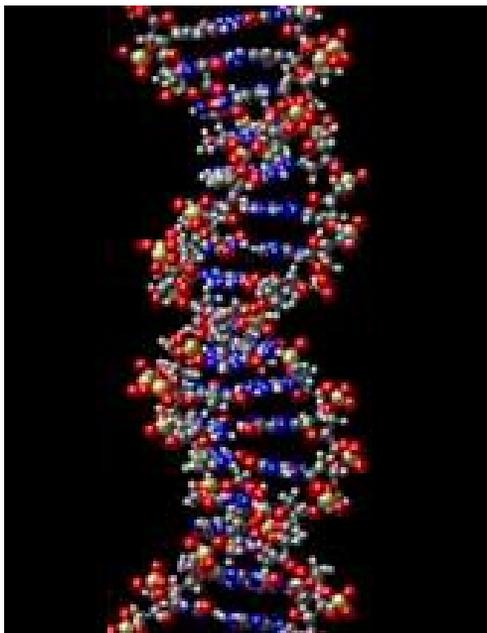


Рис. 26. Вторичная структура ДНК

Из принципа комплементарности (возможности образования пар аденина с тиминном (урацилом) и гуанина с цитозинном) следует правило Чаргаффа:

- количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина – количеству цитозина:  $A=T$ ,  $G=C$ ;
- количество пуринов равно количеству пиримидинов:  $A+G=T+C$ ;
- количество оснований с шестью аминогруппами равно количеству оснований с шестью кетогруппами:  $A+C=G+T$ .

Соотношения АТ- и ГЦ- могут быть различны в разных районах хромосом. Например, у млекопитающих в G<sup>+</sup>-районах превалируют АТ-пары, а в R<sup>+</sup>-районах – ГЦ.

Интересно, что основная «молекула жизни» – ДНК – сама по себе мертва и оживляется только в процессах репликации и транскрипции при помощи особых ферментов – полимераз, которые обеспечивают ее копирование и прочтение.

Существует несколько типов РНК, имеющих различную вторичную и третичную структуры. Наибольшее биологическое значение имеют матричная (информационная) РНК (мРНК), транспортная РНК (тРНК), рибосомная РНК (рРНК), малая ядерная РНК (мяРНК) и малая интерферирующая РНК.

Матричная РНК (мРНК) комплементарна кодирующим последовательностям ДНК и содержит информацию об аминокислотной последовательности своего белкового продукта. Считывание мРНК происходит в процессе трансляции – синтеза белка на основе мРНК. Каждой из 20 канонических (универсальных для живых организмов) аминокислот соответствует набор из трех триплет-нуклеотидов – кодон. Одной аминокислоте может соответствовать два или несколько кодонов – в этом заключается вырожденность генетического кода. Три кодона не кодируют аминокислот, поэтому синтез белка на них останавливается. Это стоп-кодона или нонсенс-кодона: УАГ (амбер), УГА (опал) и УАА (охра). Кроме содержащей кодона (транслируемой) области, зрелая мРНК содержит нетранслируемые области, которые регулируют стабильность молекулы и интенсивность считывания. Молекулы мРНК иногда имеют двуцепочечные участки – шпильки и псевдоузлы, – которые могут участвовать в регуляции трансляции.

Транспортная РНК (тРНК) имеет вторичную структуру, напоминающую лист клевера (рис. 27). На центральной петле находится антикодон – триплет, комплементарный кодону соответствующей данной молекуле тРНК аминокислоты. К противоположному концу молекулы тРНК прикрепляется аминокислота.

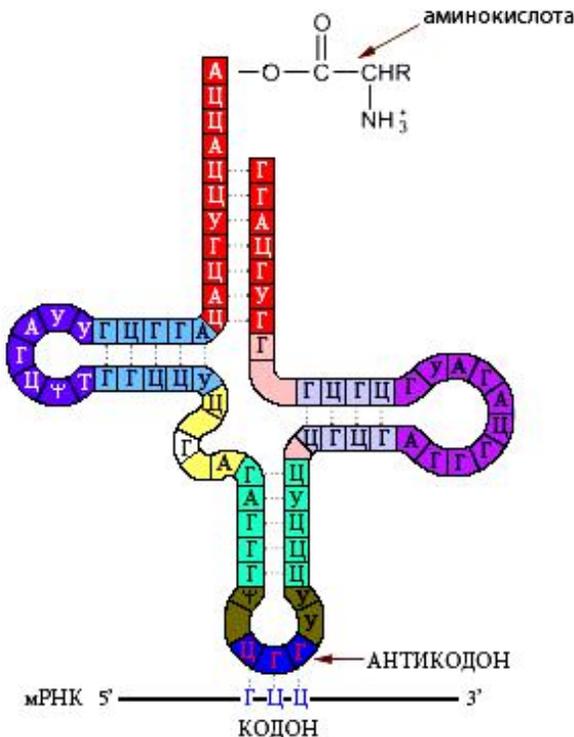


Рис. 27. Транспортная РНК

Рибосомная РНК (рРНК) входит в состав рибосом (рис. 28) и выполняет каталитическую функцию при образовании пептидных связей между аминокислотными остатками в процессе трансляции. Малая частица рибосомы эукариот представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс на основе субъединицы РНК с константой седиментации (скорости осаждения при центрифугировании) 40S (S – единица Сведборга), которая состоит из молекул 18S РНК. Основой большой частицы рибосомы является субъединица 60S, которая состоит из трех молекул рРНК – 28S, 5,8S и 5S. Рибосомная РНК составляет около 70 % от общего количества РНК в клетке. Митохондрии имеют свои особые рибосомы, состоящие из 50S и 30S субъединиц (подобно бактериальным рибосомам).

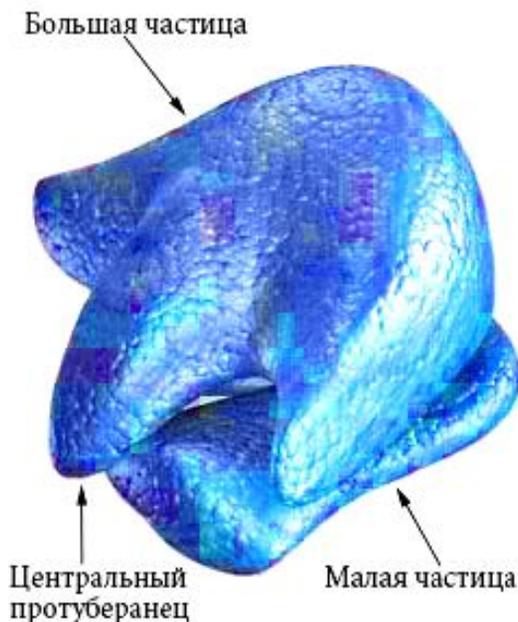


Рис. 28. Схема строения рибосомы\*

Малая ядерная РНК (мяРНК) представлена молекулами длиной 100–300 нуклеотидов с большим содержанием уридина, которые входят в состав мелких рибонуклеопротеиновых гранул ядра. Функция этого типа РНК заключается в участии в созревании молекул мРНК.

Малая интерферирующая РНК представлена короткими (20–25 нуклеотидов) двуцепочечными молекулами, которые, связываясь с отдельными мРНК по принципу комплементарности, могут подавлять синтез определенных белков и приводить соответствующую молекулу мРНК к деградации. В этом заключается явление РНК-интерференции. Особое значение этот тип РНК имеет в онтогенезе – индивидуальном развитии организмов.

---

\* URL:

<http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/zoology/animalphysiology/anatomy/animalcellstructure/Ribosomes/Ribosomes.htm>

### 3.2. Репликация ДНК

Репликация ДНК – это процесс удвоения молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты с образованием идентичных дочерних молекул. У человека репликация происходит в фазе S клеточного цикла. Репликацию ДНК осуществляет фермент ДНК-полимераза.

Для протекания процесса репликации необходимо расплести двойную спираль ДНК, вращать макромолекулу и удерживать ее в расплетенном состоянии. Эти функции выполняют гираза (расплетение спирали), хеликаза (разделение нитей), и ДНК-связывающие белки (удержание). Точность репликации обеспечивается принципом комплементарности пар оснований и свойствами ДНК-полимеразы, благодаря которым этот фермент способен распознать и исправить ошибку. У эукариотических организмов в процессе репликации принимают участие несколько типов ДНК-полимераз. После удвоения происходит суперспирализация синтезированных молекул и дальнейшая компактизация ДНК. Процесс репликации требует затрат энергии.

Ранее существовали три модели механизма репликации ДНК. Согласно консервативному механизму в результате репликации одна молекула ДНК состоит только из родительских цепей, а другая – только из дочерних цепей. Дисперсионная модель предполагала, что все получившиеся в результате репликации молекулы ДНК состоят из цепей, одни участки которых вновь синтезированы, а другие взяты из родительской молекулы ДНК. Полуконсервативный механизм репликации заключается в том, что каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Полуконсервативный механизм был доказан в 1958 г. опытами М. Мезельсона и Ф. Сталя.

Поскольку ДНК-полимераза не умеет начинать синтез новой нити на одонитевой матрице, а может только прикреплять новые нуклеотиды к уже имеющейся цепи, инициация репликации происходит путем образования

небольшого участка ДНК-РНК при помощи фермента ДНК-праймазы. К 3'-концу РНК-затравки ДНК-полимераза добавляет новые нуклеотиды, а РНКаза Н потом разрушает РНК в гибридных участках. Лигаза сшивает синтезированные фрагменты ДНК (рис. 29).

ДНК-полимераза может вести синтез только в направлении  $5' \rightarrow 3'$ , т. е. присоединять новый нуклеотид к 3'-концу уже синтезированной части. Двунитевая структура ДНК предполагает необходимость синтеза в двух направлениях  $5' \rightarrow 3'$  и  $3' \rightarrow 5'$ . Эта задача решается путем образования Y-образной структуры – репликационной вилки (рис. 29). При этом цепь  $3' \rightarrow 5'$  является лидирующей – синтез на ней идет непрерывно, а цепь  $5' \rightarrow 3'$  – отстающей, поскольку на ней синтез идет в отдельных участках – фрагментах Оказаки, каждый из которых начинается с новой РНК-затравки.

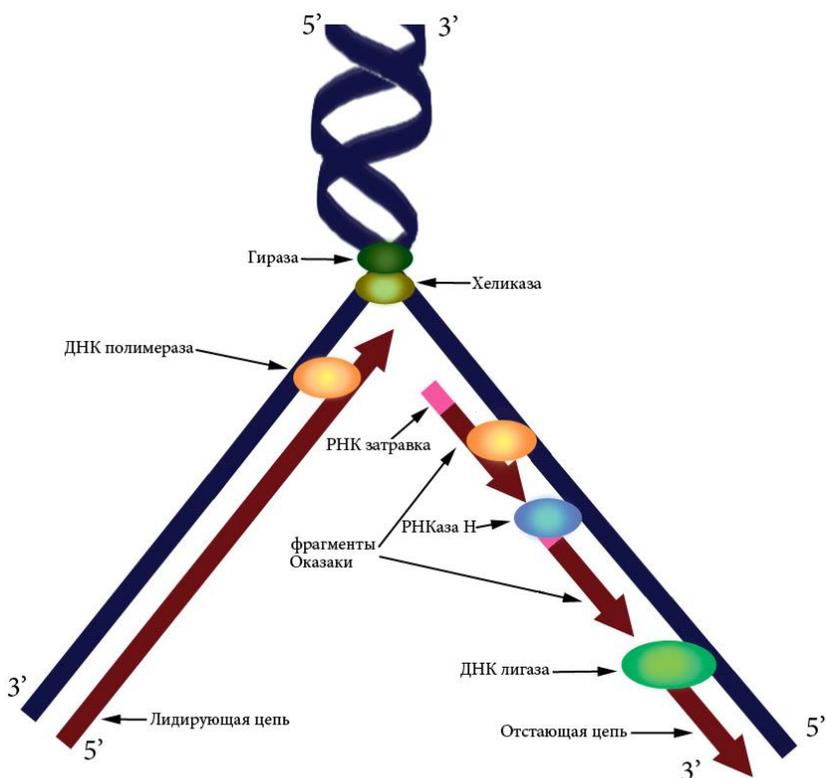


Рис. 29. Схема репликационной вилки

### 3.3. Транскрипция

Транскрипцией называется синтез мРНК на матрице ДНК. Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, т. е. по матричной цепи ДНК ДНК-зависимая РНК-полимераза – фермент, осуществляющий транскрипцию – движется в направлении 3'→5', прикрепляя новый рибонуклеозидтрифосфат к 3'-концу уже синтезированной молекулы РНК.

Инициация транскрипции – сложный процесс, зависящий от последовательности ДНК, находящейся вблизи транскрибируемой последовательности – промотора и от более удаленных от точки начала синтеза участков генома – энхансеров (активирующих транскрипцию) и сайленсеров (дезактивирующих транскрипцию). Во всех этих участках есть сайты связывания транскрипционных факторов – белков, регулирующих процесс транскрипции и входящих в состав транскрипционного комплекса.

При переходе транскрипции от инициации к следующей стадии – элонгации – происходит диссоциация связей между РНК-полимеразой, промотором и факторами инициации транскрипции.

В период элонгации в ДНК расплетено примерно 18 пар нуклеотидов. Примерно 12 нуклеотидов матричной нити ДНК образует гибридную спираль с растущей цепью РНК. По мере движения РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расплетание двухцепочечной молекулы ДНК, а позади фермента двойная спираль ДНК восстанавливается. В этот момент из комплекса освобождается очередное звено растущей цепи РНК с матрицей и РНК-полимеразой. Все эти перемещения подразумевают относительное вращение РНК-полимеразы и ДНК. Поэтому для предотвращения такого вращения двигающуюся по ДНК РНК-полимеразу сопровождают топоизомеразы. На стадии элонгации в процессе транскрипции немаловажную роль играют также основные элонгирующие факторы, которые необходимы для предотвращения преждевременной терминации матричного процесса.

Следующая фаза процесса транскрипции называется терминацией. В этот момент растущий транскрипт освобождается и происходит диссоциация РНК-полимеразы и ДНК-матрицы. После завершения стадии терминации транскрипции происходит разрезание РНК, а затем к её 3' концу с помощью фермента полиА-полимеразы добавляется 100–200 оснований аденина, которые оказывают влияние на стабильность полученного транскрипта.

### *3.4. Процессинг РНК*

Созревание мРНК называется процессингом. Биологическое значение процессинга в эукариотической клетке заключается в возможности получения различных комбинаций экзонов гена, а значит, получения большего разнообразия белков, кодируемых одной нуклеотидной последовательностью ДНК. Кроме того модификация 3'- и 5'-концов мРНК служит для регуляции ее экспорта из ядра, поддержания стабильности в цитоплазме и для улучшения взаимодействия с рибосомами.

Еще до завершения транскрипции происходит полиаденилирование 3'-конца (раздел 6.3). К 5'-концу мРНК посредством трифосфатного моста присоединяется 7-метилгуанозин, соединяющийся в необычной позиции 5'→5', и происходит метилирование рибоз двух первых нуклеотидов. Этот процесс называется кэпированием.

Процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК, называется сплайсингом. В ходе сплайсинга из мРНК участки, не кодирующие белок (интроны), удаляются, а экзоны – участки, кодирующие аминокислотную последовательность, соединяются друг с другом, и незрелая пре-мРНК превращается в зрелую мРНК, с которой синтезируются (транслируются) белки клетки.

Для сплайсинга необходимо наличие специальных 3'- и 5'- последовательностей. Сплайсинг катализируется состоящим из РНК и белков большим комплексом, который называется сплайсосомой. Сплайсосома включает пять малых ядерных рибонуклеопротеидов (мяРНП) – U1, U2, U4, U5 и U6. РНК, входящая в состав мяРНП, взаимодействует с интроном и, возможно, участвует в катализе. Она принимает участие в сплайсинге интронов, содержащих в 5' сайте ГУ, и АГ в 3' сплайсинг-сайте.

Иногда мРНК в процессе созревания могут подвергаться альтернативному сплайсингу, который заключается в том, что имеющиеся в составе пре-мРНК интроны вырезаются в разных альтернативных комбинациях, при которых вырезаются и некоторые экзоны. Некоторые из продуктов альтернативного сплайсинга пре-мРНК нефункциональны, как например, при определении пола у плодовой мушки дрозофилы, однако часто в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК одного гена образуются многочисленные мРНК и их белковые продукты.

В настоящее время известно, что у человека 94 % генов подвержено альтернативному сплайсингу (остальные 6 % генов не содержат интронов). Альтернативный сплайсинг у многоклеточных эукариот является ключевым механизмом увеличения разнообразия белков, не создавая избыточных копий гена, а также позволяет осуществлять тканеспецифическую и стадийспецифическую регуляцию экспрессии (проявления) генов.

### *3.5. Трансляция*

Синтез белковых молекул из аминокислот на матрице мРНК при участии рибосом и тРНК называется трансляцией. Процесс происходит в цитоплазме на полисомах – комплексах, состоящих из мРНК и многих рибосом с прикрепленными молекулами тРНК (рис. 30).

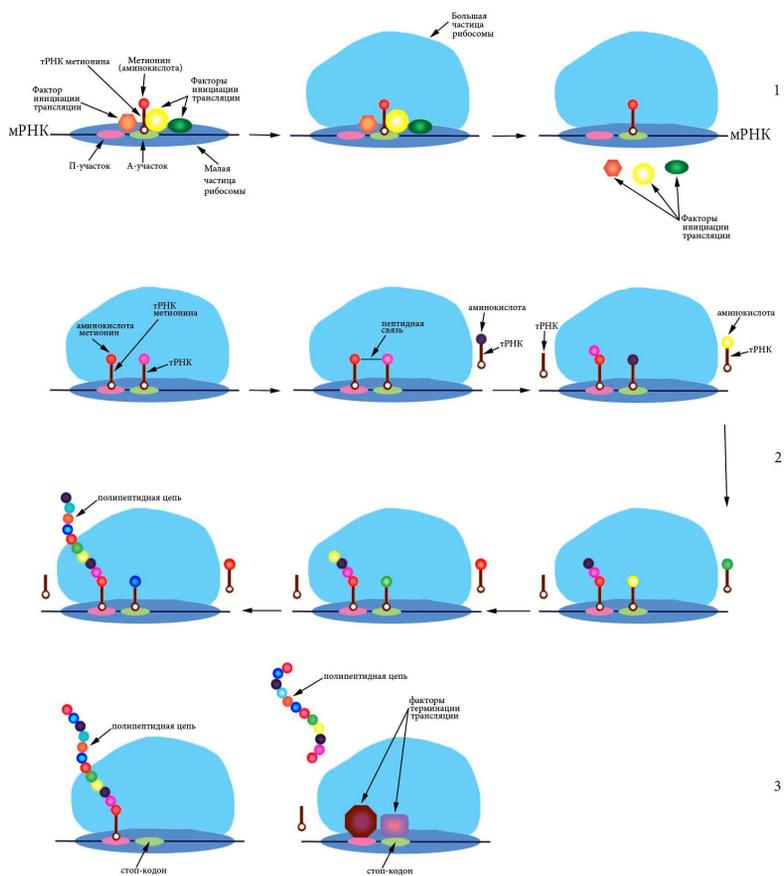


Рис. 30. Схема трансляции: 1 – инициация, 2 – элонгация, 3 – терминация

Процесс состоит из инициации (узнавания рибосомой стартового кодона и начала синтеза), элонгации (синтеза белка) и терминации (узнавания стоп-кодона и отделения белкового продукта).

Поскольку каждый кодон состоит из трех нуклеотидов, каждая последовательность может быть прочитана трояко – начиная с первого, второго либо третьего нуклеотида, иными словами, имеется три возможных рамки считывания. Стартовым кодоном почти всегда является АУГ. Рамки считывания, начинающиеся с этого кодона, называются открытыми. Для инициации рибосома сканирует мРНК, пока не найдет кодон АУГ. Обычно она воспринимает только те стартовые кодоны,

которые находятся вблизи 5'-кэпа. Специальные белки – факторы инициации трансляции – участвуют в узнавании стартового кодона и присоединении инициаторной тРНК, содержащей антикодон УАЦ, соответствующий аминокислоте метионин. К этой тРНК метионин присоединен при помощи фермента аминоацил-тРНК-синтетазы. Вначале малая частица рибосомы (сама или в комплексе с тРНК) садится на мРНК, а затем к ней присоединяется большая частица, и происходит отсоединение факторов инициации трансляции. Собранный рибосома начинает элонгировать цепь. В ходе элонгации один белковый фактор переносит тРНК в аминокцильный центр рибосомы (А-центр), а после формирования пептидной связи в петицильном центре (П-центре) второй фактор элонгации катализирует смещение рибосомы на один триплет (рис. 30). Когда рибосома доходит до одного из нонсенс-кодонов – УАГ (амбер), УГА (опал) или УАА (охра) – подходящей тРНК не обретается и новая пептидная связь не образуется. Под действием специальных белковых факторов происходит отделение рибосомы от мРНК и освобождение готовой белковой молекулы.

### ***Контрольные вопросы и задания***

1. Установите соответствие между понятиями, содержащимися в следующих столбцах. Для этого рядом с цифрой первого столбца поставьте букву соответствующего понятия из второго столбца.

- |               |                 |
|---------------|-----------------|
| 1) нуклеотид  | а) ДНК          |
| 2) репликация | б) сплайсинг    |
| 3) интрон     | в) РНК-затравка |

2. Завершите фразу, выбрав правильное суждение из перечисленных вариантов:

Транскрипция – это...

- а) изменение числа хромосом, кратное гаплоидному;
- б) мутация замены одного нуклеотида другим в составе ДНК;

в) процесс синтеза информационной РНК на матрице ДНК;

г) один из видов взаимодействия неаллельных генов.

3. Определите правильность следующей фразы:

Интроны – это нетранслируемые участки мРНК, которые вырезаются при ее созревании.

4. Установите соответствие между понятиями, содержащимися в следующих столбцах. Для этого рядом с цифрой первого столбца поставьте букву соответствующего понятия из второго столбца.

1) трансляция

а) доминирование

2) фрагмент Оказаки

б) рибосома

3) аллель

в) репликационная вилка

5. Исключите лишнее понятие в приведенном ряду.

Укажите обобщающее слово данного ряда:

РНК-полимераза, репликация, ДНК-полимераза, фрагменты Оказаки, топоизомераза, рибосома.

6. Установите соответствие между понятиями, содержащимися в следующих столбцах. Для этого рядом с цифрой первого столбца поставьте букву соответствующего понятия из второго столбца.

1) рибосома

а) лидирующая цепь

2) промотор

б) белок

3) репликация

в) транскрипция

7. Продолжите фразу:

В состав ДНК входят следующие нуклеотиды....

8. Закончите фразу:

Рибосомы участвуют в процессе...

## Глава 4. Основы цитогенетики

Цитогенетика – наука о связи внутриклеточных структур и наследственности. Она находится на стыке генетики (науки о наследственности и изменчивости) и цитологии (науки о клетке).

### 4.1. Внутриклеточные носители наследственной информации – ядро, митохондрии и пластиды

Ядро (лат. *nucleus*) – органелла эукариотической клетки, содержащая молекулы ДНК, которые несут генетическую информацию. В ядре происходят важнейшие для жизни процессы: репликация – удвоение молекул ДНК, а также транскрипция – синтез молекул РНК на молекуле ДНК. Здесь же синтезированные молекулы РНК подвергаются ряду модификаций и только после этого выходят в цитоплазму. В особых структурах внутри ядра – ядрышках – происходит образование субъединиц рибосом.

Ядро отделено от цитоплазмы ядерной оболочкой, образованной за счёт расширения и слияния друг с другом цистерн эндоплазматической сети таким образом, что у ядра образовались двойные стенки за счёт окружающих его узких компартментов. Полость ядерной оболочки называется люменом или перинуклеарным пространством. Внутренняя поверхность оболочки ядра подстилается ядерной ламиной – жёсткой белковой структурой, образованной белками-ламинами, к которой прикреплены нити хромосомной ДНК. Ламины прикрепляются к внутренней мембране ядерной оболочки при помощи заякоренных в ней трансмембранных белков – рецепторов ламинов. В местах слияния внутренней и внешней мембран ядерной оболочки образуются так называемые ядерные поры, через которые происходит обмен веществ между ядром и цитоплазмой. Пора не является дыркой в ядре. Это сложная структура, организованная несколькими десятками особых белков – нуклеопоринов. С помощью электронной микроскопии было установлено, что ядерная пора

представляет собой структуру, состоящую из восьми связанных друг с другом белковых гранул с внешней, и восьми – с внутренней стороны ядерной оболочки.

Ядрышко – структура, находящаяся внутри ядра, не имеющая собственной мембранной оболочки, однако хорошо различима как под световым, так и под электронным микроскопом. Основная функция ядрышка – синтез рибосом. В хромосомах имеются так называемые ядрышковые организаторы – специальные участки, содержащие гены рибосомной РНК (рРНК), вокруг которых и формируются ядрышки. В ядрышке полимераза I синтезирует рРНК. После созревания этой РНК происходит сборка рибосомных субчастиц. В ядрышке локализируются белки, принимающие участие в этих процессах. Для некоторых из этих белков характерно наличие особой аминокислотной последовательности – сигнала ядрышковой локализации. Следует отметить, что в ядрышке локализуется около 600 видов различных белков. Это самая высокая концентрация белка в клетке. Считается, что для осуществления функций ядрышка необходима лишь небольшая часть этих белков, а остальные попадают туда неспецифически.

Применение методов электронной микроскопии позволило выделить в ядрышке несколько субкомпарментов: так называемые фибриллярные центры, окруженные участками плотного фибриллярного компонента, где и происходит синтез рРНК, и гранулярные компоненты, которые располагаются снаружи от плотного фибриллярного компонента и представляют собой скопление созревающих рибосомных субчастиц.

При делении клеток отдельные молекулы ДНК подвергаются компактизации, становятся различными хромосомами – нуклеопротеиновые комплексы, состоящие из двух хроматид, соединенных центромерой – первичной перетяжкой (рис. 31). Поскольку хроматиды являются результатом репликации (удвоения) одной молекулы ДНК, их называют сестринскими. Каждая хроматида разделена центромерой на две части –

плечи. Обычно плечи хромосом не равны по длине, выделяют короткое (обозначается латинской буквой р) и длинное плечо (обозначается буквой q). Отношение длины короткого плеча к длине всей хромосомы, называют центромерным индексом. Различают метацентрические хромосомы (центромерный индекс 0,35–0,50), субметацентрические (0,25–0,35) и аacroцентрические ( $< 0,25$ ). Концевые районы хромосом называются теломеры.

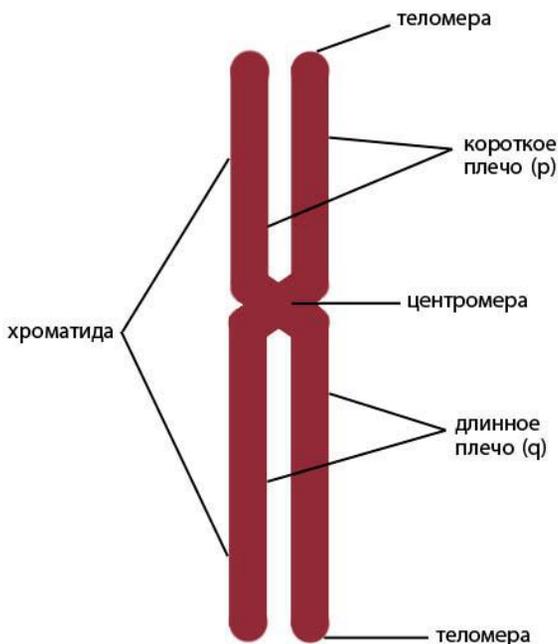


Рис. 31. Схематическое изображение хромосомы

Митохондрии – органеллы, имеющиеся в цитоплазме многих эукариотических клеток. Именно в митохондриях происходит синтез АТФ – основного источника химической энергии клетки. Эффективность работы митохондрий очень высока. На фотографиях митохондрий видно обилие внутренних мембран (рис. 32). Количество и форма митохондрий сильно различаются в разных тканях и зависят от интенсивности обмена веществ. Например, в одной клетке печени млекопитающих может быть 1000–1500 митохондрий.



Рис. 32. Электронная микрофотография среза митохондрии\*

Оболочка митохондрий состоит из двух мембран, между которыми имеется межмембранное пространство. Пространство, ограниченное внутренней мембраной, называется матриксом. В матриксе располагаются митохондриальные ДНК, РНК и рибосомы, содержатся ферменты, участвующие в цикле Кребса, протекают реакции окисления жирных кислот. Внутренняя мембрана образует многочисленные гребневидные складки – кристы, существенно увеличивающие площадь ее поверхности. На обращенной к матриксу стороне внутренней мембраны митохондрий локализуются особые молекулы АТФ-синтазы, состоящие из головки, ножки и основания. При прохождении через них протонов происходит синтез АТФ. В основании частиц, заполняя собой всю толщу мембраны, располагаются компоненты дыхательной цепи. Наружная мембрана митохондрий имеет маленькие отверстия, образованные специальными белками, через которые могут проникать небольшие молекулы и ионы. Внутренняя мембрана таких отверстий не имеет. В местах соприкосновения наружной и внутренней мембран находится специальный белок-рецептор, способствующий транспорту митохондриальных белков, закодированных в ядре, в матрикс митохондрии.

\* URL: <http://fusionanomaly.net/mitochondria.html>

Митохондриальный геном человека представлен кольцевой молекулой ДНК длиной 16569 п.н. (пар нуклеотидов), которая содержит 37 генов (13 из них кодируют белки, функционально связанные с энергетическим обменом, 22 – транспортные РНК и 2 – рибосомальную РНК) (рис. 33). ДНК митохондрий наследуется исключительно по материнской линии. В митохондриальной ДНК наблюдается высокая частота мутаций. Мутации митохондриальной ДНК являются причиной целого ряда наследственных заболеваний человека, обычно связанных с тяжелыми нарушениями обмена веществ.

Интересно, что геном митохондрий растений значительно больше, чем у животных. Он может достигать 370 т.п.н., и число генов там примерно в семь раз превосходит таковое у человека, что объясняется существованием в митохондриях растений дополнительных путей электронного транспорта, не сопряжённых с синтезом АТФ.

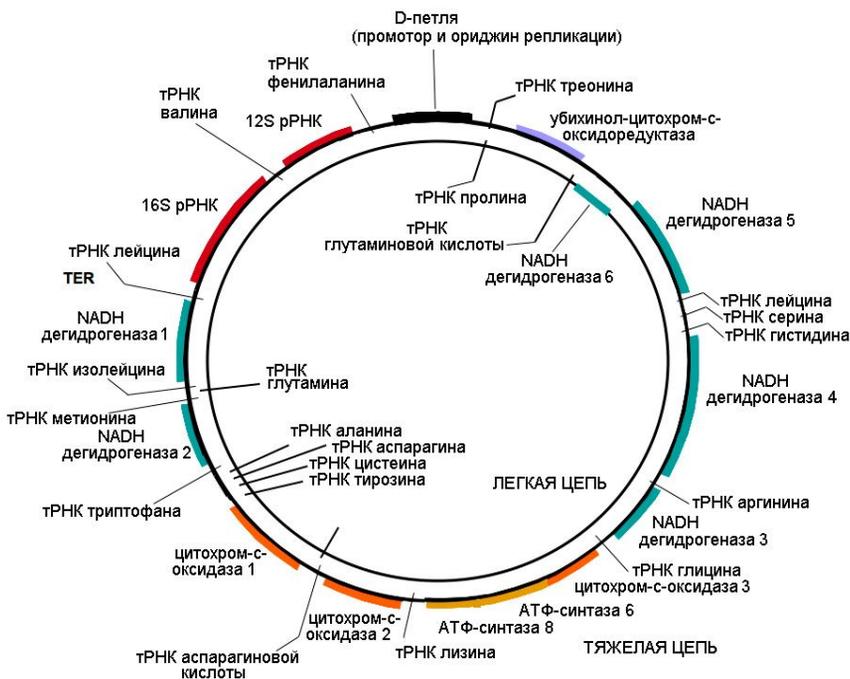


Рис. 33. Митохондриальная ДНК человека

У фотосинтезирующих организмов имеются специальные органоиды – пластиды, которые покрыты двойной мембраной и имеют в своём составе множество копий кольцевой ДНК. Совокупность пластид клетки образует пластидом. Существует три наиболее распространенных типа пластид:

1. Хлоропласты – пластиды, которые содержат хлорофиллы – пигменты, необходимые для фотосинтеза. Они, как правило, имеют зелёную окраску (рис. 34).

2. Хромопласты – окрашенные в жёлтый, красный или оранжевый цвет пластиды. Их окраска определяется накоплением каротиноидов – жёлтых, оранжевых и красноватых пигментов. Хромопласты определяют окраску осенних листьев, лепестков цветов, корнеплодов, созревших плодов. Обычно такие пластиды происходят из хлоропластов при потере ими хлорофилла.

3. Лейкопласты – неокрашенные пластиды, которые обычно выполняют запасную функцию и образуются преимущественно в запасных тканях – клубнях, корневищах. У высших растений под действием света они могут превращаться в хлоропласты или хромопласты.

Пластидная ДНК имеет кольцевую форму, ее длина варьирует в широких пределах (обычно 100–200 т.п.н.). К пластидному геному обычно относятся: гены тРНК, рРНК, часть генов, кодирующих белковые компоненты системы фотосинтеза и белков электрон-транспортной системы (рис. 35).

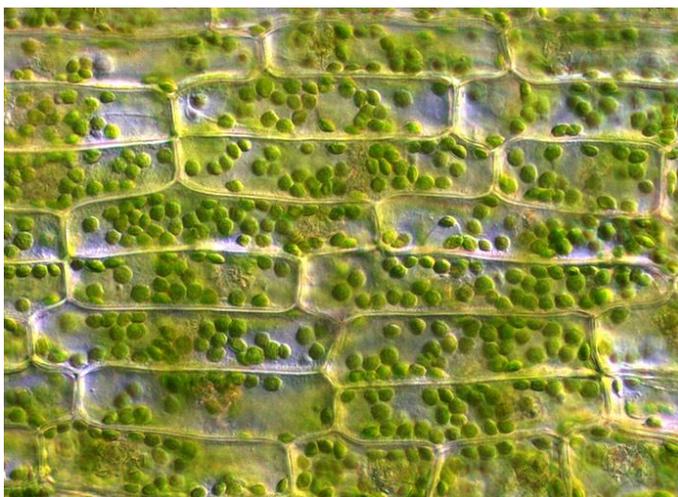


Рис. 34. Хлоропласты в клетках водоросли\*

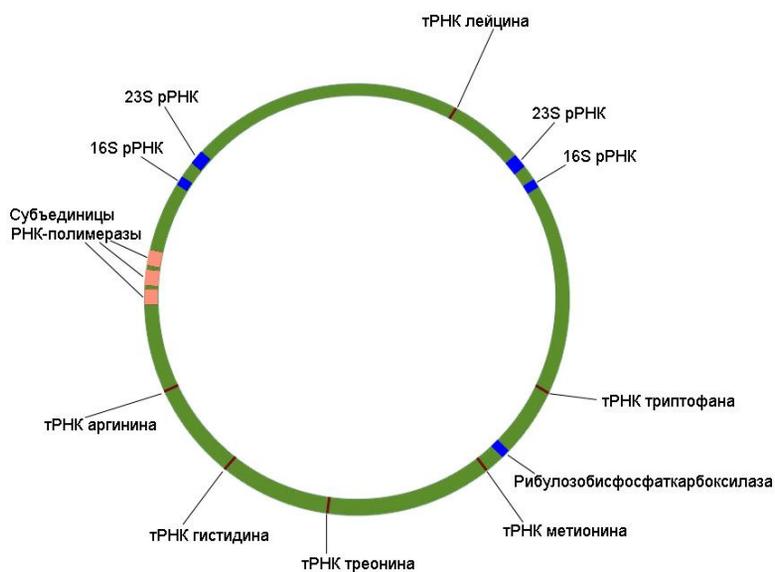


Рис. 35. Пластидная ДНК длиной 121 т.п.н.  
печеночника *Marchantia polymorpha*

\* URL: <http://shutov-sparkle.livejournal.com/397336.html>

## 4.2. Митоз, мейоз и особенности созревания половых клеток человека

Для большинства нормальных клеток эукариотических организмов характерно деление путем митоза – упорядоченного расхождения хроматид к полюсам клетки при помощи веретена деления с последующим формированием генетически идентичных дочерних клеток. Клеточный цикл состоит из интерфазы – периода между двумя клеточными делениями – и митоза (рис. 36). Интерфаза включает фазу  $G_1$  – синтез белка, предшествующий удвоению ДНК, фазу S – репликация (удвоение) ДНК и фазу  $G_2$  – пострепликационный синтез белка. Иногда клетки переходят в фазу  $G_0$  – пролиферативного покоя, когда окончательно специализированные клетки перестают делиться. На стадии S часто происходят сестринские хроматидные обмены (СХО, рис. 37), частота которых зависит от влияния внешних факторов на клетку. Специальные методы окрашивания позволяют выявлять СХО. Повышенная частота СХО служит индикатором вредных влияний на клетки.

Митоз включает следующие стадии:

I – *профаза*. Конденсация хроматина приводит тому, что хромосомы становятся видимыми, сестринские хроматиды тесно прилежат друг к другу. Ядрышко исчезает, кариолема (оболочка ядра) растворяется, формируется веретено деления;

II – *метафаза*. Хромосомы располагаются в экваториальной плоскости клетки. К центромерам прикреплены нити акроматинового веретена, другие концы которых закреплены в центриолях на полюсах клетки. Хроматиды начинают отделяться одна от другой, оставаясь соединенными только в центромерах. Центромеры разъединяются, и сестринские хроматиды начинают расхождение к полюсам клетки;

III – *анафаза*. Сестринские хроматиды расходятся к полюсам клетки;

IV – *телофаза*. Происходит деконденсация хроматина, формируются дочерние ядра, веретено деления дезинтегрируется, появляется перетяжка между дочерними клетками.

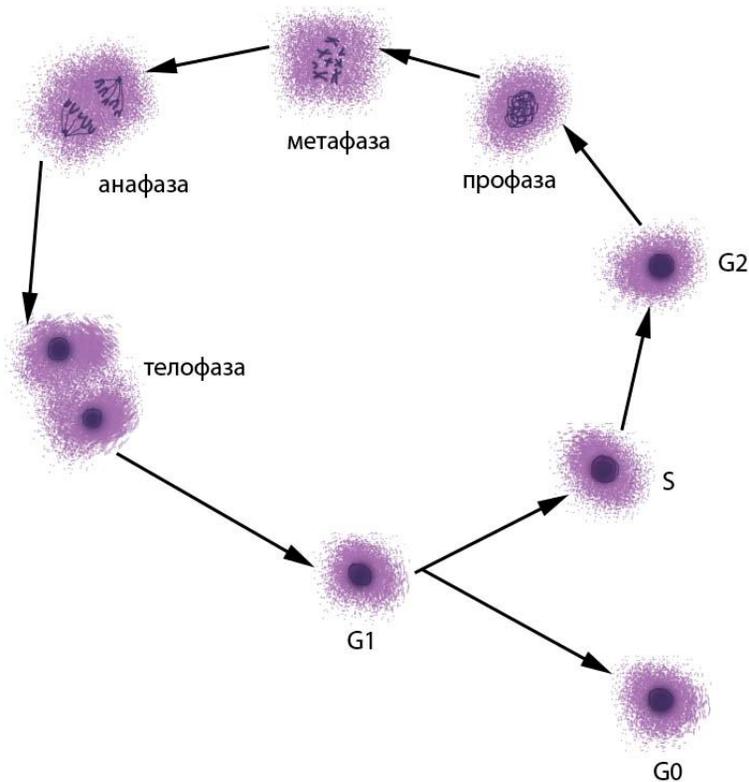
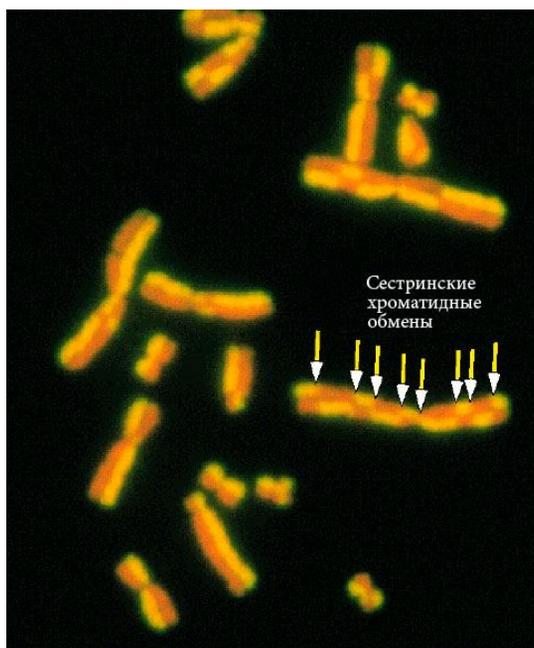
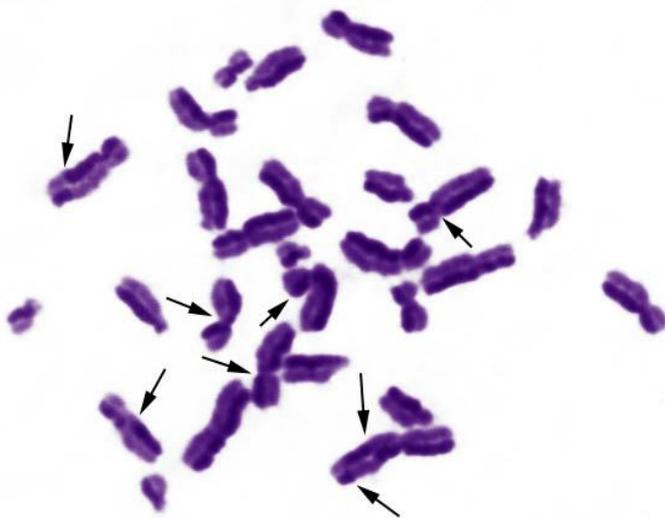


Рис. 36. Стадии клеточного цикла

Хромосомы лучше всего видны на стадии метафазы, поэтому основным методом цитогенетики является метафазный анализ. Для того чтобы накопить достаточное количество клеток на стадии метафазы, используют колхицин – вещество, которое растворяет трубочки ахроматинового веретена, препятствуя агрегации молекул тубулина, из которого состоят микротрубочки.



А.



Б.

Рис. 37. Сестринские хроматидные обмены:  
 А. Флуоресцентный вариант\*  
 Б. Нефлуоресцентный вариант (фото Е.Г. Нероновой)

\* URL: [http://www.crios.be/genotoxicitytests/sister\\_chromatid\\_exchange\\_test.htm](http://www.crios.be/genotoxicitytests/sister_chromatid_exchange_test.htm)

С точки зрения передачи наследственной информации все клетки можно подразделить на два типа – генеративные (половые), т. е. те, которые участвуют в формировании гено-типа потомков, и соматические (от лат. *soma* – тело), гены которых не передаются потомкам. Если для соматических клеток характерно митотическое деление, то для формирования половых клеток (гамет) необходим мейоз. Мейоз (от греческого *meiosis* – уменьшение) – это тип деления клетки, при котором число хромосом уменьшается вдвое – каждая дочерняя клетка получает по гаплоидному набору хромосом, т. е. набору, где каждая хромосома представлена одним гомологом из двух, пришедших от каждого из родителей индивидуума. Гаплоидное число хромосом обозначается  $n$ , у человека  $n = 23$ . Такое число хромосом имеют яйцеклетки и сперматозоиды. Соматические клетки содержат диплоидное число хромосом  $2n = 46$ . Биологическое значение мейоза заключается (1) в формировании гаплоидных клеток, которые при слиянии могут дать начало диплоидному организму и (2) в рекомбинации хромосом – кроссинговер происходит в профазе I, а в анафазе I гомологичные хромосомы случайным образом расходятся к полюсам клетки, что служит для увеличения генетического разнообразия организмов.

Мейоз включает два деления – редукционное, когда вдвое уменьшается число хромосом, и эквационное – обычный митоз, когда вдвое уменьшается число хроматид (рис. 38). Редукционное деление (деление I) включает профазу I, метафазу I, анафазу I и телофазу I. В профазе I выделяют следующие стадии:

- лептотена (стадия тонких нитей). Становятся видимыми длинные хромосомные нити;
- зиготена. Начинается спаривание (конъюгация) гомологичных хромосом. Образуются биваленты – спаренные гомологичные хромосомы. Каждый бивалент состоит из четырех хроматид. Половой бивалент резко отличается от других – X- и Y-хромосомы соединены торцами. Формируются синаптонемальные комплексы – характерные структуры в местах контактов хроматид, имеющие двухслойное строение;

- пахитена. Происходит дальнейшая конденсация хромосом;
- диплотена. Распадаются синаптонемальные комплексы. Происходит разделение несестринских хроматид, которые остаются связанными друг с другом в отдельных точках, где образуются X-образные структуры – хиазмы;
- диакинез. Происходит терминализация хиазм – хиазмы сдвигаются к теломерам. Происходит полное разделение гомологичных хромосом.

В конце метафазы I гомологичные хромосомы начинают расхождение к полюсам клетки. Анафаза I и телофаза I проходят аналогично анафазе и телофазе обычного митотического деления.

Эквационное деление является обычным митотическим делением гаплоидной клетки. Оно включает профазу II, метафазу II, анафазу II и телофазу II.

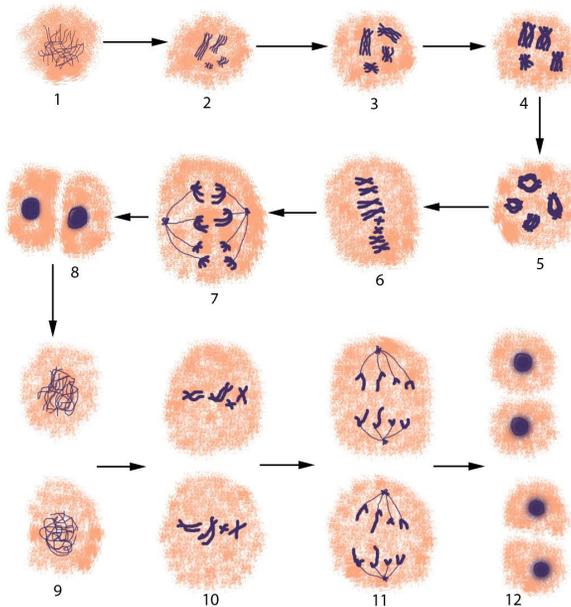


Рис. 38. Обобщенная схема мейотического деления:

1–5 – профазы I, 1 – лептотена, 2 – зиготена, 3 – пахитена, 4 – диплотена, 5 – диакинез, 6 – метафаза I, 7 – анафаза I, 8 – телофаза I, 9 – профазы II, 10 – метафаза II, 11 – анафаза II, 12 – телофаза II

У человека формирование мужских половых клеток – сперматозоидов и женских – яйцеклеток имеет существенные биологические особенности (рис. 39, 40).

Начиная с момента полового созревания (в постпубертатный период) сперматогенез у мужчин происходит постоянно. В семенниках сперматоциты – клетки-предшественники сперматозоидов подвергаются мейотическому делению. Из одного сперматоцита получается четыре сперматозоида, каждый из которых содержит плотно упакованный гаплоидный набор хромосом и митохондрию, которая служит для выработки энергии для жгутика. Жгутик позволяет сперматозоиду быстро передвигаться в жидкой среде. Следует отметить, что от зачатия до начала мейоза в семенниках клетки-предшественники сперматозоидов проходят большое число митотических делений, в ходе которых могут накапливаться мутации. В этом проявляется эволюционная роль мужского пола как носителя наследственной изменчивости. Так, при сравнении последовательностей ДНК хромосом шимпанзе и человека выяснилось, что быстрее всего накапливаются замены нуклеотидов именно в Y-хромосоме, что служит прекрасной иллюстрацией этого положения.

Эволюционная роль женского пола как хранителя уже устоявшихся наследственных изменений, как правило, имеющих адаптивную (приспособительную) ценность, выражается и в особенностях созревания яйцеклеток. Мейоз начинается в яичниках девочек на третьем месяце внутриутробного развития, когда с момента оплодотворения прошло не так много митотических делений и еще не успели накопиться мутации. До седьмого месяца делящиеся клетки находятся в стадии лептотены и зиготены. От седьмого месяца до рождения успевают пройти пахитены и диплотены, затем мейоз останавливается, образуются кариолемма и ядрышко. Эта особая стадия – диктиотена – продолжается до первой овуляции. При рождении у девочки имеется около  $2,6 \times 10^6$  ооцитов, из которых большинство (около 90 %) дегенерирует. За всю жизнь женщины только около 400 ооцитов созревают

полностью. В яичнике каждый ооцит окружен слоем эпителиальных клеток и двумя слоями соединительной ткани – эта структура называется фолликул. В постпубертантный период (в среднем с 12 лет) в первой половине цикла под действием лютеинизирующего гормона начинается диакинез. В ходе редукционного деления образуется первое полярное тельце. Первое полярное тельце, как правило, позднее проходит эквационное деление. Далее мейоз проходит до метафазы II и останавливается до встречи яйцеклетки со сперматозоидом в фаллопиевой трубе. Проникновение сперматозоида стимулирует расхождение хроматид, формирование ядерной мембраны, женского пронуклеуса и второго полярного тельца. Из хроматина сперматозоида образуется мужской пронуклеус, который через несколько часов сливается с женским пронуклеусом, образуя зиготу – оплодотворенную яйцеклетку. Путем дробления зиготы образуется эмбрион.

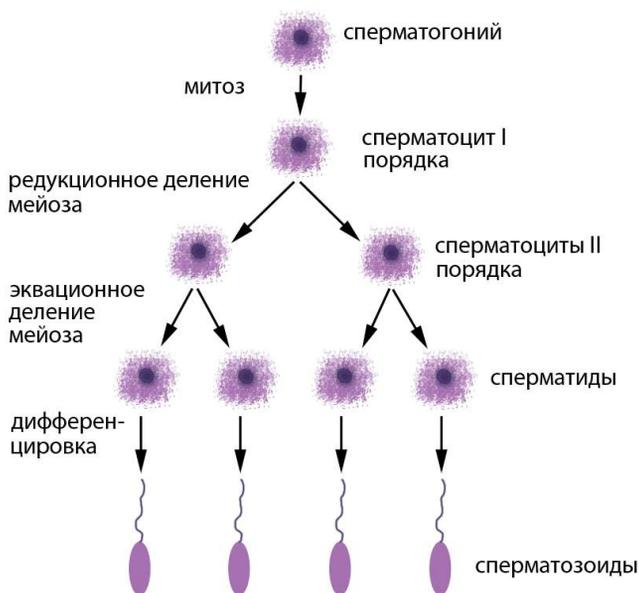


Рис. 39. Сперматогенез человека: сперматогонии – предшественники сперматоцитов, способные к митотическому делению; сперматоциты I порядка – диплоидные продукты митотического деления сперматогониев; сперматоциты II порядка – гаплоидные продукты редукционного деления сперматоцитов I порядка; сперматиды – гаплоидные продукты эквационного деления сперматоцитов II порядка

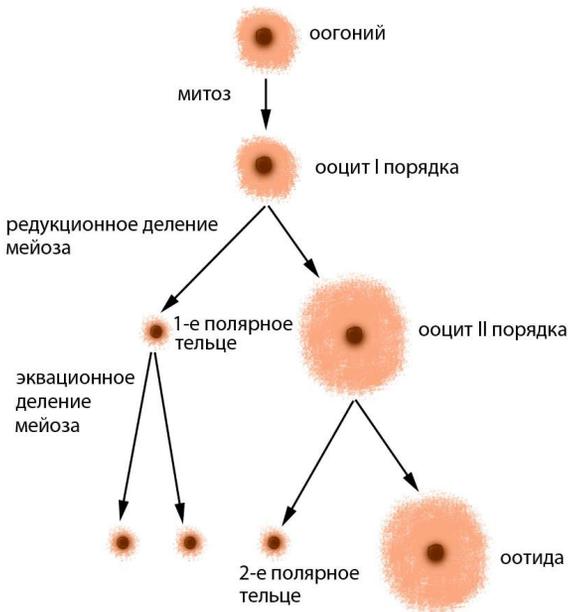


Рис. 40. Оогенез человека: оогонии – предшественники ооцитов, способные к митотическому делению; ооциты I порядка – диплоидные продукты митотического деления оогониев; ооциты II порядка – гаплоидные продукты редукционного деления ооцитов I порядка; оотида – крупная яйцеклетка, возникшая при эквационном делении ооцита II порядка

### 4.3. Структурно-функциональная организация хромосом

Хроматин – это вещество, из которого состоят хромосомы эукариотических клеток, представляющее собой комплекс ДНК, РНК и белков. Именно в составе хроматина происходит реализация генетической информации, а также репликация и репарация ДНК.

Основную массу хроматина составляют белки гистоны, которые ответственны не только за укладку ДНК, но выполняют и регуляторную функцию. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 образуют нуклеосомы – особые структуры шайбовидной формы высотой 6 нанометров и 11 нанометров в диаметре, участвующие в самом первом этапе упаковки ДНК в хромосомы (рис. 41). В состав каждой нуклеосомы входит по две молеку-

лы каждого из указанных видов гистонов (всего восемь молекул, такие комплексы называют октамерами). Из-за того что нуклеосомы располагаются более или менее регулярно, образующаяся структура напоминает бусы (рис. 42). Наиболее крупный из всех гистонов – гистон Н1 – связывается с ДНК на участке между нуклеосомами (рис. 41). Компактизация и декомпактизация хроматина на уровне нуклеонемы (нуклеосомной нити) регулируется гистоном Н1. При репликации – удвоении нити ДНК – нуклеосомы не распадаются, а переходят на одну из дочерних нитей случайным образом. Недостающие октамеры синтезируются заново. Самый первый уровень укладки хромосом – нуклеонемный – обеспечивает компактизацию ДНК в шесть–семь раз.

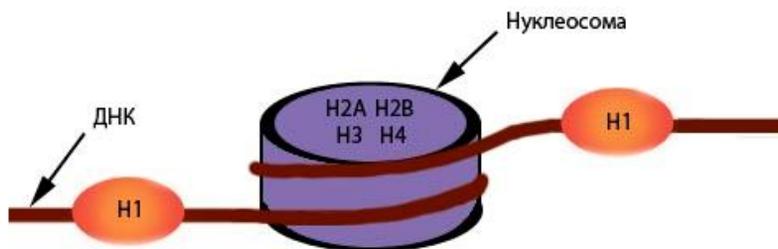


Рис. 41. Схема нуклеосомной организации хроматина.

Взаимное пространственное расположение гистонов H2A, H2B, H3 и H4 не отражено



Рис. 42. Нуклеосомная нить – нуклеонема

Нить ДНК с нуклеосомами образует структуру толщиной около 30 нанометров, так называемую 30 нм фибриллу (рис. 43). Ее можно увидеть на препаратах выделенного хроматина. Удаление даже некоторой части молекул гистона Н1 приводит к распадению фибриллы до толщины 10 нанометров, что соответствует примерной толщине нук-

леосомы. Это свидетельствует о том, что гистон H1 играет ключевую роль во взаимодействии между нуклеосомами. На уровне фибриллы 30 нанометров достигается примерно сорокакратная компактизация ДНК. На таком уровне спирализации существенно снижается способность ДНК связываться с белками, участвующими в транскрипции, что приводит к уменьшению генетической активности упакованных в фибриллу 30 нанометров участков.

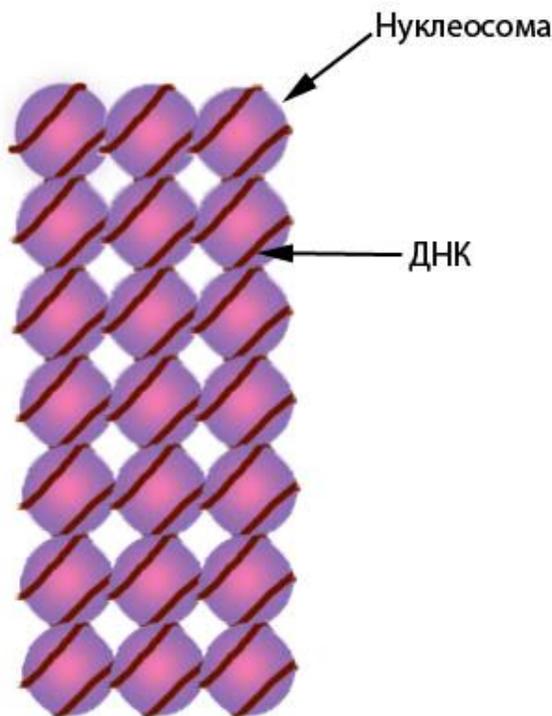


Рис. 43. Фибрилла толщиной 30 нанометров

Около 20 % всех белков хроматина составляют негистоновые белки. Именно они имеют значение для более высоких уровней компактизации хроматина. Выявляемые на препаратах клеточного ядра шарики диаметром 100 нанометров (хромомеры) имеют петлевою розетковидную структуру (рис. 44). Это третий уровень компактизации, обеспечивающий примерно 600–700-кратное укорочение ДНК.

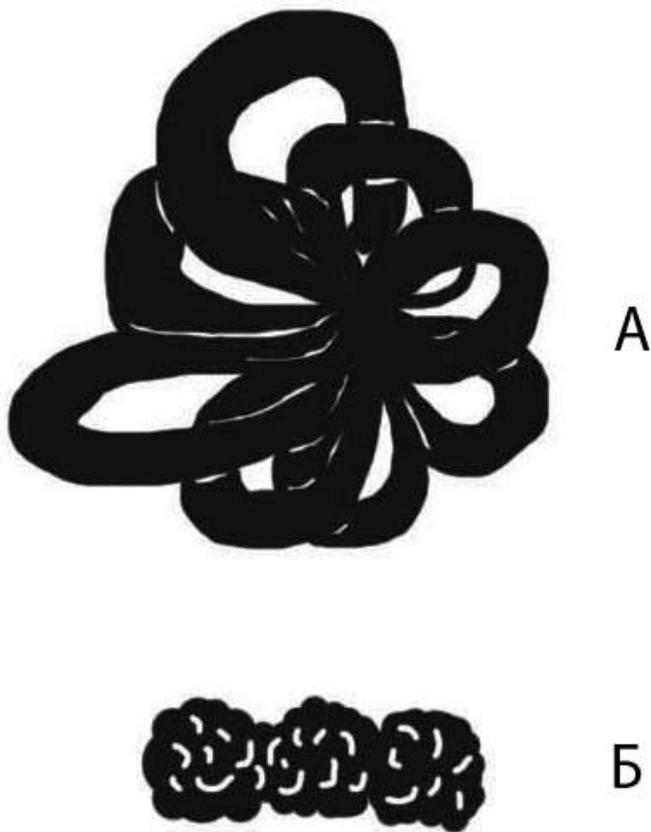


Рис. 44. Петлевой домен: А – структура в виде розетки; Б – хромонема

На препаратах митотических хромосом иногда можно увидеть спираль, образованную нитчатой хроматиновой структурой толщиной около 200 нанометров – хромонемой (рис. 44, 45). Это четвертый уровень укладки хроматина. Витки хромонемы образуют хроматиду толщиной примерно 500 нанометров, что обеспечивает укорочение ДНК примерно в  $10^4$  раз.

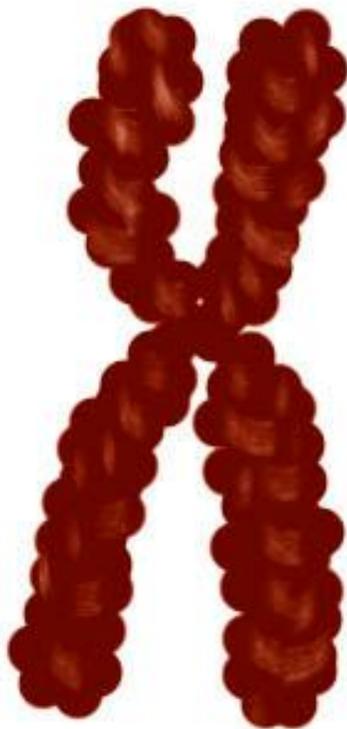


Рис. 45. Хромонемная организация митотической хромосомы

#### *4.4. Дифференциальное окрашивание и блочная организация хромосом*

При окрашивании митотических хромосом ацидофильными (т. е. связывающимися с кислотами) красителями, например эозином, или неспецифическими к нуклеотидам флуоресцентными красителями (флуорохромами – веществами, способными излучать световые волны большей длины при возбуждении светом с меньшей длиной волны) выявляется практически равномерный рисунок без исчерченности. Такая окраска называется рутинной (рис. 46).

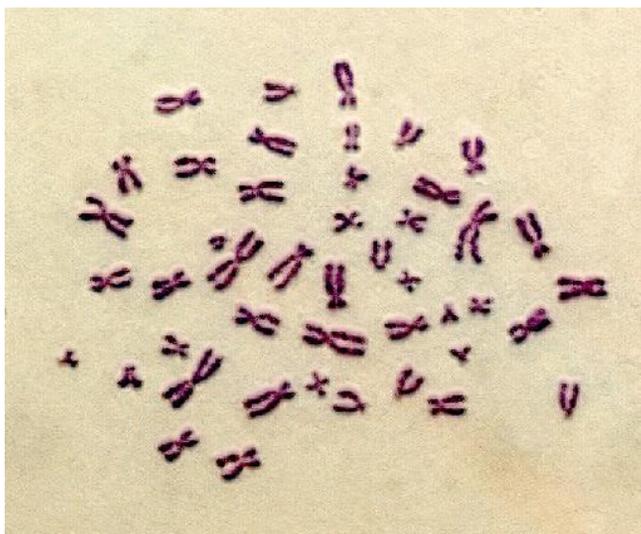


Рис. 46. Митотические хромосомы человека, окрашенные рутинно, краситель Романовского-Гимзы – раствор эозина и метиленового синего\*

Если перед окрашиванием митотические хромосомы обработать щелочными растворами, вымывающими ДНК в первую очередь из районов с низкой плотностью хроматина, можно наблюдать интенсивное окрашивание прицентромерных районов всех хромосом и практически полное интенсивное окрашивание Y-хромосомы (рис. 47). Такой подход называется С-методом дифференциального окрашивания хромосом или С-бендингом. С-положительные (интенсивно окрашенные при использовании этого метода) районы хромосом соответствуют участкам генетически инертного хроматина – или гетерохроматина. Различная степень окрашивания районов хромосом при С-окраске свидетельствует о неоднородности распределения гетерохроматина по длине хромосом.

---

\* URL: <http://131.229.114.77/microscopy/gallm.html>

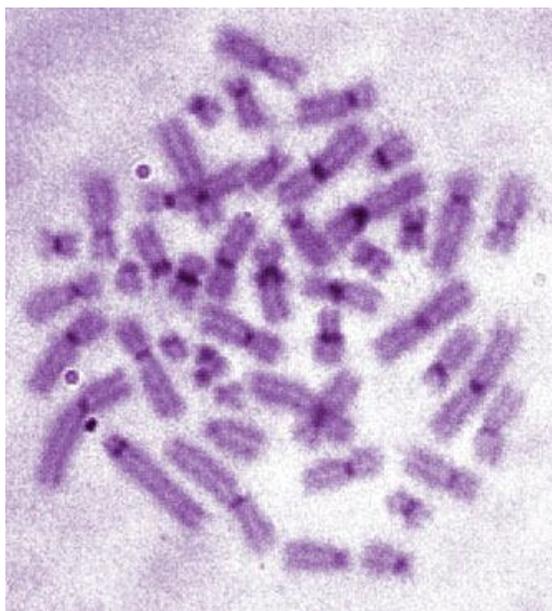


Рис. 47. Митотические хромосомы человека, окрашенные по С-методу (фото Е.Г. Нероновой)

В зависимости от степени плотности упаковки фибриллы 30 нанометров различают более конденсированный хроматин – гетерохроматин – и менее конденсированный эухроматин. Гетерохроматиновые участки очень интенсивно окрашиваются при дифференциальной С-окраске хромосом из-за большей плотности и хорошо видны под микроскопом. ДНК, находящаяся в гетерохроматине, не транскрибируется и содержит большое количество повторяющихся последовательностей. На стадии интерфазы гетерохроматин часто располагается по периферии ядра (пристеночный гетерохроматин). В эухроматине ДНК упакована сравнительно неплотно. Гены, находящиеся в эухроматиновых районах, активно транскрибируются. Плотность упаковки хроматина зависит от модификаций гистонов (метиличирования, ацетиличирования, фосфорилирования), в первую очередь это относится к гистону H1. Гетерохроматин у млекопитающих состоит преимущественно из АТ (аденин-тимин)-обогащенной высокоповторяющейся ДНК. Таким образом, С-окраска позволяет выявлять наиболее различающиеся по своему составу и плотности районы хромосом.

Если обработки перед окрашиванием проводить более мягко, можно обнаружить поперечную исчерченность митотических хромосом. Это дифференциальная G-окраска или G-бендинг (рис. 48). G-положительные районы соответствуют более компактизованным, менее насыщенным генами участкам хромосом, которые содержат количество АТ-пар большее, чем G-отрицательные районы. Как правило, в G-положительных районах (G+-блоках) находятся тканеспецифические и стадийспецифические гены, транскрипция которых нужна не во всех клетках. В этом заключается биологическое значение блочной организации хромосом – гены, которые одинаково нужны во всех клетках, находятся в более деконденсированных участках хромосом, где ДНК более доступна для ферментов транскрипции. Для получения отчетливой G-окраски обычно используют мягкую обработку хромосом раствором трипсина с последующим окрашиванием красителем Романовского-Гимзы. По общепринятой трехбуквенной номенклатуре, которая часто используется в записи цитогенетического диагноза, такая окраска обозначается GTG (G-окраска – трипсин – Гимза).

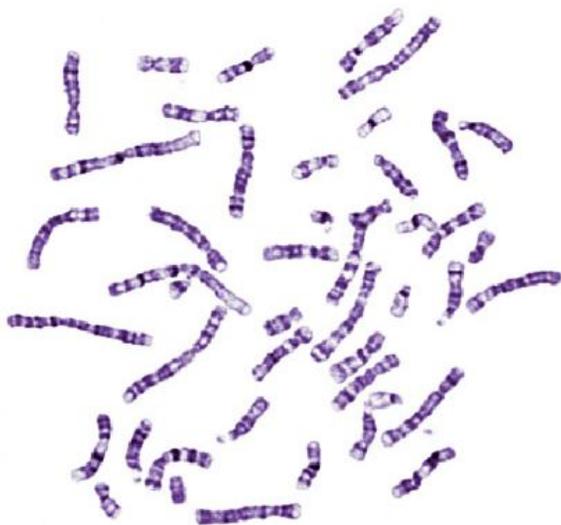


Рис. 48. Митотические хромосомы человека, окрашенные по GTG-методу\*

\* URL: [http://www.subtelomeres.com/ClinicalDiagnosis\\_6.html](http://www.subtelomeres.com/ClinicalDiagnosis_6.html)

G<sup>+</sup>-блоки также могут быть выявлены при окрашивании хромосом АТ-специфическими флуорохромами (DAPI, Хехст 33258) – это дифференциальная Q-окраска или Q-бендинг (рис. 49). АТ-богатые G-положительные районы связывают большее количество красителя, что приводит к их более интенсивной флуоресценции. Использование этого метода позволяет идентифицировать Y-хромосому даже в интерфазе, поскольку значительная ее часть состоит из необычайно АТ-богатого гетерохроматина, который при связывании с флуорохромами дает бриллиантовое свечение.

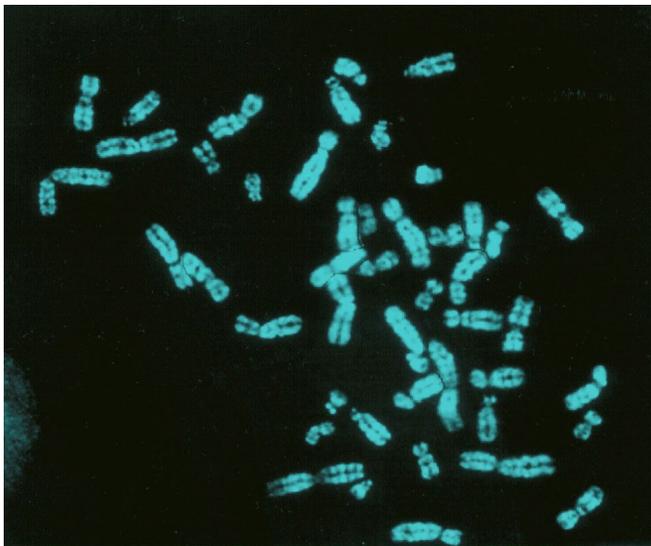


Рис. 49. Митотические хромосомы человека, окрашенные по Q-методу\*

Рисунок, обратный G-бендингу, получается при помощи R-метода дифференциального окрашивания путем тепловой денатурации (рис. 50). Ц-пары, которых больше в G-отрицательных районах хромосом, более устойчивы к этой процедуре. Подавляющее большинство G<sup>+</sup>-районов соответствует R- и наоборот (рис. 51). Само название этого метода происходит от английского слова *reversed* – обратный. R<sup>+</sup>-районы реплицируются в первой половине фазы S клеточного цикла, а G<sup>+</sup>-районы – во второй. Существуют методи-

\* URL: <http://www.translational-medicine.com/content/3/1/21/figure/F4?highres=y>

ки выявления R-бендинга путем введения в клетки модифицированных предшественников синтеза ДНК в середине фазы S. Тогда R<sup>+</sup>-районы не будут содержать модифицированных нуклеотидов, а G<sup>+</sup>-районы – будут.

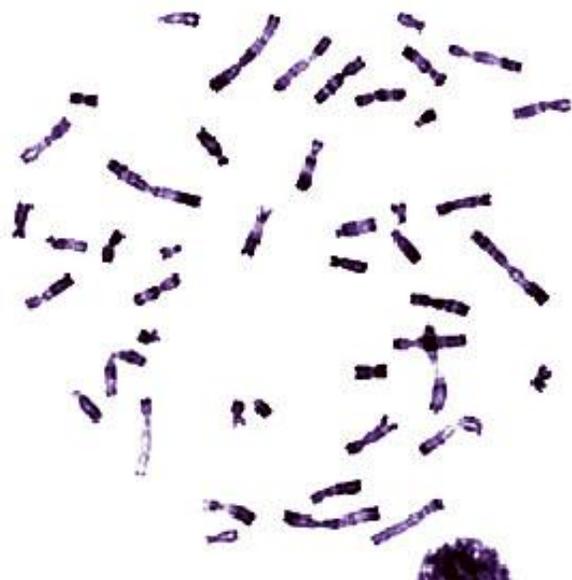


Рис. 50. Митотические хромосомы человека, окрашенные по R-методу\*

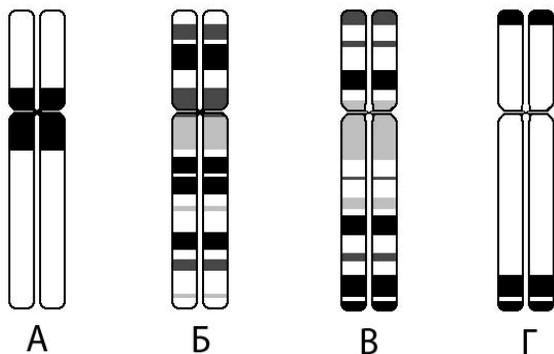


Рис. 51. Схематическое изображение одной и той же митотической хромосомы, окрашенной при помощи различных методов дифференциального окрашивания:

А – С-метод, Б – G-метод, В – R-метод, Г – Т-метод

\* URL: <http://www.currentprotocols.com/protocol/hg0402>

При более интенсивной тепловой обработке выявляются Т-сегменты, расположенные преимущественно в прителомерных районах хромосом (рис. 52). Их локализация совпадает с наиболее близкими к теломере R-сегментами (рис. 51). Содержание генов в Т<sup>+</sup>-районах на порядок больше, чем в среднем по длине хромосомы, и больше чем в относительно обогащенных генами R<sup>+</sup>-районах. Некоторые функциональные особенности позволяют считать Т-сегменты наиболее выраженными R-сегментами. В таких районах находится особенно много генов, связанных с наиболее важными функциями жизнеобеспечения клетки – генов домашнего хозяйства и онкогенов, мутация которых может привести к злокачественной опухоли. Это определяет особое значение теломерных районов в онкогенезе.

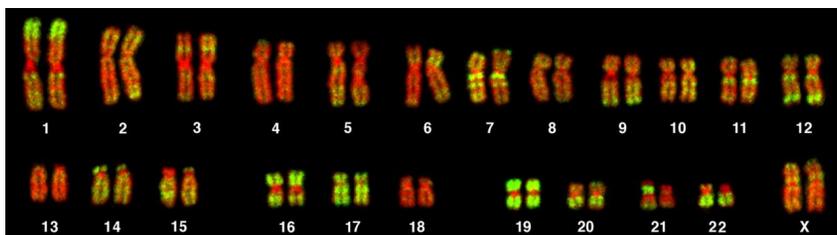


Рис. 22. Митотические хромосомы человека, окрашенные по Т-методу – флуоресцентный вариант гибридизации с использованием Alu-специфических ДНК-зондов (гл. VIII)\*

Районы ядрышковых организаторов (ЯО), содержащих гены рибосомной РНК и формирующих в интерфазе ядрышки, могут быть выявлены при помощи окраски нитратом серебра ( $\text{AgNO}_3$ ). Такой тип окраски называется N-бэндинг.

\* URL:

<http://www.statemaster.com/encyclopedia/Image:PLoSBio3.5.Fig7ChromosomesAluFish.jpg>

Для обозначения хромосомы человека используется аббревиатура HSA (от латинского видового названия *Homo sapiens*) и цифра, соответствующая номеру хромосомы. Например, HSA21 – хромосома 21 человека. В клинической практике обозначение HSA иногда опускают, поскольку ясно, что речь идет о человеке. Для удобства определения отдельных районов хромосом их обозначают числами, как показано на рис. 53. Последняя цифра числового обозначения указывает на определенный бэнд – полоску, выявляемую при дифференциальном окрашивании, первая цифра указывает на условную часть хромосомы, состоящую из нескольких бэндов. По умолчанию приводят обозначения сегментов, выявляемых G-методом. Теломеры обозначаются ter. Длинное и короткое плечи обозначаются q и p соответственно.

*Примеры:*

HSA14p11 – район 11 короткого плеча хромосомы 14 человека;  
HSAXqter – теломер длинного плеча X-хромосомы человека;  
5pter-p11 – участок, ограниченный теломером и бэндом 11 короткого плеча хромосомы 5 (включает 5p11, 5p12, 5p13, 5p14, 5p15.1, 5p15.2 и 5p15.3) (рис. 23).

Для обозначения хромосом других организмов также используют трехбуквенную аббревиатуру. Хромосомы домашней мыши – *Mus musculus* – MMU, крупного рогатого скота – *Bos taurus* – BTA, домашней кошки – *Felis catus* – FCA, собаки – *Canis familiaris* – CFA, домашней курицы – *Gallus gallus* – GGA, японского перепела – *Coturnix japonica* – CJA.

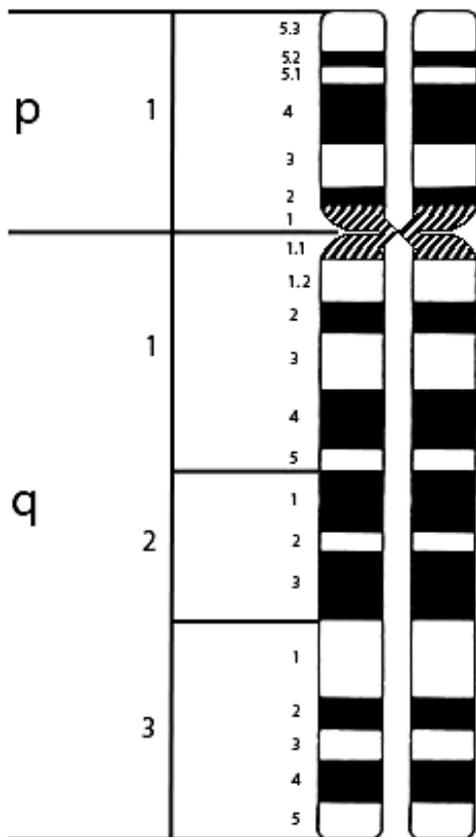


Рис. 53. Схема обозначения районов хромосом на примере хромосомы 5 человека (HSA5), дифференциально окрашенной по G-методу (уровень разрешения 400 сегментов на кариотип)

Для повышения точности цитогенетического анализа часто используют прометафазные и даже профазные хромосомы, что позволяет увеличить число распознаваемых сегментов дифференциального окрашивания хромосом человека до 850 и 1700, соответственно.

Характерные для хромосом человека типы рисунков дифференциального окрашивания наблюдаются у всех млекопитающих и птиц. У других позвоночных животных можно выявить не все виды дифференциального окрашивания, и не всегда они достаточно отчетливо выражены.

#### 4.5. Гибридизация *in situ*, хромосомный пейнтинг и сравнительная геномная гибридизация (CGH)

ДНК имеет двунитовую структуру. Это дает возможность провести плавление (денатурацию), т. е. перевести ДНК в однонитевую форму, затем восстановить двунитовую структуру по принципу комплементарности с использованием однонитевой молекулы ДНК-зонда – иными словами, провести гибридизацию двух молекул ДНК. Если молекула ДНК-зонда содержит меченые нуклеотиды, ее можно выявить при помощи одной из систем детекции гибридизационного сигнала. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* (от лат. *in situ* – на месте) подразумевает проведение процедуры непосредственно на цитологическом препарате хромосом, интерфазных ядер или цитоплазмы.

Изначально метод гибридизации *in situ* применялся только для локализации повторяющихся последовательностей, сгруппированных в одном или нескольких районах митотических хромосом, благодаря чему они образуют относительно крупный участок связывания (мишень) для молекул зонда.

В 80-е гг. XX столетия стали появляться сообщения о применении метода гибридизации *in situ* для локализации уникальных последовательностей на митотических хромосомах с использованием статистического анализа.

Выявление уникальных последовательностей ДНК в митотических хромосомах требует соблюдения трех условий. Во-первых, зонды должны быть надежными: четко охарактеризованными и чистыми. Во-вторых, необходимы специальные приемы, облегчающие связывание молекулы зонда и мишени в хромосомах. В-третьих, неспецифическое связывание ДНК-зонда с цитологическим материалом должно быть сведено к абсолютному минимуму. Выполнение первого условия в настоящее время практически не вызывает затруднений, поскольку для получения ДНК-зондов можно использовать технологию геной инженерии. Второе условие также выполнимо благодаря использованию декстран сульфата –

агента, эффективно повышающего (примерно в 10 раз) скорость ренатурации одноцепочечных молекул ДНК в растворе. Это способствует образованию протяженных сотовидных конгломератов одноцепочечных молекул ДНК, связанных между собой за счет случайно расположенных двухцепочечных участков.

Использование в качестве метки радиоактивных изотопов позволяет эффективно локализовать даже небольшие фрагменты ДНК – порядка 1–2 т.п.н. Основными недостатками изотопного варианта гибридизации являются относительно низкая разрешающая способность, необходимость длительной процедуры автордиографии и технические и сложности, связанные с хранением и использованием радиоактивных веществ.

Негативные аспекты использования радиоактивной метки служили стимулом для попыток разработать эквивалентные по эффективности, но более безопасные, быстрые и дешевые методы. В результате были разработаны методы гибридизации с использованием нерадиоактивно меченых зондов, выявляемых посредством различных иммунохимических методов. Было установлено, что новая технология гибридизации обладает рядом преимуществ, к которым относится ее полная безопасность для исследователя. Другим положительным свойством нерадиоактивно меченых зондов является их химическая устойчивость в течение нескольких месяцев. Применение нерадиоактивных меток обеспечивает более высокую разрешающую способность, чем работа с изотопами, а в ряде случаев повышает уровень информативности. Неизотопная гибридизация позволяет картировать (т. е. определять местоположение на хромосоме) уникальные гены размером около 1 т.п.н. Наконец, результаты гибридизации можно анализировать сразу после проведения эксперимента. Таким образом, преимущества нерадиоактивного мечения зондов заключаются в высокой разрешающей способности, точности, воспроизводимости, дешевизне и безопасности.

Чувствительность данного метода зависит от размера гена, количества его копий, специфической активности зонда, а также от количества молекул флуорохрома, присутствующих в гибриде на заключительной стадии эксперимента.

Неизотопный вариант гибридизации *in situ* позволяет использовать несколько ДНК-зондов, меченных разными агентами, на одном цитологическом препарате (многоцветная гибридизация). Такой подход используют для тонкого интерфазного картирования с разрешающей способностью до 100 т.п.н.

Повышению специфичности метода служит супрессия (подавление) неспецифической гибридизации путем добавления в гибридизационную смесь небольшого количества конкурирующей ДНК. Такая процедура необходима при использовании в качестве зондов больших геномных последовательностей ДНК.

В настоящее время наиболее часто используется метод биотинового мечения. Его принцип основан на сильном взаимодействии биотина с белком авидином вследствие их высокого родства. Молекула авидина потенциально может образовать четыре химические связи, поэтому после связывания его с биотином три связи остаются свободными, что используется при детекции сигнала гибридизации.

Приготовление хромосомных препаратов производится согласно существующим методикам. На следующем этапе метафазные хромосомы подвергаются обработке РНК-азой с целью удаления связанной РНК. Далее ДНК зондов и хромосом денатурируют, создавая одноцепочечные структуры. Хромосомные препараты инкубируют с зондом в течение определенного времени. Затем удаляют избыток меченой ДНК, не связавшейся с денатурированной ДНК хромосом, посредством специальной отмывки препаратов. Последним этапом эксперимента является детекция сайтов гибридизации. Суть его сводится к следующему: ДНК, содержащая в своем составе биотин, легко распознаваема при контакте ее с авидином (стрептавидином). Последний, в свою очередь, может быть

выявлен флуоресцентно. Такой подход в наше время является наиболее распространенным и называется флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH – fluorescent *in situ* hybridization) (рис. 54).

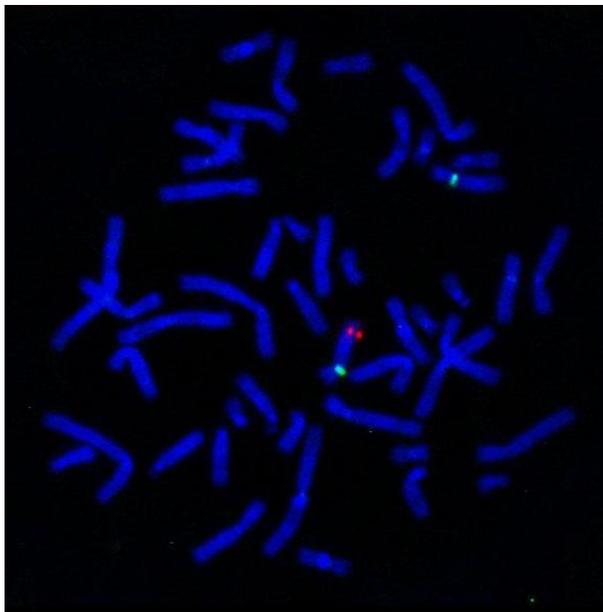


Рис. 54. Двухцветный вариант флуоресцентной гибридизации *in situ*\*

В последние годы для картирования геномов высших эукариотов используют протяженные ДНК-зонды величиной 10–150 т.п.н., которые, как правило, клонируют в космидах или в искусственных хромосомах дрожжей или бактерий (гл. 6). Применение перекрывающихся протяженных ДНК-клонов (контигов) позволяет связать хромосомный и молекулярный уровни картирования геномов.

Для выявления тонких хромосомных перестроек и для быстрой идентификации хромосом применяют метод хромосомного пэйнтинга – в этом случае в качестве зонда для гибридизации используют последовательности из хромосомоспецифических библиотек. Одновременно можно использовать несколько хромосомоспецифических зондов и

---

\* URL: <http://qwickstep.comsearchchromosome-12.html>

получить изображение, где каждая хромосома представлена своим цветом (рис. 55). Присутствие фрагментов другого цвета на хромосоме будет говорить о хромосомной перестройке.

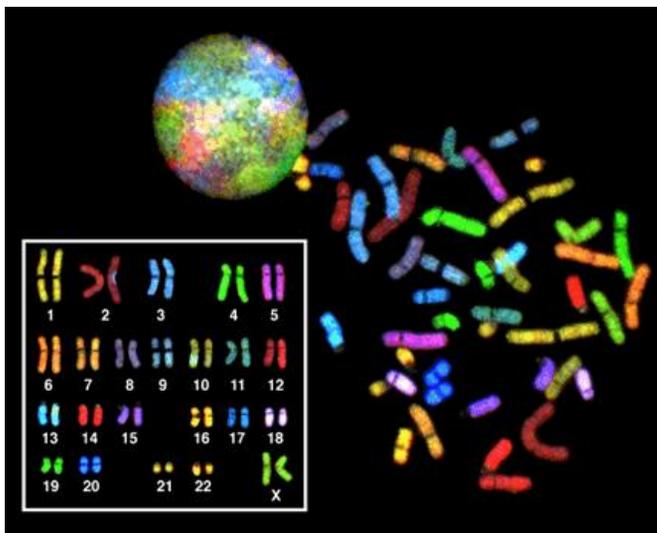


Рис. 55. Хромосомный пейнтинг (мультиFISH или спектральный анализ кариотипа)\*

В последние годы для выявления тонких хромосомных перестроек, размер которых может лежать за пределом разрешающей способности микроскопа, используют метод сравнительной геномной гибридизации (CGH – comparative genomic hybridization). Суть метода заключается в количественной оценке ДНК, связывающейся с молекулой короткого зонда на биочипе (рис. 56). Все хромосомы и отдельные районы представлены специфическими только для них ДНК-зондами, закрепленными на стекле. Координаты каждой такой последовательности введены в специальную программу. ДНК от анализируемого индивидуума и контрольный образец метят разными флуорохромами и гибридизуют на биочипе. После отмывок сканер считывает уровень флуоресценции в отдельных точках на биочипе. Этот уровень прямо пропорционален количеству связавшейся

\* URL: [http://people.musc.edu-hazardsWebBioInformaticsSKY\\_CGH.htm](http://people.musc.edu-hazardsWebBioInformaticsSKY_CGH.htm)

ДНК с определенным зондом, локализация которого известна. Снижение вдвое уровня флуоресценции в местах расположения зондов из определенного района по сравнению с нормальной клеткой свидетельствует о гетерозиготности по делеции (утрате) данного района. У гомозигот по делеции флуоресценция зондов из делетированных районов отсутствует вовсе. У гетерозигот по дупликации (удвоению хромосомного района) флуоресценция зондов из дублицированного района в полтора раза выше, чем у кариотипически нормальных индивидуумов.

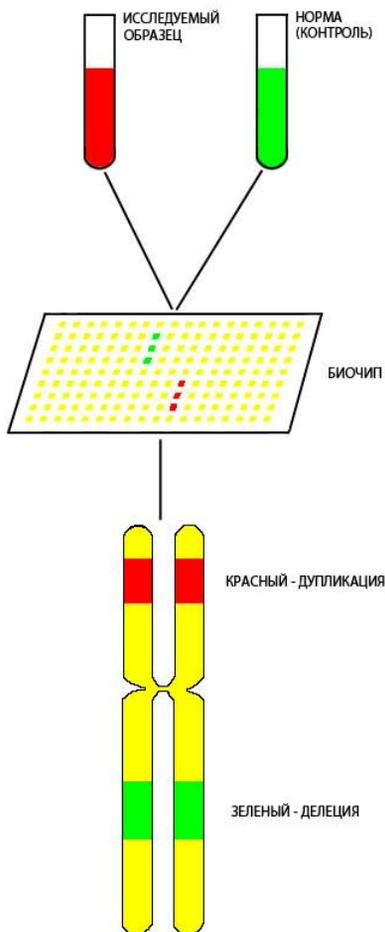


Рис. 56. Схема метода сравнительной геномной гибридизации (CGH)

#### *4.6. Теория старения в связи с динамикой структуры теломеры*

Теломеры – это концевые участки хромосом (рис. 31). Теломерные участки хромосом выполняют защитную функцию, они не способны соединяться с другими хромосомами или их фрагментами.

У большинства эукариот теломерные последовательности ДНК представляет собой короткие тандемные повторы (повторы одинаково ориентированных единиц). В теломерных участках хромосом ДНК вместе с белками, специфически связывающимися с теломерными повторами, образует нуклеопротеидный комплекс – конститутивный (структурный) теломерный гетерохроматин. Теломерные повторы – весьма консервативные последовательности. У всех позвоночных, в том числе у человека, они представляют собой многократные повторы шести нуклеотидов – ТТАГТТ.

Из-за того что ДНК-полимераза не способна синтезировать линейную молекулу ДНК до самого конца, с каждым циклом деления теломеры клетки укорачиваются. Данный феномен называется концевой недорепликацией и считается одним из важнейших факторов биологического старения. Однако вследствие этого явления теломеры должны укорачиваться очень медленно: по 3–6 нуклеотидов за один акт репликации. Известно ограничение числа делений одной дифференцированной клетки – предел Хейфлика, которое у человека равно 52. Таким образом, за это число делений теломеры могут стать короче всего на 156–312 нуклеотидов, что совершенно не существенно, учитывая многократное повторение теломерной последовательности ТТАГТТ. Существует эпигенетическая теория старения, согласно которой постепенная утрата маркеров репрессии (подавления) неактивного хроматина приводит к активации перемещения мобильных элементов. Клетка запускает механизмы удаления вызванных этими перемещениями повреждений, что приводит к укорочению теломер в десятки и сотни раз.

В стволовых и половых клетках активно работает особый фермент – теломераза, который при помощи собственной

РНК-матрицы достраивает теломерные повторы и удлиняет теломеры. Однако в большинстве дифференцированных клеток теломераза заблокирована, что приводит к неминусемому укорочению теломер и повышению вероятности мутаций расположенных в Т-дисках онкогенов и генов домашнего хозяйства.

#### *4.7. Нормальный кариотип человека*

Кариотип человека в норме состоит из 23-х пар хромосом, которые располагают под номерами в порядке убывания их линейных размеров (рис. 57). Аутосомы (все хромосомы кроме половых) образуют одинаковый набор у обоих полов. Мужской набор половых хромосом XY, женский – XX. Как и у всех млекопитающих, гетерогаметным полом у человека является мужской. Y-хромосома состоит преимущественно из гетерохроматина. Небольшая по длине эухроматиновая часть содержит 397 генов (при общем числе генов у человека более 25000 для одной из самых коротких хромосом это немало). Для компенсации дозы генов в клетках женского организма происходит инактивация одной из X-хромосом. X-хромосома содержит 1606 генов. Примечательно, что в ней остается небольшая неинактивированная часть, содержащая примерно четверть генов, что уравнивает дозу работающих генов у обоих полов (примерно 400 генов половых хромосом представлено двумя копиями).

Согласно общепринятой международной номенклатуре кариотип принято записывать следующим образом: вначале записывают общее число хромосом, затем – половые хромосомы. При нормальном кариотипе этим и ограничиваются, при наличии хромосомных нарушений их описывают при помощи специальных обозначений, которые будут рассмотрены при изложении материала о каждой из них.

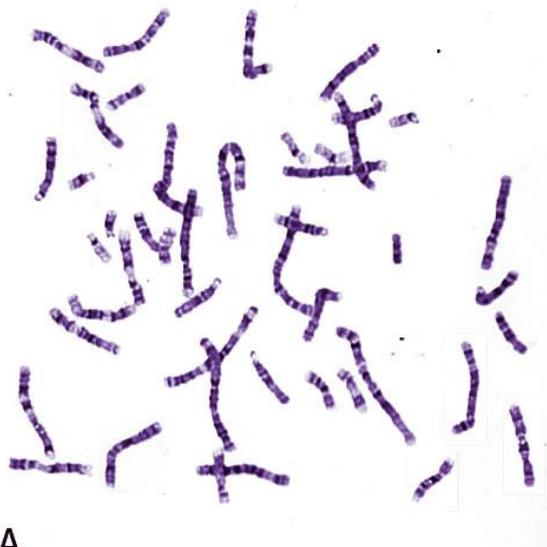
*Пример*

46, XX – нормальная женщина;

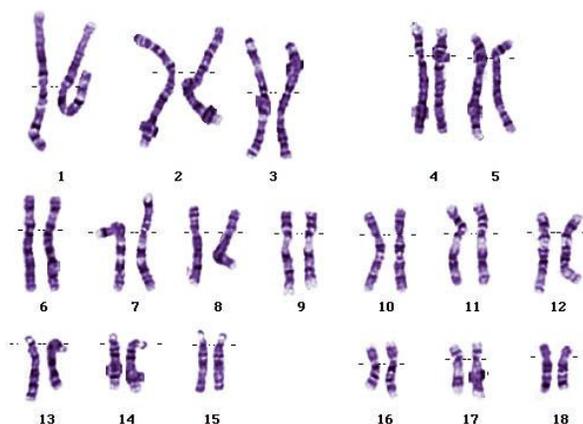
46, XY – нормальный мужчина.

Хромосомы человека принято условно подразделять на восемь групп, которые обозначают латинскими буквами от А до G. Такое подразделение вызвано тем, что не всегда можно

точно определить номер хромосомы. Распределение хромосом по группам было выполнено на основании их морфологических особенностей, видимых при рутинном окрашивании.



**A**



**Б**

Рис. 57. Нормальная метафазная пластинка (А) и раскладка (Б) дифференциально окрашенных по G-методу хромосом человека\*

\* URL: <http://homepage.mac.com/wildlifeweb/cyto/human/index.html>

Группа А включает хромосомы 1, 2 и 3 – это метацентрические и субметацентрические хромосомы. Хромосома 1 – самый большой метацентрик в кариотипе. Хромосома 2 является самой крупной субметацентрической хромосомой. Метацентрическая хромосома 3 отличается примерно на 1/5 по длине от хромосомы 1 и, поэтому, легко может быть идентифицирована. В проксимальном (находящемся ближе к центромере) районе длинного плеча хромосомы 3 при использовании Q-окраски выявляется очень яркий сегмент, который также позволяет безошибочно определить эту хромосому.

Группа В включает хромосомы 4 и 5 – крупные субметацентрики. Отличить их друг от друга при рутинном окрашивании невозможно.

Группа С представлена хромосомами 6–12. В эту же группу входит половая X-хромосома. Все хромосомы этой группы – метацентрики среднего размера. Индивидуально различить их можно только при помощи G-, R- или Q-окраски.

Группа D включает три пары акроцентрических хромосом средней длины – с 13 по 15. Все они содержат вторичную перетяжку – место локализации ЯОР (ядрышкообразующих районов), отделяющую небольшой по длине спутник от остальной части короткого плеча. Размеры спутников заметно варьируют у разных индивидуумов. Иногда наблюдаются два спутника.

К группе E относят короткие метацентрические и субметацентрические хромосомы с 16 по 18. Хромосома 16 – метацентрик, ее длина составляет около трети от длины хромосомы 1. Хромосомы 17 и 18 близки по центромерному индексу (около 0,30) и несколько (5–10 %) различаются по длине.

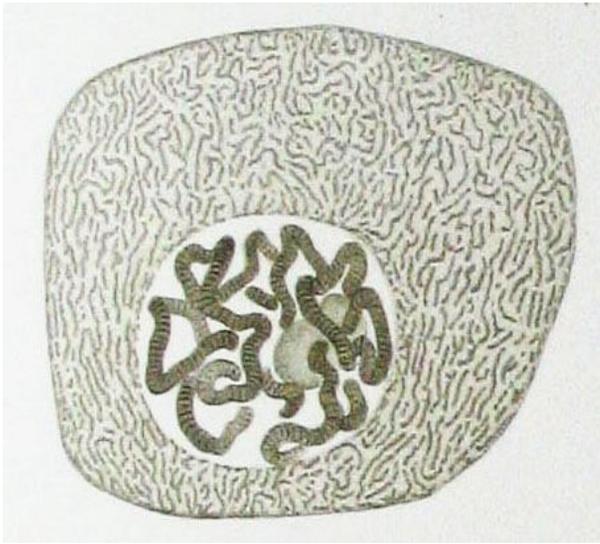
Группа F объединяет две маленькие метацентрические хромосомы 19 и 20, практически неразличимые без дифференциальной окраски.

Группа G включает маленькие акроцентрические хромосомы 21 и 22. К этой группе относят и половую Y-хромосому, которая отличается от других хромосом этой группы положением хроматид длинного плеча – у Y-хромосомы они расположены близко, а у хромосом 21 и 22 – широко расставлены. Размер Y-хромосомы варьирует в широких пределах за счет изменения размеров гетерохроматинового блока, не оказывающего существенного влияния на фенотип. Такая вариабельность видна даже в интерфазных ядрах при окрашивании АТ-специфическими флуорохромами. В коротких плечах хромосом 21 и 22 обнаруживается вторичная перетяжка – подобно хромосомам группы D они содержат районы ядрышковых организаторов (ЯОР). Рисунки дифференциальной исчерченности хромосом 21 и 22 существенно различаются, что позволяет проводить их индивидуальную идентификацию.

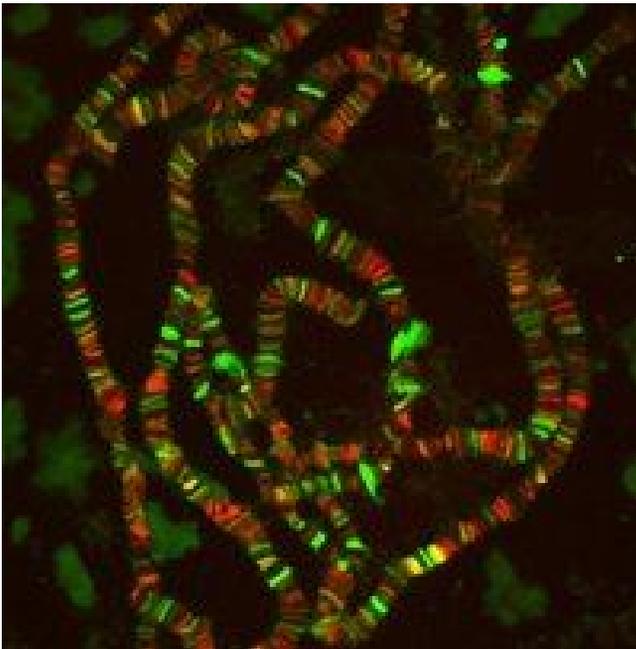
#### 4.8. Политенные хромосомы

Гигантские хромосомы, названные политенными (буквально – «многонитевые»), впервые были обнаружены Е.Г. Бальбиани в 1881 г. в слюнных железах мотыля (личинки комара-звонца рода *Chironomus*). Они представляли собой длинные ленты с поперечной исчерченностью (рис. 58). Позднее этим же автором были обнаружены подобные структуры в макронуклеусе инфузорий. Однако связь обнаруженных тогда клеточных структур с наследственностью была показана только через 50 лет в работах Н.К. Кольцова, Э. Хайца и Х. Бауэра. Подробные карты темных участков политенных хромосом дрозофилы – дисков и светлых – междисков были построены одним из сотрудников Т. Моргана – автора хромосомной теории – К. Бриджесом в 1935 г. (рис. 59). Эти цитоло-

гические карты хромосом *Drosophila melanogaster* используются до сих пор. Множественная редупликация ДНК без митоза (эндорепликация) с сохранением связи хроматид в интерфазном ядре приводит к появлению политенных хромосом, в которых каждая нить ДНК представлена тысячами копий. Это делает политенные хромосомы замечательной моделью для генетиков. Более чем тысячекратное увеличение размеров хромосом и наличие на них естественного, уникального для каждого района рисунка дало возможность даже при сравнительно слабой микроскопической технике 1930-х гг. блестяще подтвердить хромосомную теорию на большом числе перестроек, имеющих фенотипическое проявление. Распространенности этой модели немало способствовала легкость приготовления давленных препаратов в молочной или уксусной кислоте и наличие политенных хромосом у дрозофилы – одного из излюбленных объектов генетического анализа. На политенных хромосомах наблюдается видимое проявление транскрипции – пуфы (рис. 60). Биологическое значение политении – увеличение объема специализированных для активного синтеза белка клеток (например, секреторных) и увеличение числа копий генов для усиления их транскрипции. Интересно, что при политении, как правило, наблюдается соматический синапсис – гомологичные хромосомы плотно прилегают друг к другу. Если одна из гомологичных хромосом содержит deletированный участок – другая в этом районе образует петлю. Дупликации, транслокации и другие хромосомные перестройки также замечательно видны на политенных хромосомах с использованием обычного светового микроскопа.



А



Б

Рис. 58. А. Политенные хромосомы *Chironomus salivary*\*;  
Б. Иммунофлуоресцентная окраска хромосом *Drosophila melanogaster*\*\*

---

\* URL: [http://www.wikidoc.org/index.php/Polytene\\_chromosome](http://www.wikidoc.org/index.php/Polytene_chromosome)

\*\* URL: <http://mbg.cornell.edu/cals/mbg/research/lis-lab/researchdetails.cfm>



Рис. 59. Цитологические карты политенных хромосом  
*Drosophila melanogaster*\*

\* URL: <http://www.nenno.it/karyotypedb/showimage.php?ids=KARY-1000010,IMG-1000010-002>



Рис. 60. Пуф\*

В некоторых клетках растений и животных (например, в трофобластах млекопитающих) наблюдается политения с неполной конденсацией (скрытая политения) – только отдельные районы хромосом (как правило, гетерохроматиновые) представлены политенными участками, в остальных районах многократно редуцированные хроматиды не связаны друг с другом. Поэтому скрытая политения не нашла настолько широкого применения в общей генетике, как истинная политения хромосом двукрылых насекомых.

---

\* URL: <http://www.sbs.utexas.edu/genetics/genweb/images/puff.gif>

#### 4.9. Хромосомы типа ламповых щеток

В оогенезе некоторых животных (земноводных, рептилий, птиц) встречается особая форма хромосом, отличающаяся крупными размерами и характерной петлевой структурой (рис. 61), которые из-за сходства с ершиками для чистки плафонов керосиновых ламп назвали хромосомами типа ламповых щеток. Они представляют собой биваленты на стадии диплотены профазы I мейоза (разд. 4.2).

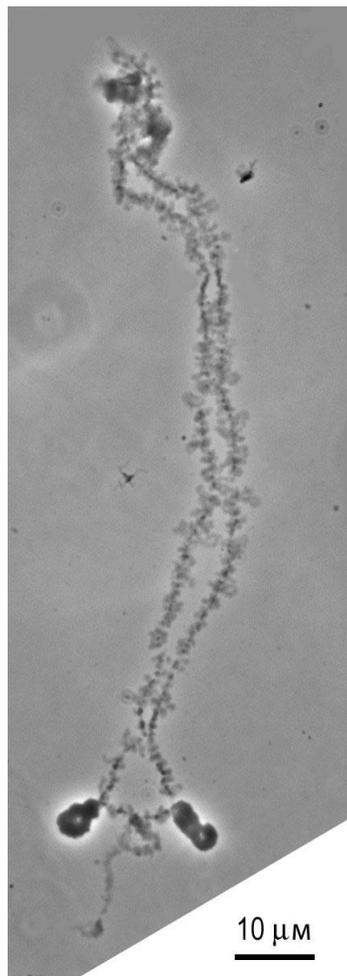


Рис. 61. Хромосома 2 домашней курицы (GGA2)\*

\* URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/168/figure/F3?highres=y>

Каждый бивалент состоит из двух гомологичных хромосом, состоящих в свою очередь из двух сестринских хроматид (рис. 62). Попарно симметричные петли образованы активно транскрибируемым хроматином. При помощи электронного микроскопа можно увидеть несколько транскриптов на каждой петле, причем, как правило, длина транскриптов возрастает от одного участка прикрепления петли до другого. Настолько интенсивная транскрипция требуется в ходе созревания женских половых клеток для преемственности – накопления мРНК перед формированием желтка и, в меньшей степени, вителлогенеза – собственно формирования желтка. Определенный рисунок петель характерен для отдельных хромосом и отдельных хромосомных районов, т. е. петли могут служить морфологическими маркерами. Интересно, что в хромосомах типа ламповых щеток активно транскрибируется обычно «молчащая» высокоповторяющаяся ДНК. В местах прикрепления петель на хромосомах видны узелки – хромеры, в которых находится более плотно упакованный инертный в транскрипционном отношении хроматин (рис. 62).

Наиболее детально хромосомы типа ламповых щеток изучены у гребенчатого тритона и домашней курицы. Такая форма хромосом нашла применение в качестве модельного объекта для изучения особенностей транскрипции и анализа распределения событий генетической рекомбинации по длине хромосом. В последние годы активно проводятся исследования хромосом типа ламповых щеток на нескольких видах птиц.

Бивалент

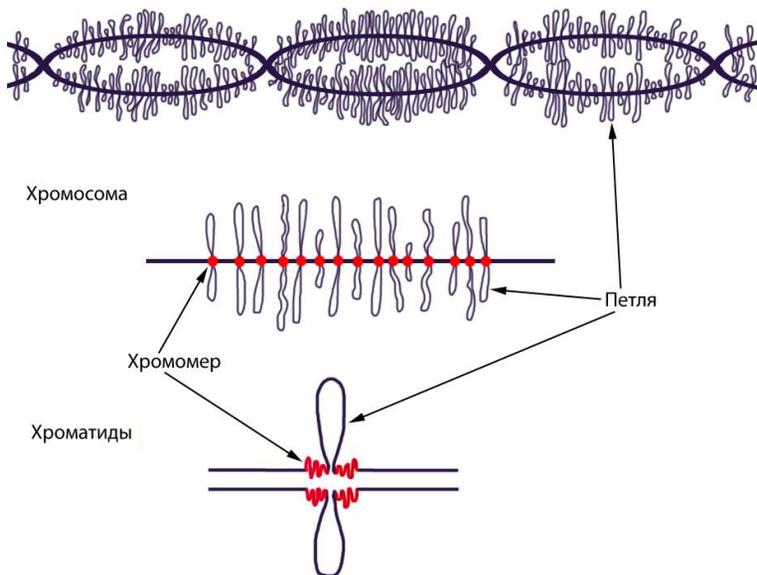


Рис. 62. Схема строения хромосом типа «ламповых щеток»

## Глава 5. Основы генетики пола

Несмотря на то что различия между полами сложны и многообразны, в общем виде пол можно рассматривать как простой дискретный признак, имеющий, как правило, два альтернативных проявления – женский и мужской.

Существует большое число типов определения пола. Принципиально их можно разделить на генетический тип – связанный с различиями генов и хромосом у разных полов – и ненаследственный. К последнему относятся системы определения пола под влиянием условий окружающей среды. Например, у морского червя *Bonellia viridis* личинка, прикрепившаяся к хоботу самки, развивается в самца, который проводит всю жизнь в ее матке, занимаясь исключительно оплодотворением яиц. Если личинка прикрепляется ко дну, она развивается в самку – самостоятельную особь. У крокодилов пол детёнышей определяется температурой инкубации яиц в средней трети периода эмбрионального развития. Например, у нильского крокодила при температуре от 31,7 °С до 34,5 °С формируются самцы, при более низкой или более высокой температуре – самки. У некоторых рыб пол может изменяться несколько раз в течение жизни.

В случае генетического определения пола небольшое число генов, которые расположены, как правило, в половых хромосомах (набор которых различается у разных полов), направляет развитие по женскому или мужскому пути (рис. 63). Система хромосомного определения пола гаплоид-диплоид встречается у некоторых перепончатокрылых – из оплодотворенных яиц развиваются диплоидные самки, а из неоплодотворенных – гаплоидные самцы. Биологическое назначение хромосомных механизмов определения пола систем  $X_0$ ,  $ZW$  и

XУ – поддерживать равное соотношение полов для повышения биологического разнообразия. Система X0 присутствует у некоторых насекомых, самки имеют две половых хромосомы, самцы – одну. Прямо противоположная картина наблюдается у тли. При наличии двух половых хромосом различают ZW и XY системы определения пола. Если гетерогаметным полом, т. е. полом, в мейозе которого образуются гаметы с разным набором половых хромосом, является женский (например, птицы, некоторые рептилии), система называется ZW (рис. 63). При системе XY (например, дрозофила, плацентарные млекопитающие) гетерогаметным полом являются самцы (рис. 63). Интересно, что в последнем случае пол может определяться как присутствием Y-хромосомы, как у плацентарных млекопитающих, так и соотношением числа аутосом и числа X-хромосом (балансовый тип), как у дрозофилы. У дрозофилы при диплоидном наборе аутосом и наличии одной X-хромосомы формируются самцы безотносительно наличия и количества Y-хромосом. Присутствие двух X-хромосом на диплоидный набор ведет к развитию самок, чему не препятствует наличие Y-хромосомы. У плацентарных млекопитающих присутствие одной или более Y-хромосомы приводит к формированию мужского пола, несмотря на любые иные обстоятельства. Это объясняется наличием в Y-хромосоме гена TDF-SRY, определяющего развитие по мужскому пути (рис. 63). При транслокациях участка Y-хромосомы, содержащего этот ген, на X-хромосому у человека встречались мужчины с набором хромосом 46, XX и женщины с набором хромосом 46, XY.

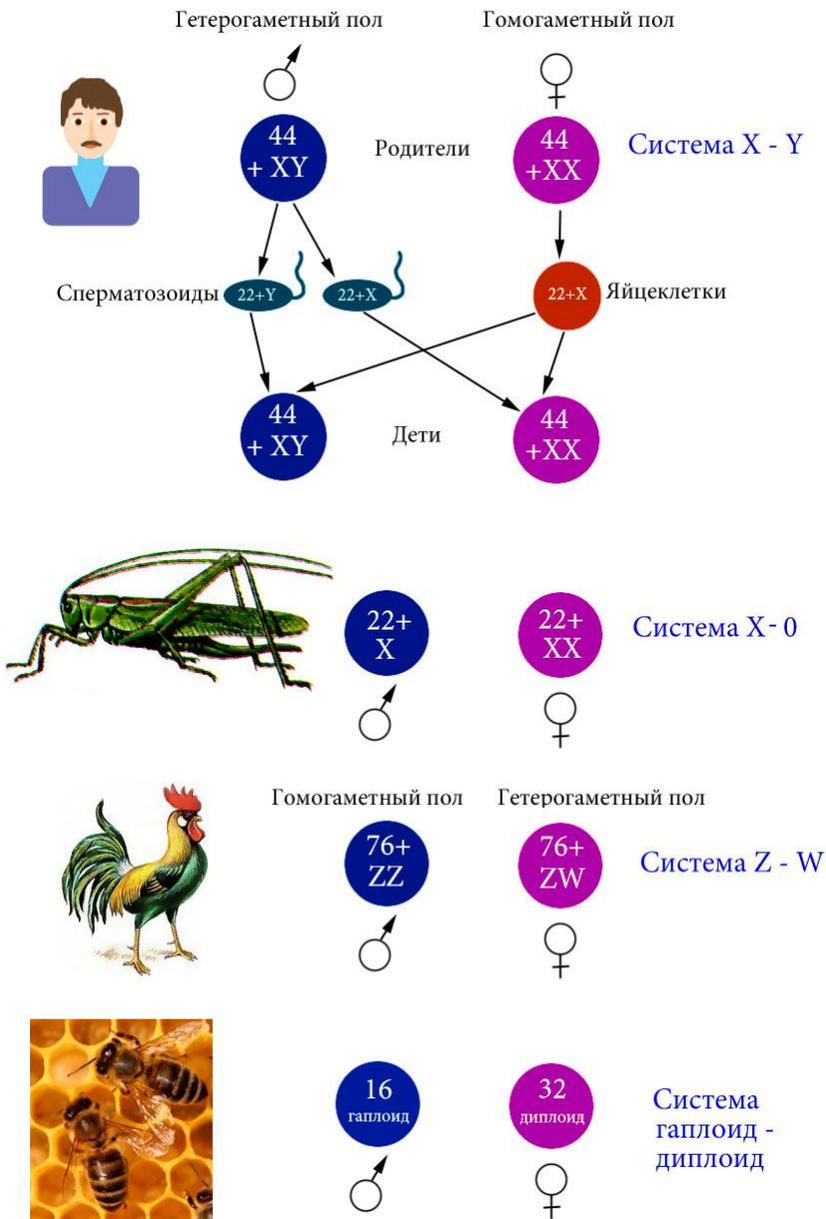


Рис. 63. Типы хромосомного определения пола у животных

У человека, подобно всем плацентарным млекопитающим, принято различать четыре уровня половой дифференцировки (рис. 64):

- 1) хромосомный пол (XX или XY);
- 2) гонадный пол (яичники или семенники);
- 3) фенотипический пол (женский или мужской; внешние половые признаки);
- 4) поведенческий и метаболический пол (характерные мужские или женские особенности поведения и обмена веществ).

Под влиянием TDF-SRY из зачатка гонады формируются семенники. При отсутствии этого гена зачаток гонады развивается по женскому типу. Половые органы формируются из мюллеровых и вольфовых протоков, которые происходят из первичной почки. У женщин мюллеровы протоки развиваются в фаллопиевы трубы и матку, а вольфовы протоки атрофируются. У мужчин вольфовы протоки развиваются в семенные протоки и семенные пузырьки. В клетках Сертоли, расположенных в извитых канальцах семенников, синтезируется антимюллеров гормон, который ингибирует развитие мюллеровых протоков и приводит к их атрофии. Клетки Лейдига, расположенные между канальцами в семенниках, синтезируют стероидные гормоны тестостерон и 5-дигидротестостерон, которые определяют развитие гениталий и, позднее, формирование мужских вторичных половых признаков (мужской тип оволосения, низкий голос, особенности телосложения). Интересно, что для нормального развития по мужскому типу требуется нормальное функционирование всех этих компонентов, а развитие по женскому типу происходит «конститутивно». Поведенческий и метаболический пол формируются постепенно, достигая полноты проявления в постпубертатный период.

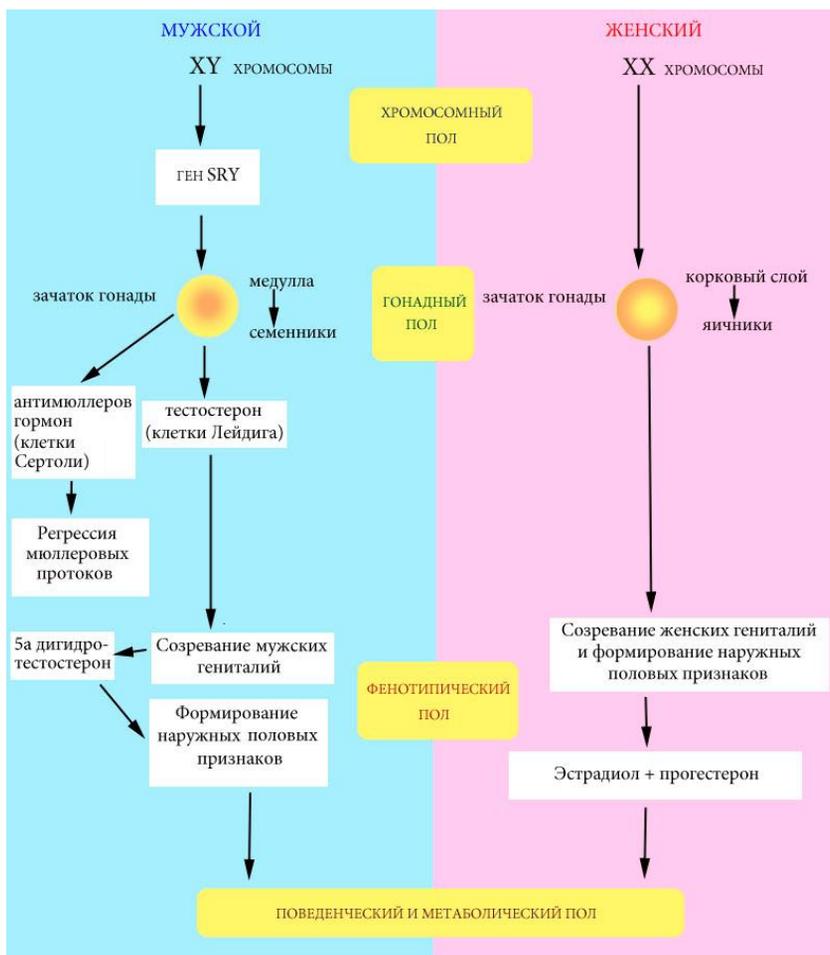


Рис. 64. Схема определения пола у человека

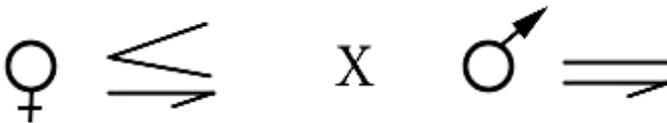
### Контрольные вопросы и задания

1. Самка медоносной пчелы *Apis mellifera* диплоидна, а трутни гаплоидны. Существует, однако, локус с множественными аллелями, влияющий на определение пола у диплоидных особей. Все диплоидные особи, гетерозиготные по аллелям этого локуса – самки, а гомозиготные по любому из аллелей – самцы. Гомозиготные самцы не достигают половозрелости, поскольку обычно поедаются рабочими пчелами на личиночной стадии в первые трое суток после вылупления из яиц. Таким образом, гомозиготный генотип в естествен-

ных условиях летален. Однако изъятых из улья личинок таких самцов можно довести до стадии половозрелости. В этом локусе насчитывается около двадцати аллелей, обозначаемых символами A1, A2, ... , A20. Пусть в потомстве некоторой оплодотворенной гаплоидным трутнем матки лишь половина ячеек способна к развитию (это хорошо заметно, поскольку половина ячеек в сотах остается пустой, и пустые ячейки распределены по сотам случайным образом). Что можно сказать о генетической конституции матки и трутня?

2. Рассчитайте соотношение полов у гибридов первого поколения от скрещивания дрозофил (рис. 65)

3. У тутового шелкопряда хромосомный механизм определения пола ZW. Известно, что самцы дают на 20 % больше шелка, чем самки. Самцы линии А являются сбалансированными гетерозиготами по двум сцепленным с полом летальным мутациям, а самцы линии Б – нормальные. Какую линию лучше использовать в качестве отцовской для получения гибридов для выкормки? Ответ обоснуйте.



Условные обозначения:

— - X-хромосома

— - Y-хромосома

— - две сцепленные X-хромосомы

Рис. 65. Схема скрещивания (для задачи 2 к гл. 5)

## Глава 6. Основные методы и подходы молекулярной генетики

### 6.1. Клонирование нуклеиновых кислот

Клонирование нуклеиновых кислот – получение большого числа копий интересующей последовательности в форме воспроизводимых в живых организмах структур – вирусов, плазмид, искусственных хромосом. Введение в организм чужеродных генов обычно используют для получения продукта этого гена – РНК или, чаще всего, белка. Принципиально возможно применение метода для генной терапии.

Клонировать можно как отдельные фрагменты генома, так и мРНК. В последнем случае применяют специальный фермент – обратную транскриптазу, которая позволяет получить ДНК-копию с РНК-матрицы. Полученные путем обратной транскрипции молекулы ДНК называют комплементарной ДНК (кДНК). Их и лигируют (сшивают при помощи ферментов-лигаз) в векторы.

Клоны, полученные из отдельных тканей, хромосом или геномов группируют в тканеспецифические, хромосомспецифические или геномные библиотеки.

### 6.2. Гибридизация нуклеиновых кислот

Гибридизация нуклеиновых кислот – это образование *in vitro* двуцепочечных молекул нуклеиновых кислот из комплементарных одноцепочечных молекул. Если гибридизуемые молекулы полностью комплементарны, процесс происходит достаточно быстро. При гомологии (общем происхождении) изучаемых последовательностей, которая выражается в определенном проценте идентичности оснований, процесс может потребовать варьирования условий гибридизации. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК. Процесс гибридизации ДНК/ДНК проводится следующим образом. Двуцепочечную ДНК разогревают в соответствующем буфере. На этом этапе водородные связи между ком-

плементарными азотистыми основаниями становятся термодинамически невыгодными и цепочки расходятся. Происходит денатурация ДНК. Препарат денатурированной ДНК затем смешивается с другой денатурированной ДНК. Далее эта смесь медленно охлаждается. В это время одноцепочечные ДНК отжигаются друг на друга (образуются водородные связи между комплементарными основаниями) и образуется гибридная молекула ДНК.

Анализ скорости ренатурации одноцепочечных ДНК служит для оценки сходства и различия последовательностей ДНК разных видов живых организмов или разных особей одного вида.

Дот-блот-гибридизация проводится в одной точке. На фильтр наносят исследуемый образец. ДНК-зонд метят радиоактивно, иммуноферментно или иммунофлуоресцентно. Наличие положительного гибридационного сигнала свидетельствует о наличии в образце последовательности, полностью или частично идентичной молекуле ДНК-зонда.

Блот-гибридизация по Саузерну служит для выявления определенной последовательности ДНК (в образце), которая полностью или частично идентична молекуле ДНК-зонда. Этот метод сочетает электрофорез в агарозном геле для фракционирования ДНК с методами переноса полученных фрагментов ДНК на мембранный фильтр для гибридализации. Метод получил свое название по имени изобретателя, английского биолога Э. Саузерна.

Нозерн блот-гибридизация (в английском названии метода – игра слов *southern* – южный, *northern* – северный) подобна блот-гибридизации по Саузерну, но в качестве мишени используют кДНК. Метод служил для выявления и количественной оценки уровня транскрипции отдельных генов до распространения метода ПЦР с обратной транскрипцией.

### 6.3. Геномные библиотеки

Возможность быстрого получения препаративных количеств ДНК протяженных (более 30 т.п.н.) фрагментов генома является необходимым условием большинства экспериментов по молекулярно-генетическому и цитогенетическому анализу геномов. Гридированные геномные библиотеки, т. е. имеющие адресное указание индивидуальных клонов, позволяют получать протяженные фрагменты ДНК, содержащие интересующую исследователей последовательность, и широко используются для анализа генома с использованием различных подходов.

Первая генетическая система для масштабного клонирования протяженных фрагментов генома была создана Бурке в 1987 г. Она была основана на искусственных хромосомах дрожжей (YAC), включающих центромеру, теломеры, автономно-реплицирующиеся последовательности, сайт клонирования и гены селективных маркеров. Система позволяла клонировать нуклеотидные последовательности до 1000 т.п.н. Поскольку в начале 90-х гг. интенсивно проводилось секвенирование генома человека, такие системы были быстро востребованы и использованы для создания геномных библиотек. Однако существенные недостатки этого рода библиотек — высокий уровень химеризма (когда в одном клоне объединены разные участки генома), нестабильность геномной вставки и трудность приготовления препаративных количеств клонированных последовательностей ДНК — не позволили их использовать в качестве основного инструмента геномного клонирования. Большое количество тандемных (ориентированных в одном направлении) повторов генома млекопитающих приводило в дрожжевой системе к сайт-специфической рекомбинации и потере фрагментов вставки, либо к образованию химерных клонов, т. е. клонов, содержащих фрагменты ДНК из разных областей генома-донора. Цитологически химерные клоны выявляются при гибридизации *in situ* вследствие локализации в двух и более сайтах.

Поскольку прокариотические системы рекомбинации оставляют меньше вероятности нежелательных обменов, кроме того эписомы прокариот отличаются относительной стабильностью и могут существовать в суперскрученной форме, бактерии оказались более привлекательными как организмы-хозяева для геномных клонов. Плазмидные векторы не только проще хромосомных эукариотических векторов (не содержат центромеры, теломеров, и следовательно, конструирование библиотек с ними менее трудоемко), но и позволяют существенно упростить процедуру выделения клонированной ДНК из основанных на них клонов путем полного разрушения хромосомной ДНК.

Первые геномные банки с использованием клеток кишечной палочки *Escherichia coli* были основаны на группе векторов — производных фага лямбда. Существуют фаговые векторы традиционной структуры, представляющие собой молекулы ДНК, способные только к литическому расщеплению *in vitro*. Космидные векторы формально являются дефектными фагами — плазмидами разных типов, содержащими *cos*-участки фага лямбда и не способными к лизису. Наконец, фагмидный (фаг + плазида) вектор, существенной особенностью которого является способность к литическому развитию *in vivo*, поддерживается в виде плазмиды. Все подобные конструкции широко используются для получения клонотек и банков генов. Их общим недостатком является довольно большое число клонов (до  $10^6$ ), необходимое для уверенного представления любого фрагмента генома млекопитающих или птиц при сравнительно небольшом размере вставки — 20–40 т.п.н.

Особо стоит упомянуть космиды — плазмиды, содержащие сегмент ДНК фага  $\lambda$  с соединенными липкими концами (*cos*-сайты). Важной чертой большинства космидных векторов для клонирования является их способность включать вставки до 45 т.п.н. Если кольцевую космидную ДНК разрезать по ка-

кому-то уникальному сайту, смешать с фрагментами ДНК, содержащими липкие концы, и произвести отжиг, то образуются длинные конкатемеры (молекулы, состоящие из крупных повторяющихся блоков). При смешении этих конкатемеров с белками, осуществляющими упаковку фага  $\lambda$ , они разрезаются по *cos*-сайтам, и ДНК упаковывается в головку фага. Этот процесс позволяет отобрать вставки большой протяженности, так как для того чтобы ДНК упаковывалась в головку фага, расстояние между *cos*-сайтами должно быть 38–52 т.п.н. Такая смесь может содержать фрагменты вовсе без вставки или с несколькими повторяющимися вставками, что отражается на качестве полученной библиотеки и затрудняет ее применение для геномного анализа. Реципиентные клетки приобретают упакованные космиды в результате инфицирования «фальшивыми» фаговыми частицами, причем этот процесс более эффективен, чем трансфекция плазмидной ДНК. Попав в клетку-хозяина, рекомбинантная ДНК амплифицируется и сохраняется в виде плазмиды. Полученные рекомбинантные клоны могут быть гридированы – выращены на платах с указанием координат каждого клона. Получение отпечатков (реплик) на нитроцеллюлозных или других фильтрах для переноса клонов с последующим разрушением клеточных стенок бактерий и отмыванием белков позволяет проводить скринирование таких библиотек при помощи обычной дот-блот ДНК-ДНК гибридизации. Недостатком космидных геномных библиотек является относительно (по сравнению с искусственными хромосомами дрожжей) небольшая величина вставки (до 45 т.п.н.) и, следовательно, большой объем библиотеки (для геномов млекопитающих около  $2 \times 10^5$  клонов). Для того чтобы совместить преимущества космидных библиотек (высокая стабильность ДНК-клонов, относительно низкий уровень химеризма, простота конструирования, удобство выделения

ДНК) и дрожжевых библиотек (большая длина вставки и компактность всей библиотеки), было разработано две системы клонирования – на основе искусственных хромосом бактерий (BAC) и искусственных хромосом фага P1 (PAC). Впервые PAC вектор (pCYPAC-1) был использован для переноса рекомбинантной ДНК в клетки *E. coli* при помощи электропорации. Разделенные при помощи пульс-электрофореза фрагменты геномной ДНК человека были упакованы в головки частиц бактериофага P1. Заражение такими фаговыми частицами штамма *E. coli*, экспрессирующего рекомбиназу Cre, привело к возникновению эписомных копий генома рекомбинантных фаговых частиц. Полученная геномная библиотека содержала 15000 клонов со средним размером вставки 130–150 т.п.н. Тридцать четыре клон были гибридизованы на митотических хромосомах методом FISH, при этом не было выявлено ни одного случая химеризма. Продолжительное культивирование бактерий не выявило нестабильности вставки на примере 20 клонов.

Искусственные хромосомы бактерий (BACs) основаны на F-факторе (факторе фертильности) – низкокопийной плазмиде, которая существует в бактериальных клетках в суперскрученной кольцевой форме и может включать вставку до 500 т.п.н. Репликация фактора фертильности жестко контролируется клеточными механизмами, что существенно снижает уровень рекомбинации в эписомах этого рода. Кроме того, геномная ДНК вида-донора находится практически все время в суперскрученном состоянии, следовательно вероятность нежелательных обменов между фрагментами вставки теоретически приближается к нулю. Первая такая библиотека была получена на основе вектора pBAC108L, включающего фактор фертильности и *cosN*-сайт. Размер вставки варьировал от 10 до 300 т.п.н., составляя в среднем 100 т.п.н. Стабильность вставки (по признаку сохранения профиля рестрикционных

фрагментов) подтверждена в течение 100 поколений бактериальных клеток. Проверка клонов на химеризм методом гибридизации *in situ* позволила обнаружить только один случай обмена из 28 случайно выбранных трансформантов. Дальнейшие работы с использованием этой библиотеки также показали низкую частоту транслокаций. Следует отметить в среднем меньшую длину клонированных фрагментов в системах искусственных хромосом бактерий по сравнению с дрожжевыми и основанными на бактериофаге P1. Однако указанные выше недостатки дрожжевых систем не позволяют им конкурировать с бактериальными. Преимуществом же ВАС-библиотек перед РАС-библиотеками является относительная простота их конструирования: исключается использование бактериофагов, перенос донорной ДНК проводится при помощи обычной трансформации. Таким образом, оптимальными системами для клонирования протяженных геномных последовательностей более 50 т.п.н. признаны искусственные хромосомы бактерий, а для фрагментов менее 50 т.п.н. (которые имеют преимущества для использования в некоторых исследованиях геномов) таковыми остаются космиды.

#### **6.4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) применяется при необходимости многократного увеличения малых концентраций отдельных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (образце). Применение ПЦР настолько многообразно, что одно перечисление способов приложения этого метода может занять существенный объем текста. В наше время в принципе любую последовательность ДНК можно получить в препаративных количествах зная только по 20–30 нуклеотидов на ее границах.

Принцип полимеразной цепной реакции заключается в многократном избирательном копировании (амплификации) определённого участка ДНК, проводимом *in vitro* с помощью особой ДНК-полимеразы (например, полимеразы *taq*), выделенной из экстремально термофильных бактерий (рис. 66). Особая термостабильность этого фермента позволяет проводить денатурацию двунитевой ДНК при 95 °С без потери активности. Условия реакции подбираются так, чтобы амплифицировался только заданный фрагмент ДНК и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. После денатурации ДНК короткие (18–30 н.п.) синтетические олигонуклеотиды, называемые праймерами, гибридизуются ДНК-матрицей согласно принципу комплементарности пар оснований, что обуславливает специфичность ПЦР. Температура на этой стадии 50–65 °С, точная температура зависит от последовательностей праймеров исходя из их нуклеотидного состава. Эта стадия называется отжиг или гибридизация. Каждый из праймеров комплементарен участку одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого фрагмента. Затем температуру доводят до 72 °С – оптимума для работы *taq*-полимеразы. Это – стадия полимеризации. Денатурацию, отжиг и полимеризацию (каждая проводится от нескольких секунд до полутора минут) повторяют 20–35 раз. Таким образом, число копий амплифицируемого фрагмента увеличивается в  $2^n$  раз, где  $n$  – число циклов. Затем реакционную смесь инкубируют несколько минут при 72 °С, чтобы полимераза смогла достроить недополимеризованные участки – стадия элонгации. Заключительная стадия – хранение – проходит при 4 °С. Визуализацию результатов обычно проводят путем электрофореза в агарозном геле с окраской ДНК флуорохромом этидиум бромид (рис. 67).

Для анализа экспрессии генов применяют РТ-ПЦР – полимеразную цепную реакцию на матрице кДНК, полученной путем обратной транскрипции мРНК.

С использованием специальных приборов ПЦР можно наблюдать в режиме реального времени (рис. 68). Существует несколько вариантов проведения такой реакции. Один из них – ПЦР, в которой в реакционную смесь, помимо традиционных компонентов, добавляют интеркалирующий краситель SYBR GREEN. Сканирующий луч измеряет уровень флуоресценции красителя, связывающегося только с двунитовой ДНК, который прямо пропорционален числу копий амплифицированного фрагмента. Определение номера цикла, на котором уровень флуоресценции достоверно превысит фоновый (точки *C<sub>t</sub>*), позволяет проводить количественные сравнения ДНК в различных образцах (рис. 69). Поскольку для каждого фрагмента существуют своя температура денатурации (плавления), наличие только одного пика на кривой плавления свидетельствует о специфичности реакции (рис. 70).

Отличие ПЦР от процесса репликации, проходящего в клетках живых организмов, состоит в том, что полимеразная цепная реакция позволяет амплифицировать сравнительно короткие участки ДНК (не более 3000 пар оснований). Использование смеси нескольких полимераз, например, *Taq* и *Pvu*, при определенных условиях позволяет проводить амплификацию фрагментов ДНК длиной 20–40 т.п.н., однако эти фрагменты всё равно значительно короче хромосомной ДНК эукариотической клетки.

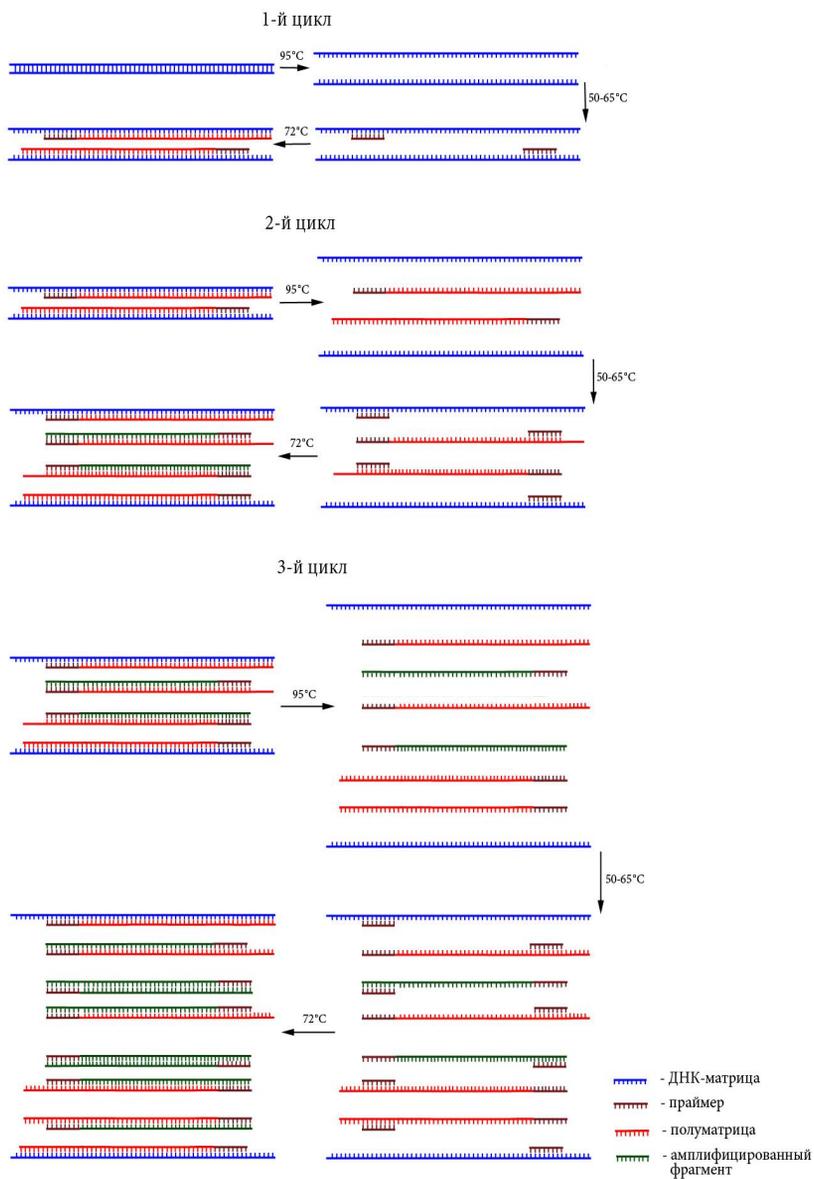


Рис. 66. Схема ПЦР

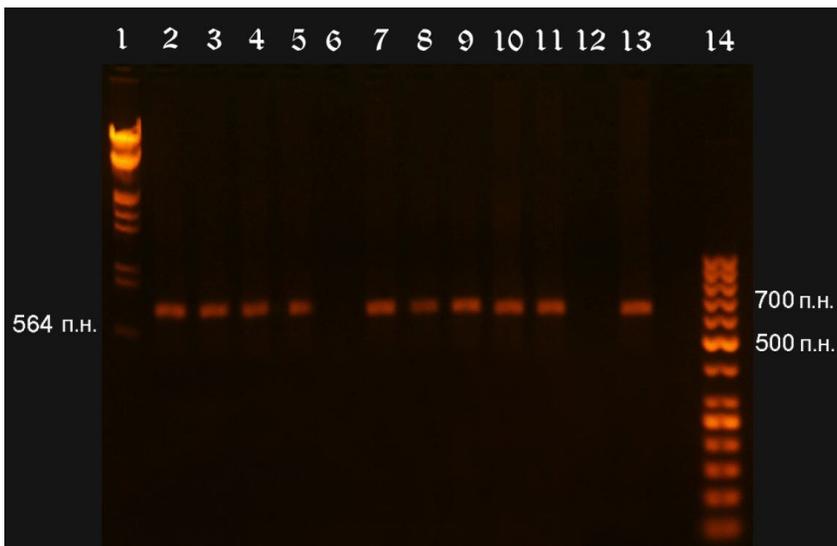


Рис. 67. Электрофореграмма результатов ПЦР (фото авт.)



Рис. 68. Амплификатор iQ (Biorad). Прибор может быть использован как для ПЦР в реальном времени, так и для обычной (конвенционной) ПЦР

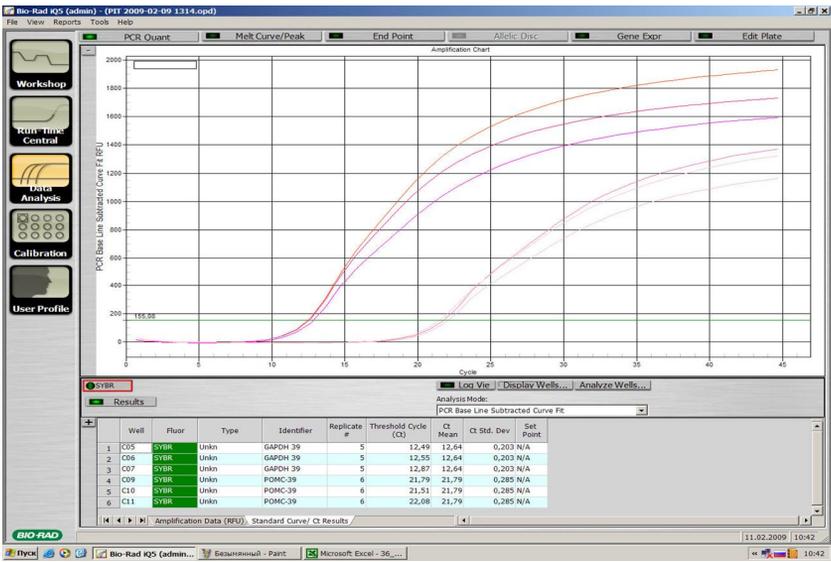


Рис. 69. Примеры графиков количественного анализа нуклеиновых кислот при помощи ПЦР в реальном времени

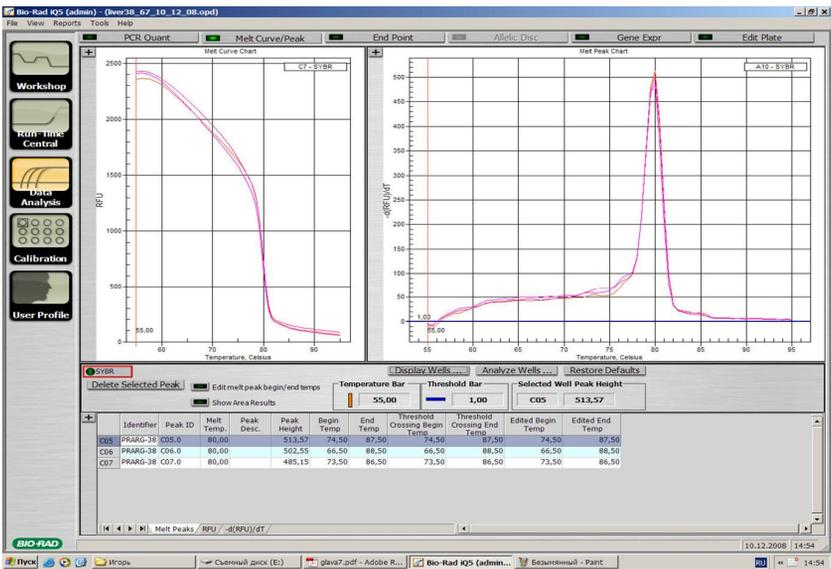


Рис. 70. Примеры кривых плавления при ПЦР в реальном времени

## 6.5. Секвенирование ДНК

Секвенирование нуклеиновых кислот — определение их первичной нуклеотидной последовательности.

В настоящее время для секвенирования широко используется дидезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи», разработанный Ф. Сэнгером в 1977 г. До начала секвенирования производят ПЦР-амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, с использованием в качестве предшественников молекулы дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ддНТФ). При дидезоксисеквенировании происходит гибридизация синтетического олигонуклеотида-праймера длиной 17–25 п.н., поставляющего 3'-гидроксильную группу для инициации синтеза цепи, комплементарной матрице, со специфическим участком одной из цепей секвенируемого фрагмента. Раствор с праймером распределяют по четырем пробиркам, в каждой из которых находятся четыре дезоксинуклеотида – дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ (один из них — меченый радиоактивным изотопом) – и один из четырех 2',3'-дидезоксинуклеотидов (ддАТФ, ддТТФ, ддГТФ или ддЦТФ). Затем проводят один цикл амплификации. Дидезоксинуклеотид включается по всем позициям в смеси растущих цепей, и после его присоединения рост цепи сразу останавливается. В результате этого в каждой из четырех пробирок образуется уникальный набор полинуклеотидов разной длины. В четырех пробирках можно найти последовательности ДНК, различающиеся на 1 нуклеотид. Далее в пробирки добавляют формамид для денатурации фрагментов ДНК и проводят электрофорез в полиакриламидном геле на четырех дорожках. После разделения фрагментов ДНК проводят радиоавтографию, которая позволяет «прочитать» нуклеотидную последовательность секвенируемого сегмента ДНК (рис. 71).

В настоящее время дидезоксинуклеотиды метят четырьмя разными флуоресцентными красителями и проводят ПЦР в одной пробирке. Затем во время электрофореза в полиакриламидном геле луч лазера в определенном месте геля

возбуждает флуоресценцию красителей, и детектор определяет, какой нуклеотид в настоящий момент мигрирует через гель. Современные приборы используют для секвенирования ДНК капиллярный электрофорез (рис. 72).

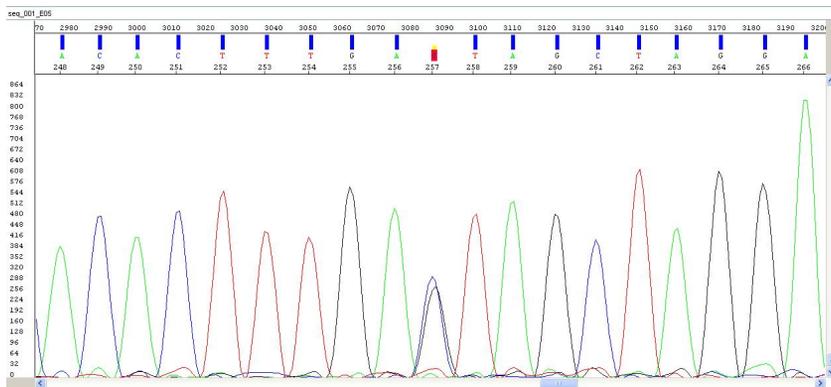


Рис. 72. Электрофореграмма результатов секвенирования фрагмента ДНК. Буквами обозначены соответствующие нуклеотиды: А – аденин, С – цитозин, Т – тимин, G – гуанин, символ S обозначает вариант мононуклеотидного полиморфного сайта (SNP) цитозин – гуанин



Рис. 72. Генетический анализатор АВ 3130 (Applied Biosystems). Прибор используют для секвенирования и генотипирования по молекулярным маркерам

## 6.6. Сборка сиквенсов геномов

Метод дробовика (шотган-секвенирование/клонирование) может быть применен для сборки сиквенсов протяженных фрагментов ДНК, в том числе хромосом и геномов. В этом случае ДНК случайным образом фрагментируют. Полученные мелкие сегменты секвенируют обычными методами, например методом Сэнгера. Полученные последовательности перекрывающихся случайных фрагментов ДНК собирают с помощью специальных программ в одну большую последовательность. Существенную трудность при сборке представляют повторяющиеся последовательности ДНК, так как они имеют участки перекрывания с большим числом фрагментов. Для геномов прокариот и низших эукариот метод дробовика оказался подходящим. Геном человека содержит огромное количество (больше половины) разного типа повторяющихся последовательностей. Поэтому для получения совершенной сборки необходимо применение протяженных геномных клонов.

Сборка при помощи протяженных геномных клонов проводится в несколько этапов. Вначале необходимо создать несколько геномных библиотек с покрытием 5–10 эквивалентов генома (разд. 6.4). Затем клоны организуют в контиги (рис. 73). Контиг – это совокупность взаимно перекрывающихся геномных клонов. Для сборки контигов обычно используют геномный фингерпринтинг. Этот метод подразумевает разрезание ДНК-клонов специальными ферментами – рестриктазами и блот-гибридизацию по Саузерну с использованием в качестве зондов минисателлитных последовательностей (небольших повторов с повторяющейся единицей 7 и более нуклеотидов, имеющих более 1000 сайтов локализации в геноме человека). В результате получается индивидуальный набор гибридизующихся с зондом фрагментов для каждого клона. При этом совпадение длин нескольких фрагментов двух клонов говорит о наличии участка перекрывания. Парное определение участков перекрывания позволяет получить контиг, соответствующий достаточно

протяженному участку хромосомы. Затем методом FISH (разд. 4.5) определяют локализацию контигов на хромосоме. Протяженные геномные клоны фрагментируют с использованием рестриктаз. Полученные последовательности длиной 500–700 п.н. встраивают в плазмидные векторы. Эта процедура называется субклонированием. Затем субклонированные последовательности секвенируют и при помощи компьютерных программ собирают сиквенс всего геномного клона. Объединив сиквенсы геномных клонов, получают сиквенсы контигов, а объединив последние – сиквенсы хромосом (рис. 74). Следует отметить, что некоторые районы хромосом, состоящие почти исключительно из повторов (например, центромерные районы), технически не поддаются клонированию и секвенированию и образуют пробелы (гэпы) на картах геномов.

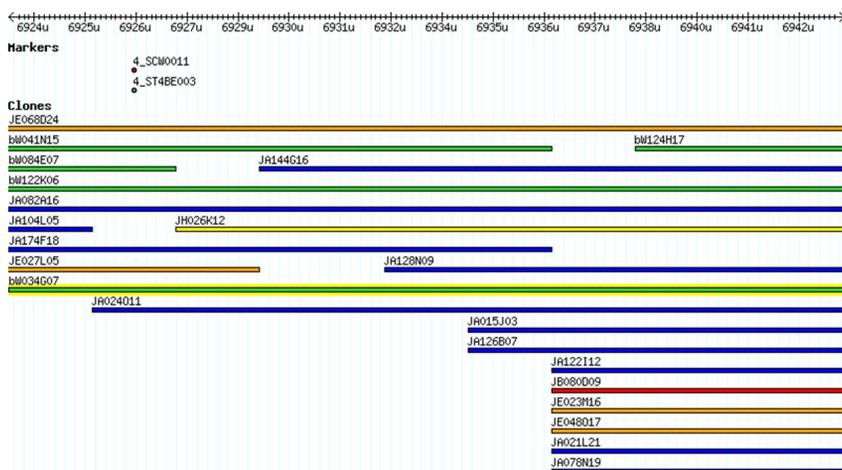


Рис. 73. Образец контига геномных клонов

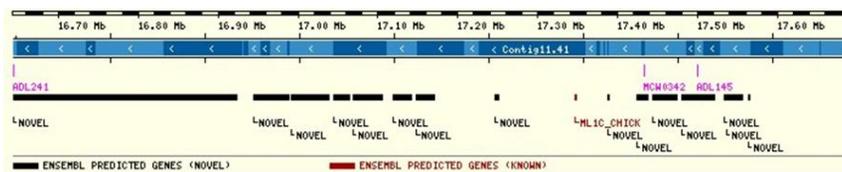


Рис. 74. Фрагмент геномной последовательности

## 6.7. Биоинформатика и системная биология

Биоинформатика или вычислительная биология — один из разделов биологии, предметом которого являются молекулярные процессы, но в данном случае исследования проводятся не *in vitro*, а *in silico*, т. е. не в пробирке, а при помощи компьютеров.

Под биоинформатикой понимают любое использование компьютеров и программного обеспечения для анализа биологических данных. На практике часто это понятие сужается и включает в себя только использование компьютеров для обработки экспериментальных данных по структуре биологических макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) с целью получения биологически значимой информации.

В биоинформатике используются методы прикладной математики, статистики и информатики. Исследования в областях биоинформатики и системной биологии зачастую пересекаются. Основные усилия исследователей, работающих в области биоинформатики, направлены на изучение геномов, анализ и предсказание структуры белков, предсказание взаимодействий различных белков друг с другом и другими молекулами, а также реконструкция процессов эволюции.

Биоинформатика помогает ученым, используя последовательности ДНК, прогнозировать структуры и возможные функции кодируемых ими белковых молекул, и таким образом, связывает геномные и протеомные проекты.

Велика роль биоинформатики в процессе маркирования генов и других объектов в последовательности ДНК.

Эволюционная биология исследует происхождение видов и их развитие с течением времени. Методы биоинформа-

тики активно используются биологами-эволюционистами для решения целого ряда задач:

- изучение эволюции большого числа организмов, включая эволюцию молекул ДНК, а не только строения или физиологии;
- сравнение целых геномов, что позволяет изучать такие явления, как дупликация и горизонтальный перенос генов;
- построение компьютерных моделей популяций с целью предсказания поведения систем во времени.

Системная биология включает в себя целый ряд существующих и перспективных направлений в биологии. Системную биологию можно определить как междисциплинарную науку о жизни, изучающую сложные взаимодействия в живых системах и использующую новый подход в биологии: холизм вместо редукционизма. Задачами системной биологии являются исследование и моделирование свойств сложных биологических систем, которые нельзя объяснить суммой составляющих ее свойств.

Для верификации создаваемых моделей системная биология работает с самыми различными типами экспериментальных данных, описывающих как отдельные составляющие, так и систему в целом. В системной биологии часто используются данные, полученные в других областях биологии: биохимии, биофизике, молекулярной биологии.

Биологические системы являются очень сложными объектами. Для их описания используется огромное количество параметров, переменных и уравнений, а значит, развитие современной системной биологии невозможно без использования компьютерных технологий.

### **Контрольные вопросы и задания**

Заполните пропуски в следующих утверждениях:

1. С целью размножения (амплифицирования) и получения в чистом виде тех или иных генов, фрагменты эукариотической ДНК могут быть встроены в специально подготовленные бактериальные вирусы или плазмиды, называемые \_\_\_\_\_.

2. Отдельная колония бактерий, которая содержит плазмиду с включенным в нее фрагментом ДНК человека или другого живого организма, называется \_\_\_\_\_; набор таких бактерий, представляющий весь геном человека или другого живого организма, составит \_\_\_\_\_.

3. Считается, что мутации, не наследуемые согласно правилам Менделя, проявляют \_\_\_\_\_ и локализованы, по-видимому, в генах органелл.

4. В генах высших эукариот короткие сегменты кодирующей ДНК, которые называются \_\_\_\_\_, обычно разделены длинными последовательностями некодирующей ДНК, которые называются \_\_\_\_\_.

## Глава 7. Геномика

### 7.1. Понятия геномики, транскриптомики и протеомики

Геномика — направление молекулярной генетики, изучающее структурно-функциональную организацию генов и геномов живых организмов.

Геномика сформировалась как особое направление в период создания первых проектов по секвенированию геномов некоторых видов живых организмов в 1980–1990-х гг. Первым был полностью секвенирован геном бактериофага Ф-Х174 (5 368 п.н.). Это событие произошло в 1977 г. В 1995 г. был секвенирован геном бактерии *Haemophilus influenzae* (1,8 млн п.н.). После этого были получены полные сиквенсы геномов еще нескольких видов, включая геном человека (2001 г. — первый черновой вариант, 2003 г. — первый завершённый релиз). Последний по времени релиз – 37.1 – опубликован в августе 2009 г. В нем аннотировано 34533 гена. Хотелось бы отметить, что развитие геномики стало возможно не только благодаря совершенствованию биологических и физико-химических методов, но и появлению более мощной вычислительной техники, которая позволила работать с огромными массивами данных и более совершенного программного обеспечения. Протяженность геномов у живых организмов очень часто измеряется миллиардами пар оснований (геном человека состоит из 3 млрд п. н.), что предполагает необходимость применения существенных компьютерной мощностей для адекватной обработки содержащейся в них информации.

Структурная геномика – раздел геномики, изучающий структуру генов и геномов. Особое внимание уделяется внутреннему строению гена, составу и расположению регуляторных последовательностей, особенностям молекулярной организации хромосом и хромосомных районов, общим принципам структурирования последовательностей геномов.

Функциональная геномика изучает механизмы работы генов и других функционально активных элементов генома. Процессы экспрессии генов и ее регуляции при помощи

близких и удаленных элементов генома находятся в центре внимания этой дисциплины.

Сравнительная (эволюционная) геномика — раздел геномики, предметом которого являются эволюционные отношения генов и геномов. Вопросы гомологии (общности происхождения двух или более структур), эволюционного консерватизма и дивергенции (расхождения в процессе эволюции) наиболее характерны для этого раздела.

Транскриптомика — как следует из ее названия — наука о транскриптоме.

Транскриптомом называют совокупность всех транскриптов, которые синтезируются в одной клетке или группе клеток (в том числе мРНК и некодирующие РНК). Понятие «транскриптом» может обозначать полный набор транскриптов, синтезируемых в данном организме, или специфический набор транскриптов (молекул РНК), представленный в клетках определенного типа.

Если геном у всех клеток одной линии, как правило, одинаков, то транскриптом может быть весьма изменчив и зависит от условий окружающей среды. Понятие «транскриптом» отражает профиль экспрессии генов в данный момент времени, поскольку включает в себя все транскрипты данной клетки. Наиболее часто в экспериментах по изучению транскриптома используют биочипы (метод ДНК-микрочипов, позволяющий анализировать уровни транскрипции десятков тысяч генов одновременно) и полимеразную цепную реакцию в реальном времени, которая позволяет давать точную количественную оценку экспрессии отдельных генов. Существуют базы данных по профилям экспрессии тысяч генов в различных органах и тканях при разных воздействиях (например, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression>).

Протеомика – это наука, изучающая белки и их взаимодействия в живых организмах. Учёные, работающие в области протеомики, исследуют биосинтез, посттрансляционные модификации, взаимодействия белков друг с другом и с другими веществами.

Белки служат для выполнения огромного числа функций в организме, таких, например, как:

- энзимная (ферментная). Многие белки служат катализаторами биохимических реакций, протекающих в живых организмах;

- транспортная. Некоторые белки, такие как гемоглобин, трансферрин и др., переносят различные вещества от одних клеток, тканей и органов к другим;

- структурная. Белки входят в состав подавляющего большинства структурных компонентов клеток и тканей живых организмов. Например, коллаген и эластин обеспечивают фиброзную основу соединительных тканей у животных;

- резервная (запасная) Некоторые белки, такие как казеин, являются главным источником аминокислот для организмов детёнышей млекопитающих;

- регуляторная. Гормоны, принимающие участие в регуляции многих процессов, протекающих в живом организме, по своей химической природе являются белками;

- рецепторная. Существуют белки, встроенные в мембраны клеток, которые распознают химические сигналы, передаваемые другими клетками;

- моторная. Сократимые белки, такие как миозин, который играет большую роль в движении мышц;

- защитная. Белками являются антитела, которые защищают организм от болезней.

Белки синтезируются через посредника – рибонуклеиновую кислоту (РНК), структура которой определяется последовательностью ДНК. Процесс реализации генетической информации о структуре белка или РНК называется экспрессией. Молекулы белков представляет собой высокомолеку-

лярные органические вещества, состоящие из одной или нескольких аминокислотных цепочек. Порядок, в котором выстраиваются аминокислоты, диктуется последовательностью нуклеотидов в ДНК.

Наиболее крупное достижение последних лет – картирование генома человека. По данным последнего релиза (37.1 от августа 2009 г.) в аутосомах находится 32593 генов, в половых хромосомах – 2003 гена и в митохондриях – 37 генов. Количество белков в человеческом организме примерно в 10 раз больше количества генов. По оценкам большинства авторов, их насчитывается более 300 000, а число белок-белковых взаимодействий и вовсе не поддается подсчету. Наиболее известная база данных по протеомике человека: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.

Многие болезни могут быть прослежены до изменений, происходящих на уровне белков. К примеру, известно, что при серповидноклеточной анемии аномальный белок гемоглобин вызывает изменение формы красных кровяных телец. Аномальные эритроциты имеют серповидную форму. Серповидноклеточная анемия обусловлена мутацией, приводящей к замене глутаминовой кислоты на валин в бета-цепи гемоглобина (гемоглобин S). Это заболевание является классическим примером приспособительного значения мутаций – гетерозиготы по замене глутаминовой кислоты на валин в бета-цепи гемоглобина более устойчивы к малярии, поэтому частота ее встречаемости выше в географических районах распространения малярийного плазмодия.

Часто после синтеза (трансляции), для того чтобы выполнять определенные функции в организме, белки требуют модификации. Например, белки, которые вызывают образование кровяных тромбов, остаются неактивными до тех пор, пока не претерпевают соответствующих изменений. Следовательно, неправильная посттрансляционная модификация также является причиной неправильного функционирования белков.

Причина многих заболеваний человека – модификации белков и изменения характера их взаимодействий. Результаты исследований в области протеомики в последние годы все чаще применяются в биофармакологии, которая получила благодаря этому надежный теоретический фундамент. Сегодня более 95 % всех имеющихся на рынке лекарственных средств оказывают свое действие именно на белки. Системные подходы протеомики помогают гораздо эффективнее идентифицировать и оценивать новые целевые белки, а следовательно, ускорить разработку новых диагностических систем и терапевтических средств и сделать их более эффективными.

## ***7.2. Повторяющиеся и уникальные последовательности ДНК***

Последовательности, однократно представленные в геноме, называются уникальными. Более половины генома человека представлено в разной степени повторяющимися последовательностями или повторами. Они могут быть более или менее равномерно распределены по геному (дисперсные повторы) или быть приуроченными к отдельным районам хромосом (консолидированные повторы). К числу последних относят так называемые сателлиты – последовательности, которые при центрифугировании в градиенте плотности составляют отдельный пик (рис. 75). Их назвали сателлитами (спутниками), потому что соответствующий им пик на графике сопутствует основному. У человека, как и у всех млекопитающих, сателлитная ДНК обогащена АТ-парами и имеет меньшую плавучую плотность по сравнению с тотальной ДНК. В прицентромерных районах всех хромосом человека присутствует альфа-сателлитная ДНК или альфоидная ДНК, имеющая длину повторяющейся единицы 171 п.н. Она является основным структурным компонентом центромеры и формирует прицентромерный гетерохроматин. Некоторые различия по нуклеотидной последовательности в разных хромосомах позволяют использовать альфоидную ДНК в ка-

честве хромосомспецифического зонда для FISH (например, при пренатальной диагностике на интерфазных клетках). Встречается индивидуальный полиморфизм числа повторов альфоидной ДНК, не имеющий фенотипического проявления. Бета-сателлитная ДНК, имеющая длину повторяющейся единицы 68 п.н., присутствует в центромерных районах HSA 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 и Y.

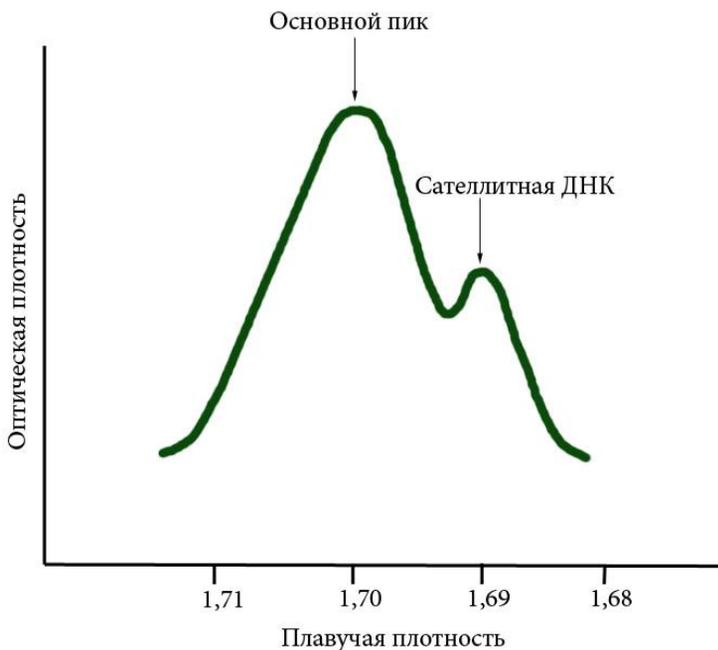


Рис. 75. Сателлитная ДНК

Сателлит 1 (длина повторяющейся единицы 25–48 п.н.) локализован в гетерохроматиновых районах большинства хромосом, сателлиты 2 (5 п.н.) и 3 (5 п.н.) могут быть выявлены практически во всех хромосомах.

Сателлиты представляют собой тандемные повторы (рис. 76) – повторяющиеся единицы следуют друг за другом и одинаково ориентированы. В инвертированных повторах единицы ориентированы в противоположных направлениях (рис. 77)



Рис. 76. Тандемный повтор



Рис. 77. Инвертированный повтор

Кроме классических сателлитов в геноме человека присутствуют мини- и микросателлиты.

Минисателлиты – тандемные повторяющиеся последовательности с единицей 10–60 п.н., имеющей центральный мотив ГПЦАГГА\*Г. Они локализованы более чем в 1500 сайтах и отличаются значительной вариабельностью из-за часто происходящего неравного кроссинговера, что, собственно, характерно для всех тандемных повторов. При блот-гибридизации по Саузерну фрагментированной ДНК с минисателлитными зондами выявляется индивидуальный рисунок – геномный фингерпринт, который может быть использован для идентификации личности и установления отцовства (рис. 78).

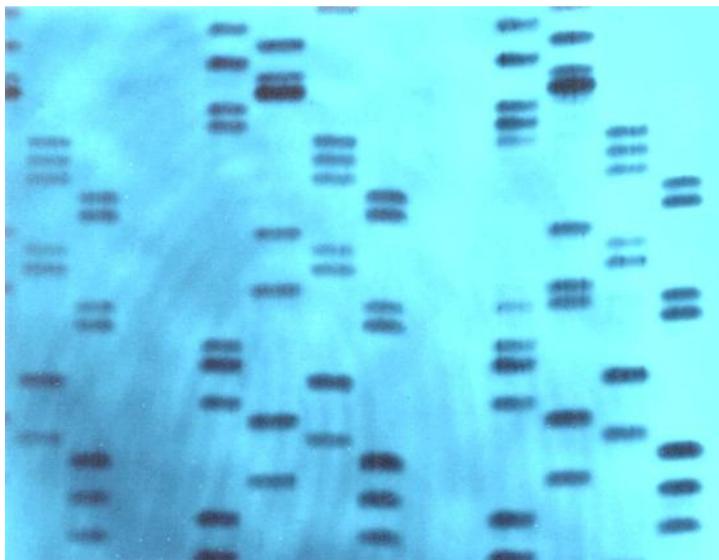


Рис. 78. Пример геномного фингерпринта (фото Science Photo Library)

Микросателлиты – короткие tandemные повторы с длинной повторяющейся единицы 1–6 п.н. Отличаются значительным полиморфизмом и большим числом равномерно распределенных по геному локусов (около 100000). Эти обстоятельства сделали микросателлиты универсальными маркерами для генетического картирования, идентификации личности, установления родства. Поскольку микросателлиты имеют приемлемую для ПЦР-амплификации длину и с двух сторон фланкированы уникальной ДНК (где можно расположить индивидуальные праймеры), процедура определения аллелей таких полиморфных маркеров достаточно проста и поддается автоматизации (рис. 79). Используя разные флуорохромы, можно одновременно в одной пробирке анализировать полиморфизм сразу нескольких микросателлитных локусов. Анализ длин амплифицированных фрагментов обычно проводят при помощи капиллярного электрофореза с лазерным сканированием, что позволяет выявить различия до одного нуклеотида.

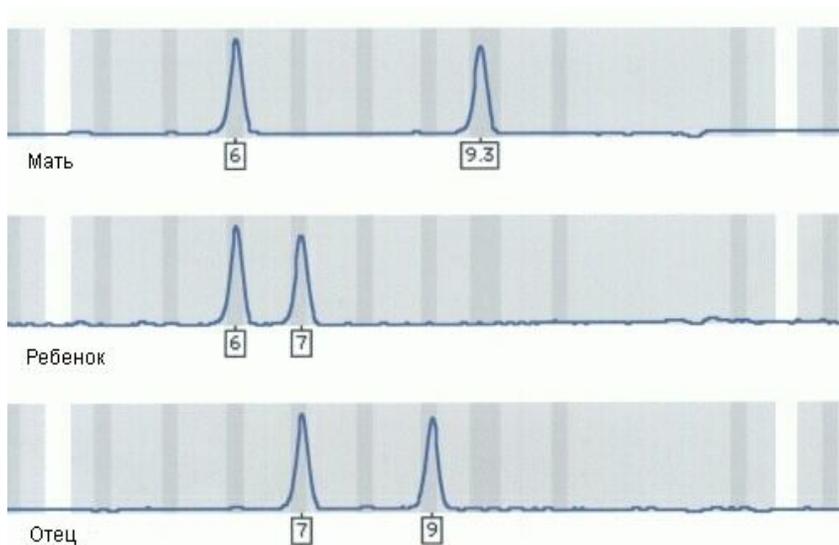


Рис. 79. Результаты анализа длин аллелей одного микросателлитного локуса в пределах семьи

К консолидированным повторам относят также гены рРНК, образующие кластеры (группы повторяющихся единиц) в районах вторичной перетяжки короткого плеча хромосом группы D (HSA 13–15) и группы G (HSA 21 и 22).

В отличие от консолидированных повторов дисперсные повторы расположены поодиночке, в разных участках генома. Одна и та же повторяющаяся единица может находиться в тысячах различных сайтов. К дисперсным повторам относят гены транспортной РНК – транспозоны и псевдогены, не содержащие интронов копии генов, как правило, возникшие путем обратной транскрипции.

Из числа транспозонов в геноме человека наиболее широко представлены длинные интерсперсные повторы (LINE) – 850000 копий и 21 % генома, короткие интерсперсные повторы (SINE) – 1500000 копий и 13 % генома, ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (LTR) – 443000 копий и 8 % генома, и ДНК-транспозоны – 300000 копий и 3 % генома.

К группе LINE относят последовательности длиной около 5 т.п.н., которые содержат промотор, узнаваемый РНК-полимеразой II, ген обратной транскриптазы и иногда гены РНКазы H. На 3'-конце находится сигнал полиаденилирования (AATAAA) и полиА-хвост. У человека имеется только одно семейство повторов LINE – L1.

Короткие интерсперсные повторы (SINE) представляют собой последовательности до 500 п.н. и содержат обратные транскрипты фрагментов тРНК, рРНК и мяРНК. У приматов, в том числе и у человека, значительная часть SINE представлена Alu-повторами, имеющими длину 280 п.н. и не содержащими генов.

На рис. 80 приведена схема классификации уникальных и повторяющихся последовательностей.

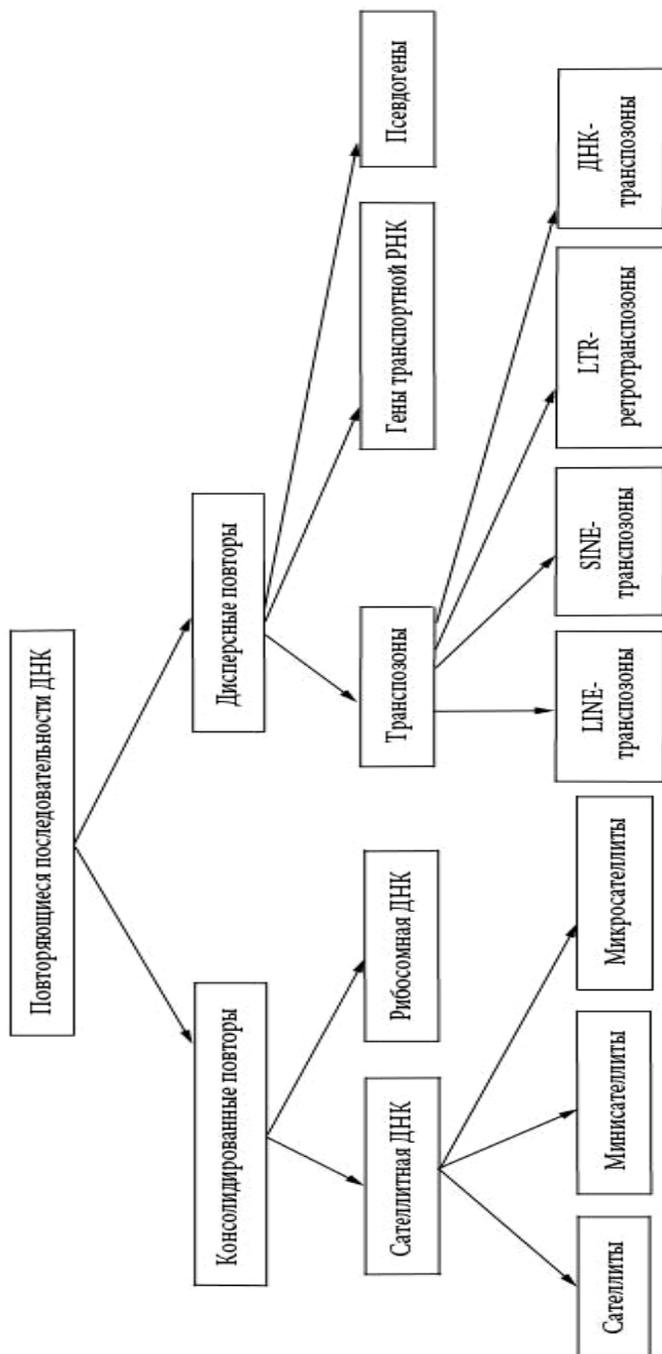


Рис. 80. Повторяющиеся последовательности генома человека

### 7.3. Композиционная гетерогенность

Неоднородность распределения по геному ГЦ- и АТ-обогащенных районов, другими словами, композиционная гетерогенность ДНК – одна из наиболее важных характеристик молекулярной организации геномов.

Более сорока лет назад Бернарди и сотрудники при исследовании генома мыши *Mus musculus* обнаружили, что комплекс ДНК и серебра может быть разделен с помощью равновесного центрифугирования в градиенте плотности  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  по частоте сайтов на молекуле ДНК, связавших серебро. Это открытие позволило с высокой точностью разделять ДНК на фракции. Дальнейшее изучение этих фракций ДНК привело к открытию четкой композиционной гетерогенности ДНК. Композиционно гомогенные сегменты ДНК, принадлежащие к небольшому числу семейств, различающихся по плавучей плотности, были названы изохорами. Фракционирование ДНК по плавучей плотности при центрифугировании фрагментов ДНК в градиенте  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  (или сахарозы) было выявлено у большого числа видов животных. Это отражает гетерогенность ДНК по нуклеотидному составу: АТ-богатые последовательности обладают большей плавучей плотностью, чем ГЦ-богатые. Относительные количества ДНК в семействах изохор формируют так называемый композиционный изохорный паттерн генома (также он называется геномным фенотипом), т. е. характерный «рисунок» из изохор, являющийся специфичным для каждого отряда или семейства.

У человека были выявлены два «легких» семейства изохор: L1 (1,698 г/см<sup>3</sup>) и L2 (1,700 г/см<sup>3</sup>), и три «тяжелых»: H1 (1,704 г/см<sup>3</sup>), H2 (1,708 г/см<sup>3</sup>) и H3 (1,712 г/см<sup>3</sup>). У человека семейства L1 и L2 составляют свыше 62 % всего генома; H1 – 22 %, H2 – 9 %, семейство H3 составляет около 3 % генома.

Наибольшее значение, с точки зрения структурно-функциональной организации генома, имеет вопрос о связи различных семейств изохор с кодирующими последовательностями ДНК и особенностями их экспрессии. В первых исследованиях этого вопроса было показано, что большинство из 40 взятых в анализ генов человека расположены в ГЦ-богатых семействах. Впоследствии локализация *in silico* (путем компьютерного анализа) более 14000 генов человека привела авторов к тому же самому выводу, позднее подтвержденному на еще больших выборках кодирующих последовательностей. На рис. 81 представлена диаграмма, демонстрирующая распределение плотности генов в каждом из семейств изохор у человека.

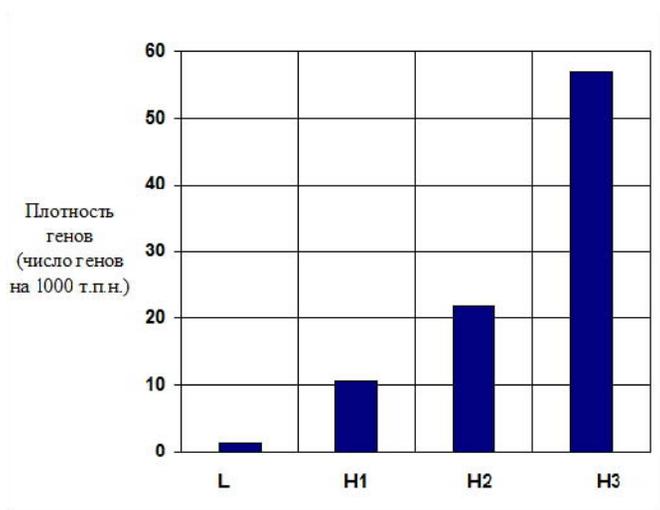


Рис. 81. Плотность генов в различных семействах изохор у человека

Выявление связи временных и межтканевых различий уровня экспрессии генов с ГЦ-уровнем, иными словами, распределения тканеспецифических генов и генов домашнего хозяйства относительно изохор, является не менее важным аспектом характеристики функционального значения компо-

зиционной гетерогенности геномной ДНК. Обобщая данные по структуре хроматина и распределению генов и изохор, Дж. Бернарди в 1993 г. писал: «Скорее всего, наибольший уровень транскрипции встречается в семействе изохор H3, поскольку там концентрация генов, прежде всего генов домашнего хозяйства, является наибольшей». Гипотеза о высокой транскрипционной активности генов, локализованных в семействе H3, подтверждалась и исследованиями нуклеотидного контекста стартовых АУГ-кодонов. Привлечение дополнительного критерия – процентного содержания гуанина или цитозина в третьем положении кодона (ГЦ3-уровень) – помимо молярного отношения ГЦ и АТ (ГЦ-уровень) и статистический анализ последовательностей ДНК из геномных баз данных человека и шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) позволили установить, что гены домашнего хозяйства

- 1) преимущественно локализованы в ГЦ-богатых семействах изохор;
- 2) не составляют большинства генов в ГЦ-богатых семействах изохор;
- 3) являются не менее ГЦ3-обогащенными, чем тканеспецифические гены.

Повышенное содержание кодирующих последовательностей, более высокий уровень рекомбинации, большое число ГЦ-обогащенных коротких интерспесных повторов (SINE) в тяжелых изохорах, в то время как в легких локализовано значительно меньше генов, ниже уровень рекомбинации и находятся почти исключительно ГЦ-обедненные длинные интерсперсные повторы (LINE), дает основание говорить об изохорах как структурно-функциональных единицах организации генома. Границы между тяжелыми и легкими изохорами на примере детально исследованного в отношении композиционного состава на молекулярном уровне кластера

генов гистосовместимости (МНС) человека являются более чем композиционными структурами – временные границы репликации в фазе S клеточного цикла практически точно соответствуют физическим границам локализации изохор.

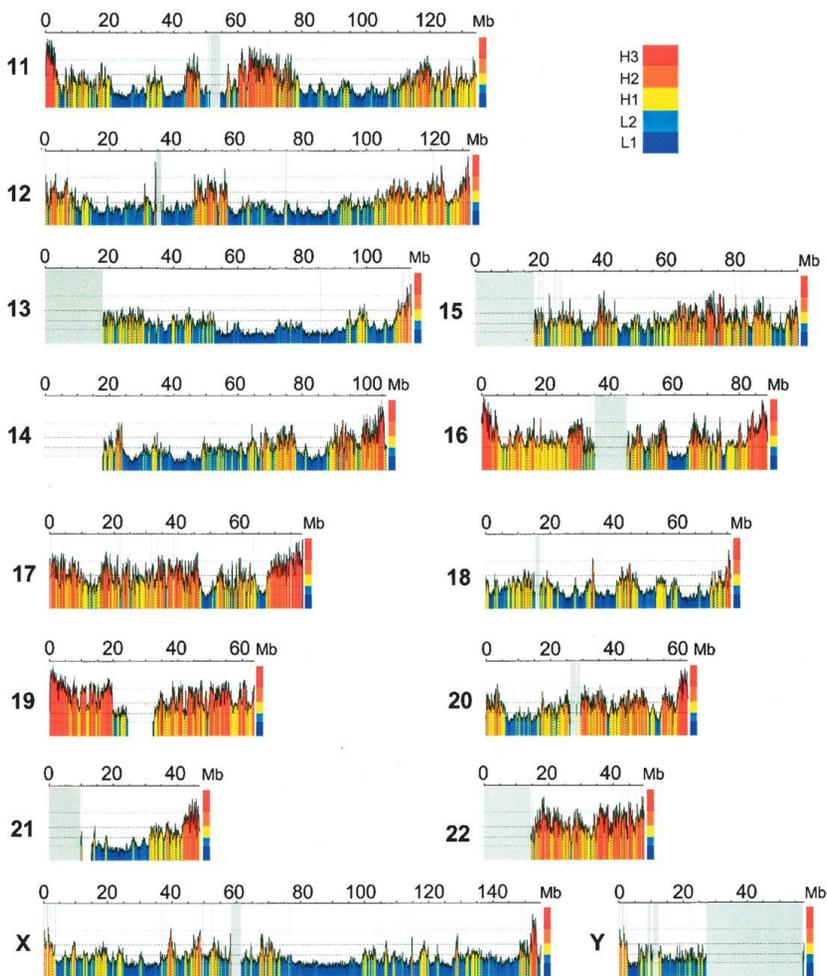
Композиционное картирование – это изучение распределения по длине хромосом различных семейств изохор. Особый интерес представляет соотнесение композиционных и цитогенетических карт хромосом, выявление приуроченности фракций изохор к морфологическим (центромера, теломера) и цитохимическим (G/R-блоки) маркерам. Различают «хромосомное» композиционное картирование (методом гибридизации *in situ* различных фракций изохор на хромосомах в присутствии конкурирующей ДНК, которая позволяет почти полностью исключить неспецифическую гибридизацию повторов) и «молекулярное» – путем локализации генов во фракциях изохор методом ПЦР или блот-гибридизации по Саузерну.

У млекопитающих было показано неоднородное распределение разных семейств изохор. Самые «тяжелые» изохоры НЗ расположены в Т-дисках (преимущественно прителомерные R-диски, с наиболее ярко выраженными структурно-функциональными характеристиками этой группы), которые характеризуются наибольшей концентрацией генов, особенно генов домашнего хозяйства и онкогенов. Наблюдается общая тенденция приуроченности легких фракций к G-дискам (относительно инертные, позднореплицирующиеся, выявляемые при окрашивании красителем Гимзы), где значительно ниже концентрация генов, чем в R-дисках (обратные G-дискам, ранореплицирующиеся, относительно функционально активные), и расположены преимущественно тканеспецифические гены, а тяжелых изохор – к R-дискам. Так, у человека Т-диски пред-

ставлены самым тяжелым семейством изохор H3 и частично семействами H2 и H1, R'-диски (R-диски за исключением из их числа T-дисков) – семейством H1 с минорным участием семейств H2 и H3 и семействами легких изохор L1 и L2, а G-диски – семействами L1 и L2 с минорным компонентом H1. У домовый мыши мажорным компонентом T-дисков являются изохоры семейства H2, R'-диски представлены преимущественно изохорами семейства H1 с незначительным участием L1 и L2, а G-диски – почти исключительно семействами легких изохор L1 и L2. В интерфазных ядрах было показано полярное относительно друг друга расположение наиболее легких и наиболее тяжелых фракций изохор, что, по всей видимости, отражает близость наиболее ГЦ-богатых теломерных районов интерфазных хромосом. На рис. 82 показано распределение изохор по длине хромосом человека. Тонкое физическое картирование изохор на прометафазных хромосомах человека позволило построить композиционные карты высокого разрешения, совмещенные с картами контигов протяженных геномных клонов. Такие карты представлены в сети Интернет (<http://bioinfo2.ugr.es/isochores>), что дает возможность быстро получить композиционную характеристику любого изучаемого района или фланкирующей области любой последовательности генома человека.



A.



Б.

Рис. 82. Распределение изохор по длине хромосом человека:  
 А. HSA1-10; Б. HSA11-HSAY\*

\* См: Genome Researches. 2006. V. 16. P: 536-541.

#### 7.4. Ортология и паралогия

Полагают, что в ходе ранней эволюции часто происходили дубликации генов, что привело к быстрой дивергенции и специализации ферментативных реакций, определивших разнообразие жизненных форм на Земле. Увеличение размеров геномов, возникновение новых ферментативных реакций, формирование цитоскелета, появление комплексных путей метаболизма считают прямыми следствиями генной дубликации.

Понятие «гомология» применяют по отношению к двум структурам или последовательностям (нуклеотидным или аминокислотным), которые развились из одной предковой структуры или последовательности. Чтобы классифицировать различные типы гомологии принято использовать термины «ортология» и «паралогия». Ортологическими называются структуры или последовательности двух различных организмов, которые произошли из одной предковой структуры или последовательности, совсем не обязательно сохраняя функции их предшественника. Поскольку проследить эволюцию структур или последовательностей на практике не всегда представляется возможным, обычно эволюционный консерватизм структур или последовательностей служит основанием для того, чтобы считать их ортологическими. Пример ортологии –  $\beta$ -цепи глобина человека и домового мыши. Понятие «паралогия» относится к структурам или последовательностям, возникшим в результате дубликации. Обычно это понятие применяют к гомологичным структурам или последовательностям в пределах одного генома. Например,  $\beta$ -цепь глобина человека является паралогом  $\alpha$ -цепи глобина и миоглобина человека, поскольку они все произошли в результате последовательных дубликаций. Для серий паралогичных районов, которые могут считаться происшедшими от одного предкового района, предложен термин «паралогон». Копаралогам называются гены, принадлежащие к одному паралогону, независимо от того, являются ли они между собой паралогами или нет. Общий

предок районов, входящих в один паралогон, называется «протопаралогон».

Два раунда крупномасштабных дупликаций произошли в ходе ранней эволюции позвоночных животных согласно так называемой гипотезе 2R (другое название – модель «один-к-четырем»). Следовательно, каждый ген должен быть представлен четырьмя гомологичными последовательностями в каждом геноме. Процессы дивергенции и специализации могли существенно изменить структурные и функциональные характеристики гомологов, а дупликации и делеции – их число. Наличие большого числа паралогичных нуклеотидных последовательностей, представленных двумя или тремя генами, свидетельствует о возможной массовой потере генов после двух раундов дупликации в соответствии с вышеизложенной гипотезой. Локализация в паралогонах и сходство последовательностей двух или нескольких молекул ДНК может служить основанием для поиска их общего предшественника, как это показано на примере генов семейства WNT (гомологов wingless-type генов дрозофилы) человека.

Вопрос о том, насколько физическая кластеризация (локализация в одном хромосомном районе) отражает функциональную кластеризацию нуклеотидных последовательностей и, следовательно, возможна ли коэволюция функционально-специализированных районов хромосом, обсуждается в течение последних десяти лет. Активация отдельных районов хромосом в определенных клеточных линиях может быть объяснением природы паралогичных районов. Например, гены ацетилхолинэстеразы и тироглобулина имеют гомологию нуклеотидных последовательностей и расположены вблизи от генов нейропептида Y (HSA 7) и панкреатического полипептида Y (HSA 17) соответственно. Таким образом, два гена из паралогичного района хромосомы 7 экспрессируются в клетках нервной системы, а два гена соответствующего района хромосомы 17 – в клетках иммунной системы. Анализ распределения генов, кодирующих белки, вовлеченные в различные функциональные комплексы, по длине хромосом человека позволил установить соответствие

некоторых паралогионов блокам генов, вовлеченных в один каскад реакций. Таким образом, паралогия может быть связана с функциональной специализацией отдельных районов хромосом. С другой стороны, могут присутствовать механизмы, обеспечивающие дифференциальную экспрессию паралогионов в различных клеточных линиях. Данные сравнительного изучения паралогических районов хромосом человека и дрозофилы послужили основанием для гипотезы коэволюции функциональных кластеров.

Гены нескольких семейств (плазминогенные активаторы, анкирины, рецепторы ростовых факторов фибробластов, ад-ренергические рецепторы, везикулярные моноамин-транспортеры, липопротеин липазы), представленные в четырех районах хромосом человека – HSA 4p16, HSA 5q33-q35, HSA 8p12-p21, HSA 10q24-q26 – оказались представлены в геномах позвоночных, включая костистых рыб, в виде консервативных паралогионов. В то же время у иглокожих, насекомых и нематод указанные семейства представлены одним геном. Интересно, что у плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и нематоды (круглого червя) *Caenorhabditis elegans* гомологи генов этих семейств сцеплены. Предполагают, что протопаралогон существует со времени происхождения многоклеточных животных. На примере гомеозисных генов семейства НОХ и инсулиноподобных белков показано, что скорее всего тетраплоидизация имела место на рубеже цефалохордовые – черепные.

В настоящее время известно 15 паралогионов человека (серий паралогических районов, имеющих происхождение от одного предкового района) (рис. 83), которые включают более 1700 генов, что составляет около 5 % от общего числа генов человека. Большинство генов, входящих в паралогионы, представляют обширные семейства, такие как иммуноглобулины, ольфакторные рецепторы, антигены гистосовместимости и т. д.

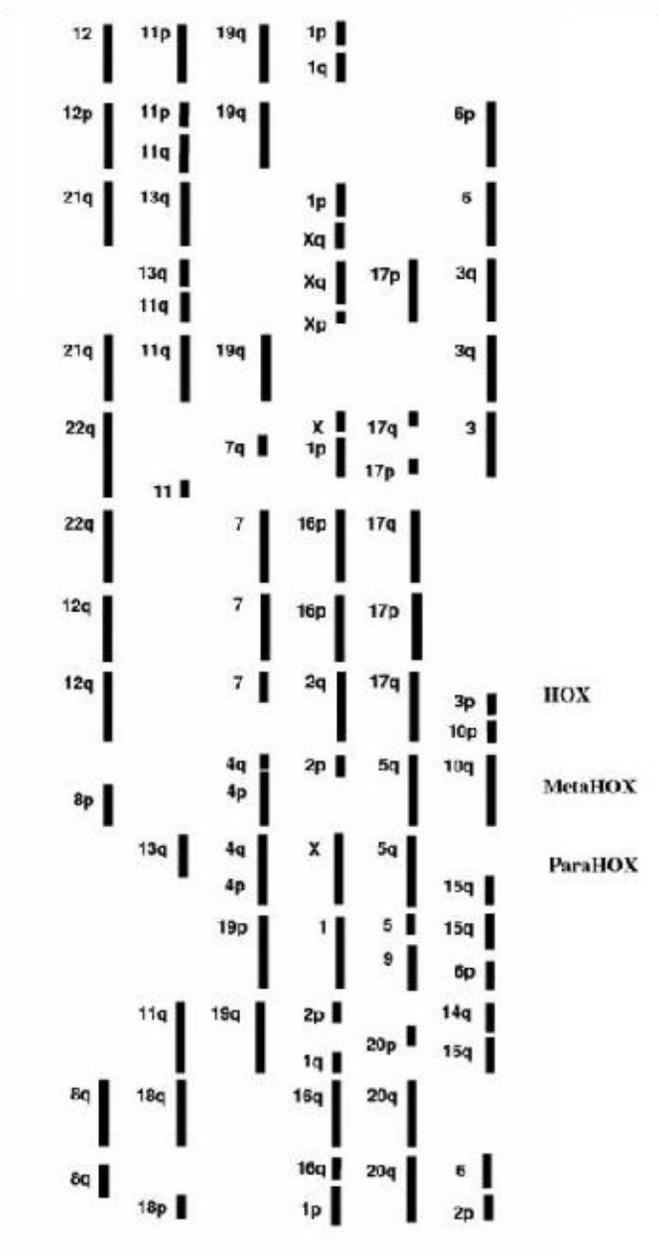


Рис. 83. Обобщенная карта паралогинов человека.

Обращает на себя внимание тот факт, что районы хромосом расположены по четыре – в соответствии с 2R-гипотезой\*

\* См.: FEBS Letters, 2001, V. 491, P.: 237-242.

На основании паралогии картирование генома может проводиться быстрее – зная локализацию одного представителя семейства генов и паралогию этого хромосомного района другим районам, можно предсказать три наиболее вероятных сайта локализации другого представителя того же генного семейства. Зная локализацию двух или трех генов семейства, можно предсказать соответственно два или один возможный район локализации.

Наряду с традиционными морфологическими подходами к изучению эволюционных отношений и механизмов данные сравнительного картирования хромосом позволяют делать выводы о путях эволюции. В этом случае участки хромосом разных организмов можно рассматривать как морфологические структуры, которые могут проявлять отношения гомологии и аналогии между собой. Быстрый прогресс геномного картирования, преимущественно на различных видах млекопитающих, позволил применить указанный подход и выявить неожиданно высокий уровень эволюционного консерватизма хромосомных районов. Среди животных наиболее подробно феномены ортологии изучены в геномах человека и домового мыши. Выявлено 202 района ортологии, которые включают более 1800 кодирующих последовательностей\*. Наиболее детальная информация об эволюционном консерватизме хромосомных районов может быть получена при сравнении полностью секвенированных геномов или хромосом различных видов. В этом случае становится возможным выявление точек разрыва ортологии хромосомных районов с точностью до нуклеотида. Сравнение полной нуклеотидной последовательности хромосомы 16 домового мыши (хромосома мыши *Mus musculus* обозначают MMU, например, MMU 16) и генома человека позволило охарактеризовать на моле-

---

\* URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Homology>

кулярном уровне эволюционный консерватизм MMU 16 и HSA 3, HSA 8, HSA 12, HSA 16, HSA 21, HSA 22. Хромосома 16 была выбрана для сравнения, поскольку было известно, что есть протяженный участок ее гомологии (около 25 млн пар оснований) с хорошо охарактеризованной хромосомой 21 человека. В отношении кодирующих последовательностей ДНК с неизвестной функцией (ESTs) принят критерий ортологичности – более 80 % гомологии нуклеотидной последовательности на протяжении более 100 пар оснований. В данной работе показан эволюционный консерватизм локализации 11 822 кодирующих последовательностей со средним значением идентичности нуклеотидной последовательности 88,1 % и средней длиной ортологичных генов 198 пар оснований. В среднем на каждые 8 тыс. пар нуклеотидов приходился один консервативный маркер.

Эволюционный консерватизм состава кодирующих последовательностей в ортологичных районах может быть выявлен при помощи стандартных методов физического картирования. Сравнение между собой крупномасштабных последовательностей различных геномов позволяет установить наличие консерватизма порядка расположения генов по отношению друг к другу на участках, трудноразрешимых для обычных методов. В случае когда три последовательности в пределах короткого интервала на хромосоме расположены в том же порядке, что и гомологичные им последовательности на хромосоме другого вида, это их отношение определяется как «консерватизм синтении». Оказалось, что блоки консервативной синтении человека и домовой мыши могут включать от нескольких до нескольких сот генов, причем отмечается в среднем больший физический размер синтенных блоков человека. Суммарная длина синтенных блоков на MMU 16–92 млн пар оснований, а в ортологичных ей районах хромосом человека – 108 млн пар оснований.

Помимо, безусловно, большого значения для теоретической биологии феномен ортологии оказался очень полезен для картирования геномов, поскольку, основываясь на консерватизме изучаемых районов, можно экстраполировать данные по картированию генома более изученного в этом отношении вида на менее изученный. Поскольку в настоящее время наиболее изученным видом является человек, выявление ортологии нуклеотидных последовательностей и хромосомных районов любого вида позвоночных животных и человека имеет особое значение.

### *7.5. Геномные базы данных*

Геномные базы данных представляют собой электронные библиотеки и служат для обобщения и хранения информации о генах, геномах, генотипах, фенотипах и любых данных, имеющих отношение к наследственности. Как правило, доступ к ним неограничен. С любого компьютера, подключенного к сети Интернет, можно проводить поиск информации как исходя из названия гена или мутации, так и исходя из фенотипического признака (например, наследственного заболевания).

Наиболее полная и упорядоченная информация по геному человека хранится на портале NCBI – [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), который поддерживается сотрудниками Национальных институтов здоровья США (National Institutes of Health).

Поиск по фенотипам обычно начинают с базы данных OMIM ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)), интерфейс которой показан на рис. 84. Название фенотипического признака позволяет получить сведения о различных генах, связанных с его проявлением, их локализации на хромосомах, известных мутациях. Справа находится гиперссылка на связанные ресурсы – можно получить нуклеотидную и аминокислотную после-

довательности, узнать в каких тканях и на каких стадиях происходит экспрессия, есть ли альтернативный сплайсинг, существуют ли коммерческие средства диагностики. Также можно узнать названия и адреса лабораторий, где проводят молекулярные тесты для данного фенотипа.



Рис. 84. Интерфейс базы данных OMIM

База данных PubMed (рис. 85) содержит названия, сведения об авторах и резюме наиболее значимых научных публикаций по биологии и медицине. Поиск проводится по ключевым словам, фамилиям авторов и выходным данным публикации.

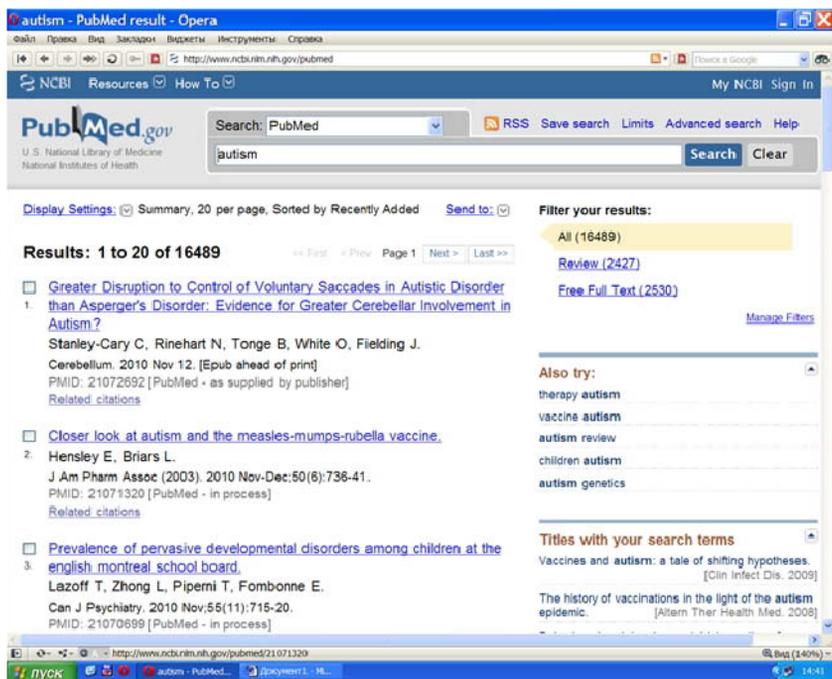


Рис. 85. Интерфейс базы данных PubMed

Если требуется собрать все сведения об имеющейся нуклеотидной последовательности, можно воспользоваться системой поиска BLAST (рис. 86). Параметры поиска можно варьировать, исходя из целей исследования. Все последовательности, имеющие гомологию с изучаемой, принципиально могут быть обнаружены таким образом. Гиперссылки в правом верхнем углу позволят получить информацию о хромосомной локализации, экспрессии, процессинге генов, имеющих гомологию с исходной последовательностью.

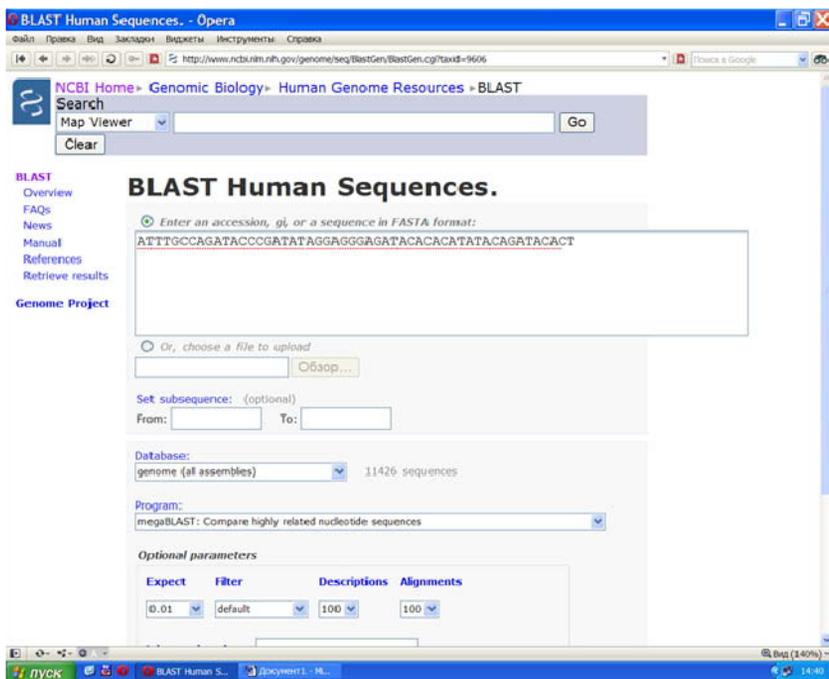


Рис. 86. Интерфейс поисковой системы BLAST

Карты хромосом с возможностью поиска по названию или символу маркера, а также по отдельным хромосомным районам, находятся в разделе MapViewer ([www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview)) (рис. 87).

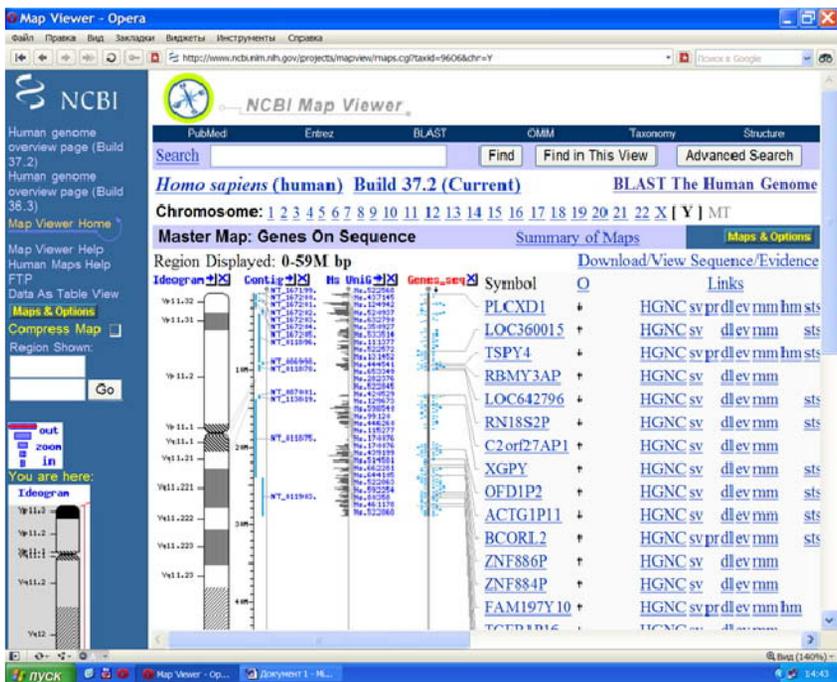


Рис. 87. Интерфейс системы MapViewer

### Контрольные вопросы и задания

1. Микросателлиты относятся к группе:

- А) дисперсных повторов;
- Б) консолидированных повторов;
- В) транспозонов.

2. На рис. 88 представлены данные геномного фингер-принтинга. Определите родственных индивидуумов.

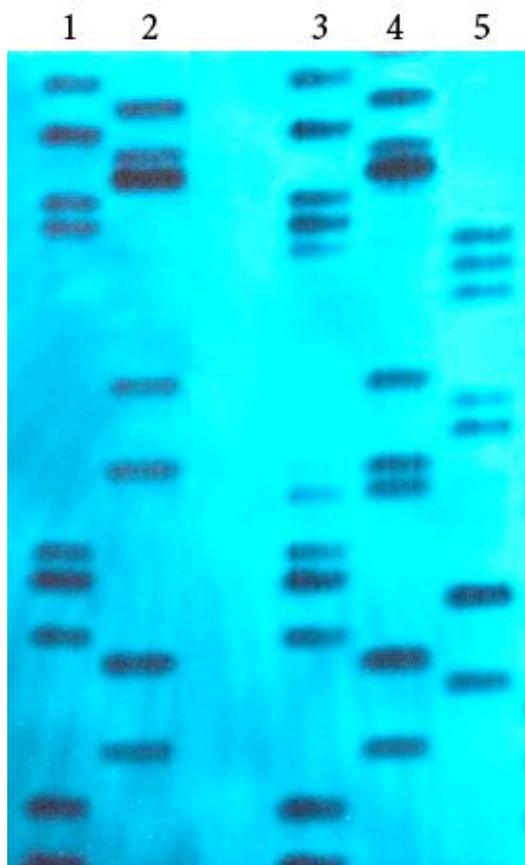


Рис. 88. Данные геномного фингерпринтинга (для задачи 2 к гл. 7)

3. Формальный отец ребенка сомневается в своем биологическом отцовстве. Справедливы ли его опасения по данным микросателлитного анализа, приведенным на рис. 89?

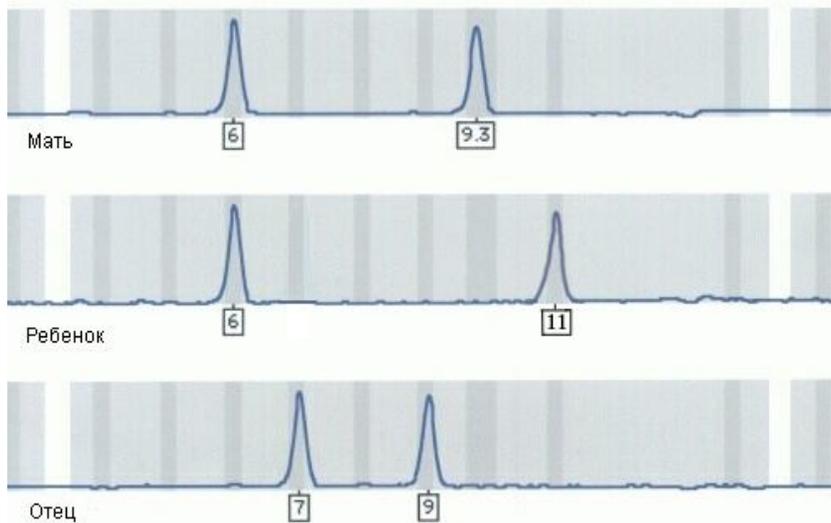


Рис. 89. Данные микросателлитного анализа (для задачи 3 к гл. 7)

4. Поиск по нуклеотидным последовательностям лучше проводить в системе:

- А) BLAST;
- Б) OMIM;
- В) PubMed.

## Глава 8. Генетическая изменчивость

### 8.1. Понятие и классификация генетической изменчивости

Под изменчивостью подразумевается свойство живых организмов изменять свои признаки. Ее принято подразделять на модификационную изменчивость, при которой не происходит изменения генотипа организма или клетки, изменяется только проявление генов, и генетическую, которая связана с изменением генотипа в результате мутаций (мутационная изменчивость, разд. 3.10) или перекомбинированием генов (комбинационная изменчивость). Комбинационная изменчивость организмов определяется кроссинговером, независимым расхождением хромосом во время мейоза и случайным сочетанием хромосом во время оплодотворения. Мутации – наследуемые изменения генетического аппарата. Обычно их подразделяют на геномные, хромосомные и генные. В двух последних случаях изменения происходят внутри хромосом или внутри отдельных генов соответственно. Под геномными мутациями понимают изменения числа хромосом.

### 8.2. Рекомбинация

Генетическая рекомбинация – процесс, при котором происходит разрыв молекулы нуклеиновой кислоты (обычно ДНК, но возможно и РНК) и соединение с другой молекулой ДНК. Рекомбинация может происходить как между сходными молекулами ДНК – гомологичная рекомбинация, так и между различающимися – негомологичная рекомбинация. У эукариот рекомбинация происходит в процессе мейоза в ходе кроссинговера и иногда в соматических клетках. Процесс кроссинговера приводит к появлению потомков с комбинациями генов, отличными от родительских, и появлению новых химерных аллелей. У организмов, имеющих адаптивную иммунную систему, имеется особая система рекомбинации,

благодаря которой быстро образуется большое разнообразие лимфоцитов, способных узнавать новые антигены. В генной инженерии под рекомбинантной ДНК понимают молекулы, полученные в результате искусственно осуществленной рекомбинации молекул ДНК, часто принадлежащих разным видам. Лучшим примером такого подхода является получение рекомбинантных белков, нашедших свое применение в фармакологии и медицине. Этот метод очень важен для биомедицинских исследований, поскольку позволяет изучать эффекты определенных генов. В процессе рекомбинации задействовано множество различных ферментов, называемых рекомбиназами.

В мейозе в процессе кроссинговера происходит рекомбинация между спаренными гомологичными хромосомами, унаследованными от каждого из родителей. В ходе профазы I все четыре хроматиды расположены достаточно близко друг от друга, так что две хроматиды могут перекрещиваться одна с другой, и в этот момент может происходить обмен генетической информацией в гомологичных сайтах.

### *8.3. Геномные мутации*

Если изменение числа хромосом кратно гаплоидному числу хромосом (например, у человека – 23, у собаки – 39, у дрозофилы – 4), то такие геномные мутации относят к полиплоидиям, если изменение не кратно гаплоидному числу хромосом (например, одна дополнительная или одна недостающая хромосома) – к анеуплоидиям. Полиплоидию, связанную с кратным увеличением гаплоидного числа хромосом одного вида называют автополиплоидией. Если происходит кратное увеличение хромосомных наборов разных видов, говорят об аллополиплоидии.

Полиплоидия значительно чаще встречается среди растений, чем среди животных. Обычно полиплоидные растения отличаются увеличенными размерами клеток и органов, изменением сроков цветения и плодоношения, усиленным синтезом ряда химических веществ.

Анеуплоидия – геномная мутация с некратным гаплоидному набору изменением числа хромосом. У диплоидных организмов наличие дополнительной хромосомы называют трисомией по определенной хромосоме (например, синдром Дауна у человека – трисомия по HSA21), отсутствие какой-то хромосомы – моносомией, а отсутствие обеих гомологичных хромосом – нуллисомией.

#### **8.4. Внутрихромосомные перестройки**

Внутрихромосомные перестройки или аберрации подразделяют на несколько типов:

- делеция – утрата участка хромосомы (обозначается «del») (рис. 90);
- дефиценси – концевая делеция (обозначается знаком разрыва «:») (рис. 91);
- дупликация – удвоение участка хромосомы (обозначается «dup») (рис. 92);
- амплификация – многократное повторение участка хромосомы (обозначается «amp») (рис. 93);
- инсерция – вставка дополнительного хромосомного района (обозначается «ins») (рис. 94);
- парацентрическая инверсия – поворот на 180° участка хромосомы, не содержащего центромеры (обозначается «inv») (рис. 95);
- перичцентрическая инверсия – поворот на 180° участка хромосомы, содержащего центромеру (обозначается «inv») (рис. 96);
- транслокация – перенос участка с одной хромосомы на другую (обозначается t и знаком разрыва-слияния «::») (рис. 97);
- реципрокная транслокация – обмен участками между негомологичными хромосомами (обозначается «tcr») (рис. 98);
- робертсоновская транслокация – слияние двух акроцентрических хромосом с образованием одной (суб)метацентрической (рис. 99). Механизм, как правило, та-

кой: происходит обмен плечами между двумя акроцентрическими хромосомами, приводящий к появлению двух (суб)метацентрических хромосом, состоящих только из длинных плеч вовлеченных в обмен акроцентриков, и только коротких. Поскольку хромосома, составленная из коротких плеч, исчезает в ходе первых же после возникновения перестройки клеточных делений, единственным результатом Робертсоновской транслокации является появление новой (суб)метацентрической хромосомы. Обозначается «rob».

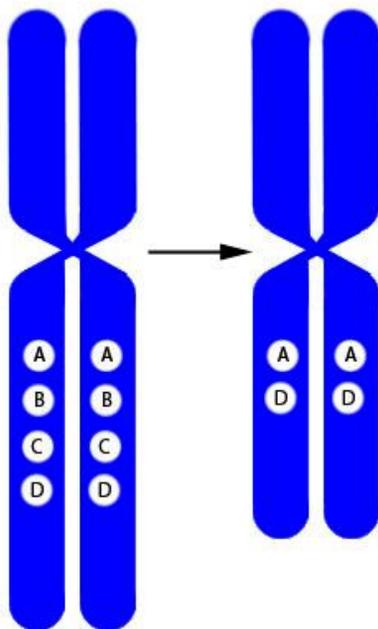


Рис. 90. Схема делеции

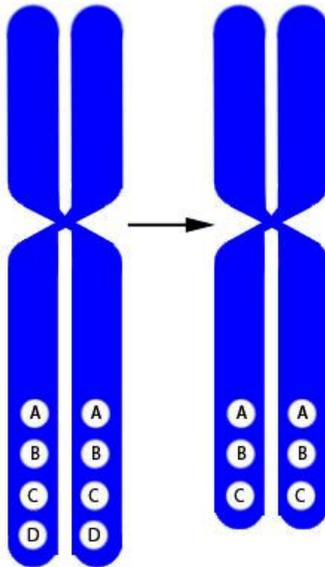


Рис. 91. Схема дефишенси

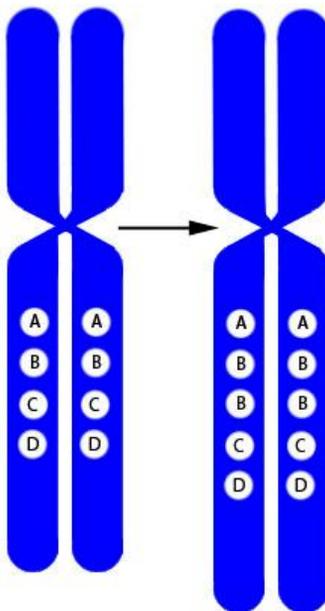


Рис. 92. Схема дупликации

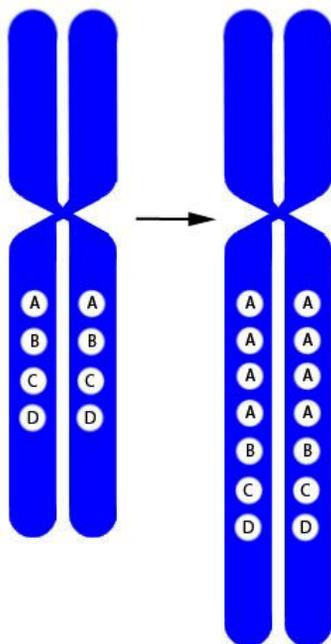


Рис. 93. Схема амплификации

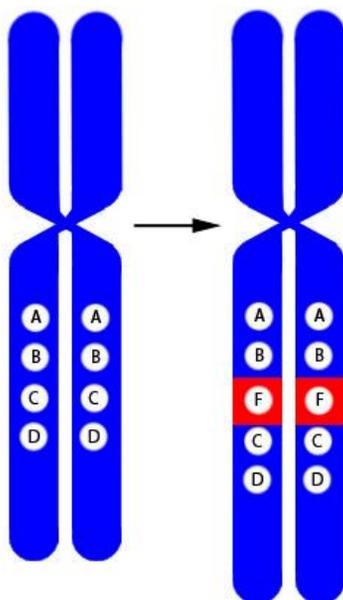


Рис. 94. Схема инсерции

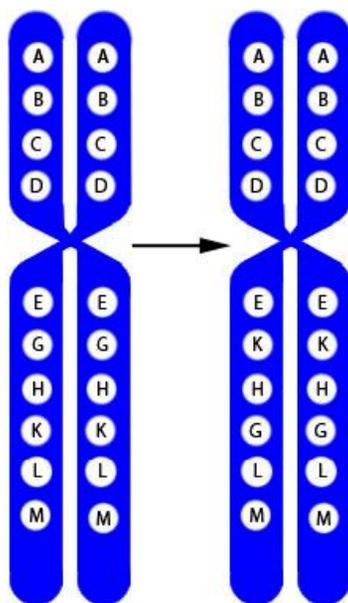


Рис. 95. Схема парацентрической инверсии

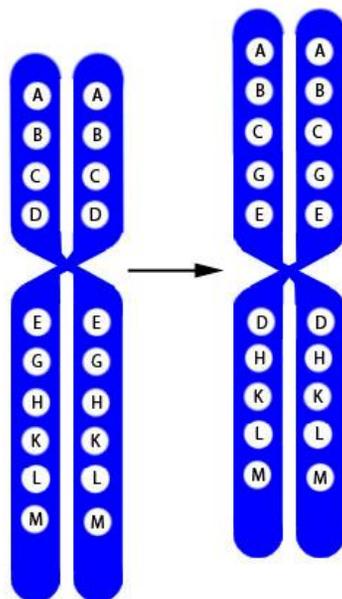


Рис. 96. Схема перичесентрической инверсии

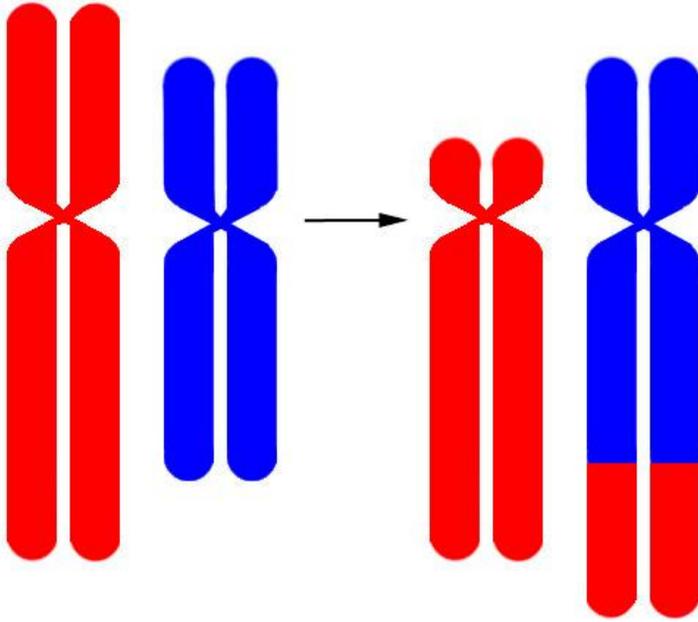


Рис. 97. Схема транслокации

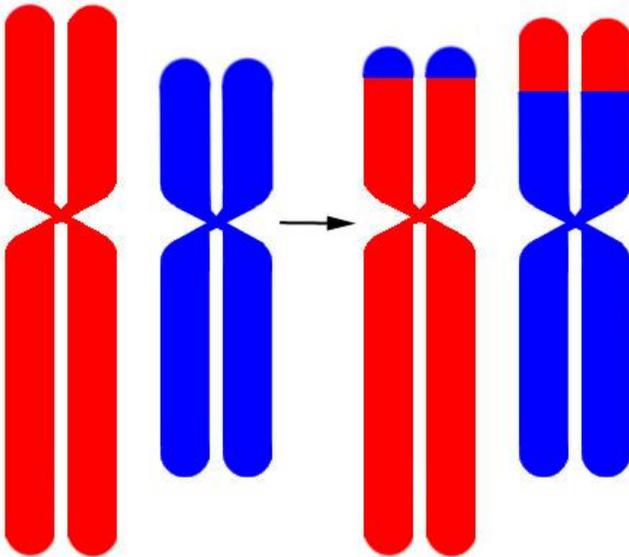


Рис. 98. Схема реципрокной транслокации

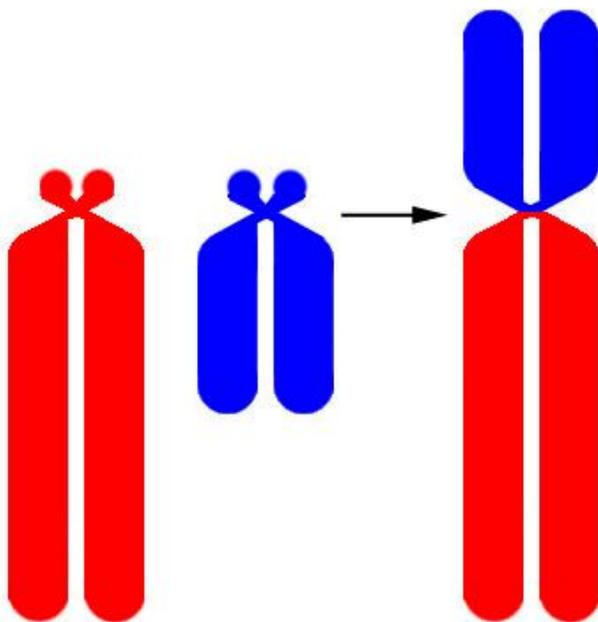


Рис.99. Схема робертсоновской транслокации

*Примеры:*

46, XY, del (10) (q11 → q21) – мужской кариотип с делецией района 10q11-21;

46, XX, del 5p- – женский кариотип с делецией короткого плеча хромосомы 5;

inv 9 (p11; q13) – перичентрическая инверсия в хромосоме 9;

inv 5 (q21; q31) – парацентрическая инверсия в хромосоме 5;

5q33: – дефиценсы длинного плеча хромосомы 5, разрыв расположен в районе 5q33;

t (2; 5) (q21; q31) – реципрокная транслокация хромосом 2 и 5. Разрывы и воссоединения произошли в районах 2q21 и 5q31. Эту же транслокацию можно записать более подробно:

t (2; 5) (2pter → 2q21 :: 5q31 → 5qter; 5pter → 5q31 :: 2q21 → 2qter).

Иногда при цитогенетическом анализе выявляются изо-хромосомы, состоящие из одинаковых плеч – только коротких или только длинных (рис. 100). Такая aberrантная хромосома обозначается «i».

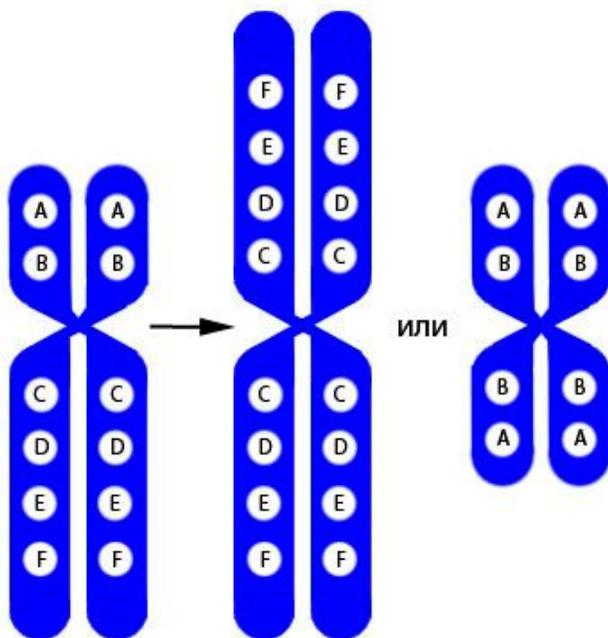
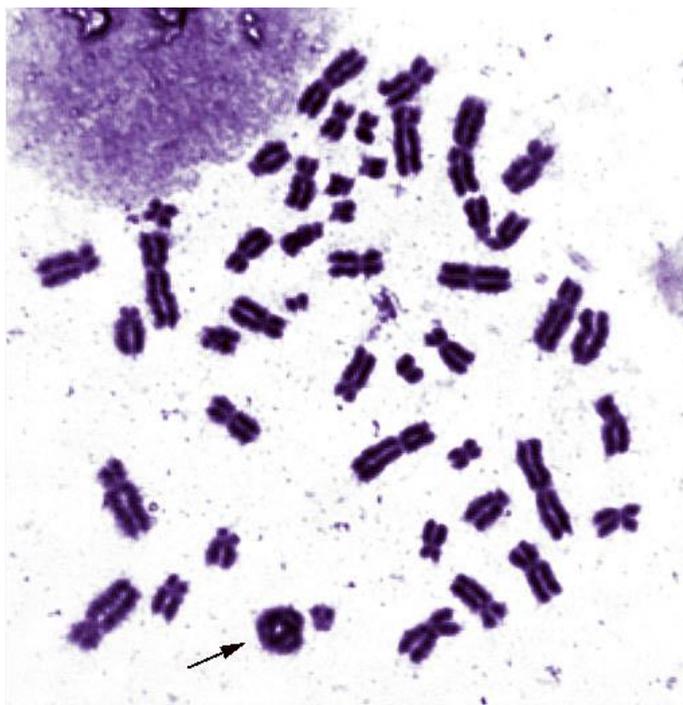


Рис. 100. Схема изохромосомы

Делеции концевых районов обоих плеч иногда приводят к формированию кольцевой хромосомы (обозначается «r») (рис. 101).

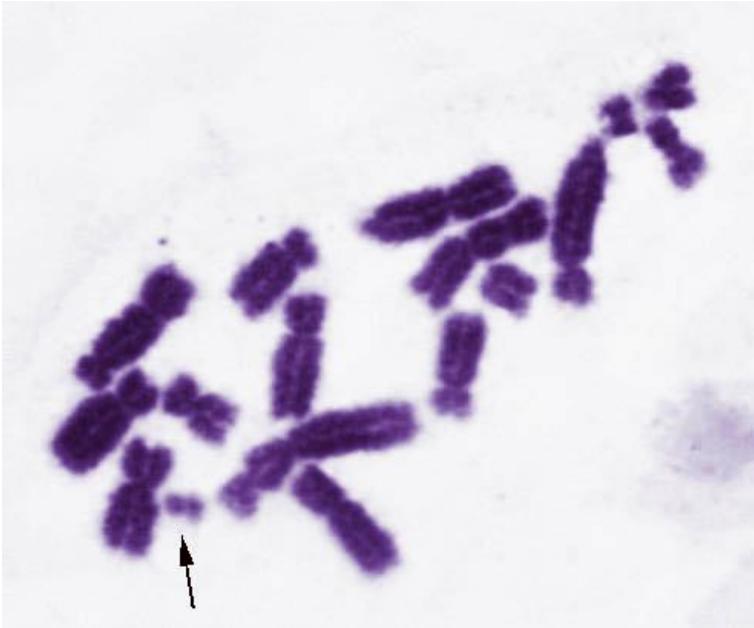


*Рис. 101.* Кольцевая хромосома в кариотипе человека  
(фото Е.Г. Нероновой)

Хромосомы с двумя центромерами (дицентрические хромосомы) (рис. 102) и хромосомные фрагменты без центромеры (ацентрические фрагменты) (рис. 103) возникают при нарушении спаривания гомологичных хромосом в мейозе у гетерозигот по парацентрическим инверсиям. Обычно в ходе нескольких митотических делений ацентрические фрагменты теряются, а дицентрики формируют характерные «мосты» в анафазе и разрываются, образуя в интерфазе микроядра – хроматиновые тельца в цитоплазме. Подобного рода перестройки могут происходить и в соматических клетках под воздействием сильных мутагенов (например, радиации).



*Рис. 102.* Дидцентрическая хромосома в кариотипе человека  
(фото Е.Г. Нероновой)



*Рис. 103.* Ацентрический фрагмент в кариотипе человека  
(фото Е.Г. Нероновой)

В некоторых популяциях человека широко распространены перичентрические инверсии  $inv\ 9\ (p11; q13)$  (рис. 104) и  $inv\ 10\ (p11; q21)$  (рис. 105), не имеющие фенотипического проявления, хотя некоторые авторы указывают на возможность снижения фертильности у их носителей, поскольку инверсии затрудняют конъюгацию гомологичных хромосом у гетерозигот и подавляют кроссинговер на своих участках.

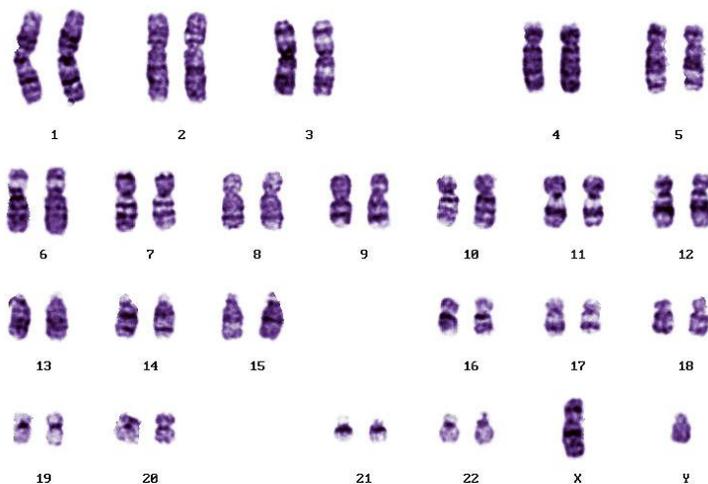


Рис. 104. Перичентрическая инверсия HSA9 (фото Е.Г. Нероновой)

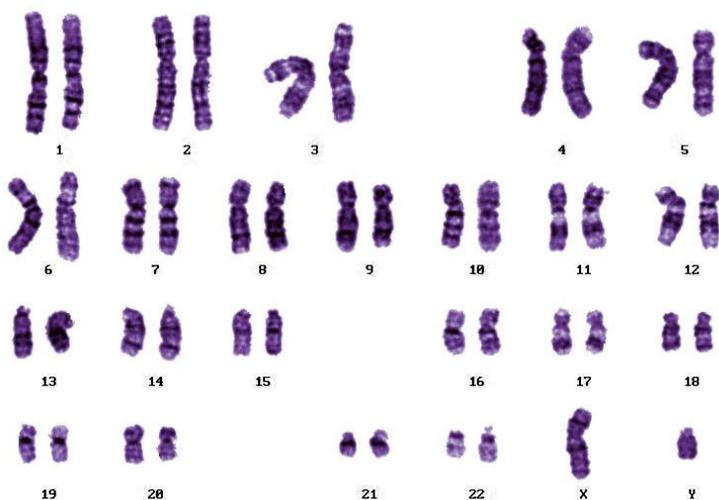


Рис. 105. Перичентрическая инверсия HSA10 (фото Е.Г. Нероновой)

В популяциях человека часто встречается полиморфизм (биологическое разнообразие) длины гетерохроматиновых районов, в том числе вторичных перетяжек. Такие изменения принято обозначать  $h+$  – увеличение гетерохроматинового района (в том числе вторичных перетяжек) по сравнению с нормой и  $h-$  – уменьшение. Как правило, фенотипического эффекта такие полиморфные варианты не имеют.

*Примеры:*

46, 15  $ph+$  – увеличение длины вторичной перетяжки в коротком плече хромосомы 15;

46, 21 $ph-$  – уменьшение длины вторичной перетяжки в коротком плече хромосомы 21;

46, XY, Y $qh+$  – увеличение гетерохроматинового района Y-хромосомы;

46, XX, r (D) – женский кариотип, содержащий одну кольцевую хромосому из группы D;

46, X, i (Xp) – женский кариотип, в котором одна X-хромосома нормальная, а другая – изохромосома, состоящая из короткого плеча.

### **8.5. Генные мутации**

Генные мутации принято подразделять на спонтанные (самопроизвольно возникающие в течение всей жизни организма в условиях окружающей среды, являющихся нормальными для данного организма) и индуцированные – возникающие под воздействием неблагоприятных условий окружающей среды или в ходе экспериментов в лабораторных условиях. Частота возникновения спонтанных мутаций колеблется в пределах  $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  на нуклеотид за клеточную генерацию.

В живой клетке постоянно происходят такие процессы, как репликация ДНК, репарация ДНК и генетическая рекомбинация, в ходе которых постоянно возникают мутации. К возникновению мутаций приводят спонтанные изменения химической структуры нуклеотидов, которые происходят при репликации. Так например, при дезаминировании цитозина

в одной из цепей ДНК образуется урацил. В этом случае вместо канонической пары оснований ГЦ появляется пара ГУ. В дальнейшем в процессе репликации в новую цепь комплементарно урацилу включается уже аденин, и образуется пара АУ, а в следующем цикле репликации она заменяется на каноническую пару АТ. Таким образом, происходит транзиция – точечная замена одного пиримидина на другой пиримидин. Аналогично происходит и замена одного пурина на другое пуриновое основание.

Из всех рекомбинационных процессов мутации чаще всего происходят в ходе неравного кроссинговера. Как правило, неравный кроссинговер происходит в тех участках хромосом, где локализуется несколько копий одного и того же гена, возникших в результате дупликации или мультипликации и сохранивших высокую степень гомологии. В результате неравного кроссинговера в одной из хромосом появляется делеция некоторого участка, а в другой – его дупликация.

В течение жизни любой клетки довольно часто происходят спонтанные повреждения ДНК. Для того чтобы устранять эти повреждения, существуют особые ферментные системы – системы репарации. Если по каким-либо причинам в работе систем репарации происходит сбой, возникают мутации. Мутации могут появляться и в генах, кодирующих сами ферменты систем репарации, что приводит к резкому повышению (мутаторный эффект) или снижению (антимутаторный эффект) частоты мутаций других генов. У человека известно заболевание пигментная ксеродерма, при котором под действием ультрафиолетового облучения возникают дерматиты, а позднее и злокачественные новообразования кожи. Причиной данного заболевания является мутация, в результате которой нарушается работа системы репарации.

Существенно увеличить частоту мутаций могут не только изменения в системах ферментов репарации клетки, но и многие другие факторы, которые называются мутагенными. Различают химические вещества (вызывающие мутации, например, нитрозометилмочевина, этиленимин и др.), физические (ионизирующее и ультрафиолетовое излучения, высокая

температура и т. д.) и биологические (ретровирусы, ретротранспозоны) мутагены.

Генные мутации встречаются чаще, чем другие типы мутаций. Генные мутации представляют собой замены, делеции и вставки одного или нескольких нуклеотидов, транслокации, дубликации и инверсии различных частей гена. Мутация, затрагивающая только один нуклеотид, называется точковой. Замены одного нуклеотида другим называются транзициями (замена пурина на пурин или пиримидина на пиримидин) или трансверсиями (замена пурина на пиримидин или наоборот). Последствия точковых мутаций могут быть различными. Если в результате замены нуклеотида смысл кодона сохраняется из-за вырожденности генетического кода, то такая замена называется синонимической. Нуклеотидная замена может изменить смысл кодона и привести к замене соответствующего данному кодону аминокислотного остатка в полипептидной цепи (миссенс-мутация). В результате замены одного нуклеотида возможна также преждевременная терминация трансляции из-за образования бессмысленного кодона: амбер — УАГ, охра — УАА или опал — УГА. Подобные мутации называются также нонсенс-мутациями. Возможны также мутации, приводящие к замене стоп-кодонов на смысловые.

Из-за триплетности генетического кода, в случае если происходит делеция или вставка числа нуклеотидов, не кратного трем, происходит сдвиг рамки считывания, обесмысливающий трансляцию.

Следует различать первичную (прямую) мутацию и реверсию или обратную мутацию, т. е. такую мутацию, которая восстанавливает исходную структуру гена. Однако не всегда фенотипическая реверсия бывает обусловлена обратной мутацией. Подобное явление может быть обусловлено супрессорной мутацией, которая может произойти как в другой области того же самого гена (интрагенная супрессорная мутация), так и в другом неаллельном гене (экстрагенная супрессорная мутация). Некоторые мутации кардинально изменяют процессы, протекающие в клетке. Такая клетка, как правило,

распознается системами контроля гомеостаза (постоянства внутренней среды организма), происходит запуск программ апоптоза (программируемой клеточной смерти), и клетка погибает. Если по каким-то причинам измененная клетка не была элиминирована, она дает начало новой популяции клеток с измененным генотипом и, как следствие с новыми функциями. Если подобная мутация произошла в соматической клетке, то это может привести к развитию злокачественных или доброкачественных новообразований. Если в генеративной клетке – к появлению новых организмов с совершенно иными свойствами.

Подавляющее большинство мутаций приводят к снижению жизнеспособности организмов и клеток вплоть до их гибели. Однако очень редко происходят мутации, которые приводят к появлению у мутантных особей полезных признаков и оказывают положительное влияние на приспособленность к условиям среды. Такие мутации являются средством адаптации клеток и организмов к условиям окружающей среды и называются адаптационными.

Мутации, затрагивающие «молчащие» участки генома, и синонимические нуклеотидные замены обычно не имеют фенотипического проявления. Их можно обнаружить только с применением современных молекулярно-биологических методов. Принимая во внимание тот факт, что подавляющее большинство мутаций являются спонтанными, частоту возникновения мутаций можно считать величиной постоянной. На этом основано изучение мутаций в «молчащих» генах с целью исследования филогении (путей эволюции) различных видов, в том числе и человека. Результаты исследований мутаций, затрагивающих митохондриальный геном, и наследующихся исключительно по материнской линии, а также мутаций, локализующихся в Y-хромосоме, которые наследуются только по мужской линии, находят широкое применение в эволюционной биологии и этногенетике.

## 8.6. Репарация ДНК

Репарация — исправление повреждений в молекулах ДНК, возникших из-за ошибок ДНК-полимеразы в процессе репликации или вследствие воздействия физических или химических агентов. Процессы репарации осуществляются специальными ферментными системами клетки. Дефекты ферментов систем репарации приводят к развитию ряда наследственных заболеваний, таких как пигментная ксеродерма.

Имеется по крайней мере две ферментные системы репарации — прямая и эксцизионная. При прямой репарации задействованы специфические ферменты, быстро (обычно в одну стадию) устраняющие соответствующее повреждение, восстанавливая исходную структуру нуклеотидов. Это наиболее простой путь устранения повреждений ДНК. Так действует, например, Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, которая переносит метильную группу с азотистого основания на один из собственных остатков цистеина.

Эксцизионная репарация заключается в удалении (эксцизии) повреждённых азотистых оснований из ДНК с последующим восстановлением нормальной структуры молекулы.

Системы репарации включают следующие компоненты:

- фермент, способный узнавать изменённые участки в цепи ДНК и делать надрез цепи вблизи повреждения;
- фермент, удаляющий повреждённый участок;
- фермент (ДНК-полимераза), синтезирующий соответствующий участок цепи ДНК взамен удалённого;
- фермент (ДНК-лигаза), восстанавливающий непрерывность полимерной цепи.

## 8.7. Генная конверсия

Генная конверсия — процесс, при котором информация последовательности ДНК передается (переносится) с одной нити ДНК, которая остается неизменной, на другую нить ДНК, последовательность которой изменяется. Это один из механизмов генных мутаций. Генная конверсия может быть причиной менделевского наследования.

Такая конверсия одной аллели в другую происходит по причине репарации неправильно спаренных оснований в ходе рекомбинации. При конъюгации одной из четырех нитей с другой из гомологичной хромосомы репарация неправильно спаренных оснований может пройти по матрице другой хромосомы, что приводит к замене аллеля (рис. 106).

В норме диплоидный организм несет по одному аллелю от каждого из родителей (соотношение гамет в мейозе 1A:1a у гетерозиготы). При конверсии это соотношение изменяется (3A:1a, 1A:3a, 5A:3a или 3A:5a). Генные конверсии могут быть причиной наследственных заболеваний.

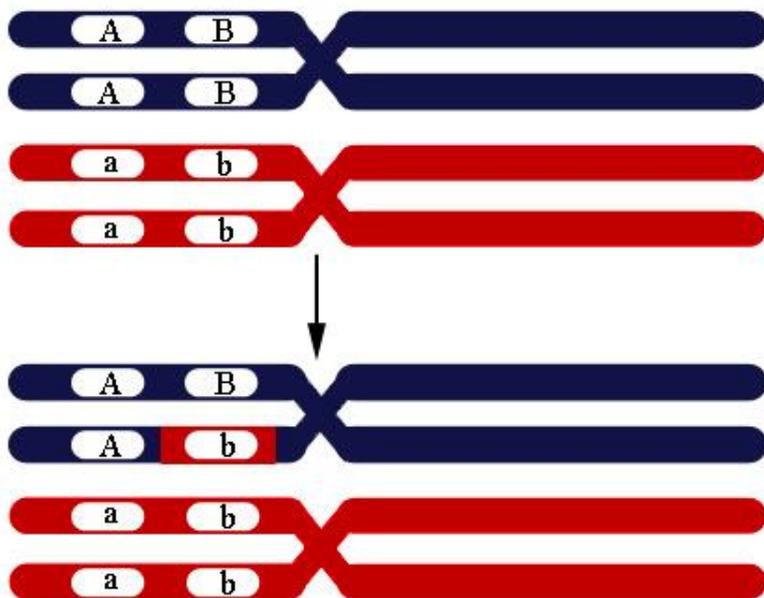


Рис. 106. Конверсия генов

## 8.8. Подвижные элементы генома

Мобильные генетические элементы (МГЭ) представляют собой участки ДНК, способные перемещаться по геному. К ним относятся:

- транспозоны – последовательности ДНК, способные перемещаться при помощи транспозиции;
- плазмиды – кольцевые хромосомные ДНК бактерий;
- бактериофаги – вирусы бактерий;
- интроны группы 2 – обладающие автокаталитической способностью рибозимы (ферментативная РНК).

Для млекопитающих из всех МГЭ наиболее характерны транспозоны. Транспозон – это последовательность ДНК, которая способна перемещаться внутри генома в результате процесса, который называется транспозицией. Встраиваясь в геном, транспозоны могут вызывать различные мутации, в том числе и хромосомные перестройки. Транспозоны обычно состоят из двух прямых или инвертированных повторяющихся последовательностей ДНК, между которыми находятся гены, необходимые для транспозиции. Иногда в составе центральной части транспозонов находятся гены, которые обеспечивают эволюционное преимущество для организма, содержащего мобильный элемент. Различают два класса транспозонов: к первому относят ретротранспозоны, перемещение которых по геному происходит путём обратной транскрипции, второй класс – ДНК-транспозоны, перемещающиеся путём прямого вырезания и вставки с использованием фермента транспозазы.

Транспозоны могут играть важную роль в геноме организма. Так, например, некоторые гены-регуляторы, обеспечивающие адекватную реакцию растений на изменения освещенности, появились в результате встраивания в их геном транспозонов. Транспозоны могут быть причиной дестабилизации генома. Не менее 80 % мутаций являются следствием активности этих мобильных элементов.

## Контрольные вопросы и задания

1. Прочитайте кариологический диагноз:

а) 46, XX, t (1; 22), (q24; q12);

б) 46, XX, inv 7 (p11; p13);

в) 47, XY, +22, r (5);

г) 48, XXYY;

д) 46, XX, inv 4 (q11; q21);

е) 45, X, inv X (p11; q13);

ж) 46, XY, i (4q);

з) 48, XX, +21, +16p+;

и) 45, X, 22ph+.

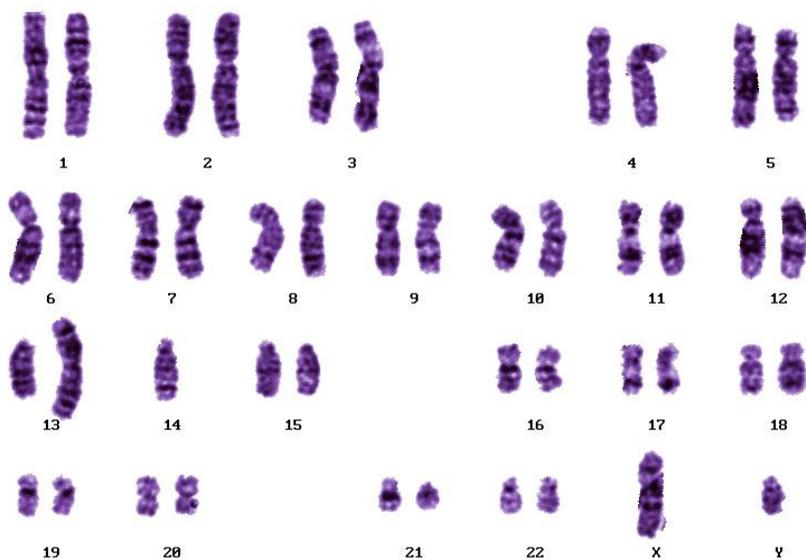
2. Поставьте кариологический диагноз на основе фотографий митотических хромосом на рис. 107.



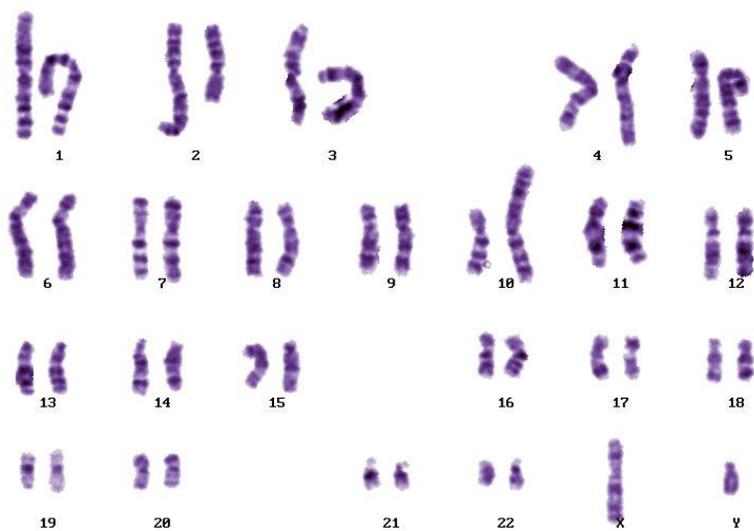
А.



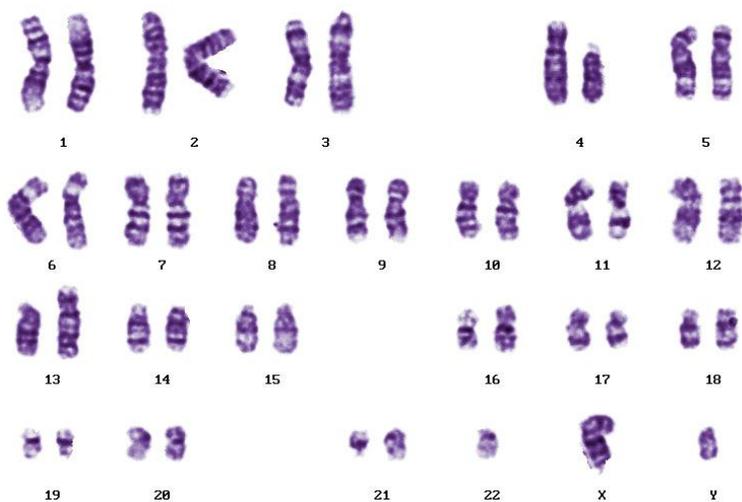
Б



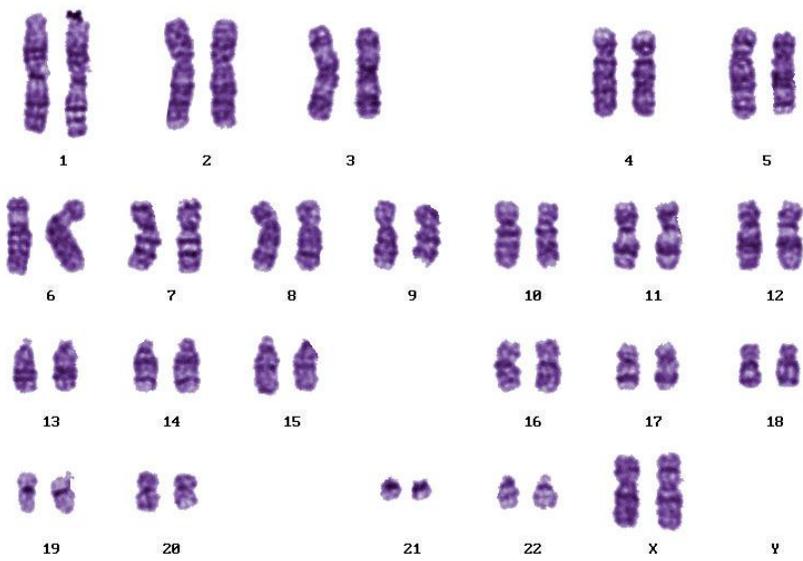
В.



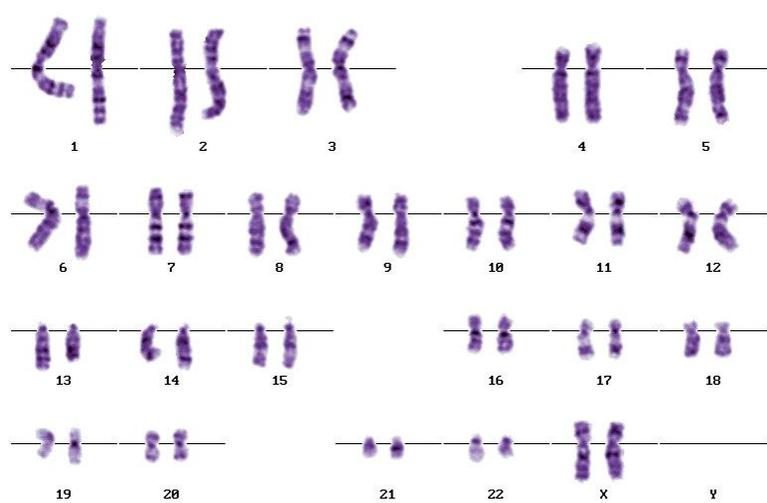
Γ.



Δ.



Е.



Ж.

Рис. 107. Фотографии фрагментов метафазных пластинок (для задачи 2 к главе 5) (фото Е.Г. Нероновой)

## Глава 9. Основы популяционной генетики

Популяционный метод имеет особое значение в генетике человека, поскольку он позволяет изучать гены и генотипы без постановки скрещиваний. В основе этого метода лежит закон, сформулированный в 1908 г. английским математиком Г. Харди и немецким врачом В. Вайнбергом независимо друг от друга, и названный законом Харди-Вайнберга. Условия для выполнения этого закона следующие:

- популяция должна иметь неограниченный размер (быть достаточно многочисленной по меркам статистики);
- генотип по изучаемым генам не должен влиять на выбор брачного партнера (скрещивание должно быть свободным, т. е. не ассортативным);
- миграция не должна существенно изменять генотип популяции;
- должен отсутствовать отбор по аллелям изучаемых генов.

В большинстве популяций человека для большинства признаков эти условия соблюдаются. Исключения, когда закон Харди-Вайнберга не может выполняться:

- островные, отдаленные и высокогорные популяции, где из-за небольшого числа особей случайные факторы могут повлиять на частоты аллелей;
- избирательность (ассортативность) связей, приводящих к рождению детей. Например, в США браки белых мужчин с белыми женщинами и черных мужчин с черными женщинами встречаются намного чаще, чем смешанные.
- иммиграция большого числа носителей редких в популяции генотипов;
- гены, аллели которых по-разному влияют на жизнеспособность и репродуктивную функцию.

Если частота в популяции доминантного аллеля  $A$  составляет  $p$ , то частота рецессивного аллеля  $a$  будет  $q = 1 - p$ . Согласно первому положению закона Харди-Вайнберга эти значения будут неизменны из поколения в поколение (при условии выполнения требований, изложенных выше) – это состояние генетического равновесия в популяции. Соотноше-

ние равновесных частот генотипов будет определяться возведением соотношения частот аллелей в квадрат – это второе положение закона. И согласно третьему положению закона Харди-Вайнберга равновесие частот генотипов достигается за одно поколение и остается неизменным. Математически он может быть записан следующим образом:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2, \text{ где}$$

$p$  – частота доминантного аллеля  $A$ ;

$q$  – частота рецессивного аллеля  $a$ ;

$p^2$  – частота генотипа  $AA$  (доминантные гомозиготы);

$2pq$  – частота генотипа  $Aa$  (гетерозиготы);

$q^2$  – частота генотипа  $aa$  (гомозиготных рецессивов).

#### *Пример*

Одна из форм альбинизма (отсутствия пигментации кожи, радужной и пигментной оболочек глаза) у человека обусловлена редким рецессивным аллелем  $a$  (мутация в гене тирозиназы). В некоторой популяции частота альбиносов равна 0,0001. Тогда,

$$q - \text{частота рецессивного аллеля } a - \sqrt{0,0001} = 0,01;$$

$$p - \text{частота доминантного аллеля } A - 1 - 0,01 = 0,99;$$

$$p^2 - \text{частота генотипа } AA \text{ (доминантные гомозиготы)} - 0,99^2 = 0,98;$$

$$2pq - \text{частота генотипа } Aa \text{ (гетерозиготы)} - 2 \times 0,99 \times 0,01 = 0,02.$$

Из примера видно, что гетерозигот по гену альбинизма в популяции в 200 раз больше, чем альбиносов.

В случае множественного аллелизма используют аналогичные расчеты.

#### *Пример*

В популяции индусов I группа крови встречается с частотой 0,314, II – 0,189, III – 0,410, IV – 0,087.

Пусть частота аллеля  $I^0$  –  $r$ , аллеля  $I^A$  –  $p$ , аллеля  $I^B$  –  $q$ .

Тогда носителей генотипа  $I^0 I^0$  (I группа) будет  $r^2$ . Таким образом,

$$r^2 = 0,314;$$

$$r = \sqrt{0,314} = 0,560.$$

Общая частота аллелей  $I^A$  и  $I^B$  ( $p + q$ )  $= 1 - r = 1 - 0,560 = 0,440$

Суммарная частота групп крови I и III равна  $(q + r)^2$ . Таким образом,

$$(q + r)^2 = 0,314 + 0,410 = 0,724$$

$$(q + r) = \sqrt{0,724} = 0,851$$

$$q = 0,851 - 0,560 = 0,291$$

$$p = 1 - q - r = 1 - 0,291 - 0,560 = 0,149.$$

Итак, частоты аллелей групп крови системы АВО в популяции индусов следующие:  $I^0 - 0,560$ ,  $I^A - 0,149$ ,  $I^B - 0,291$ .

В большинстве популяций наблюдается дрейф генов – изменение частот аллелей под влиянием случайных факторов. Эффект бутылочного горлышка – случайной гибели носителей того или иного генотипа при существенном снижении размера популяции – является наиболее частой причиной дрейфа генов. В небольших популяциях можно встретить эффект основателя – когда одна особь (почти всегда мужчина, например Чингизхан) оставляет огромное число потомков, вследствие чего изменяется соотношение частот аллелей и генотипов.

Исходя из закона Харди-Вайнберга нетрудно убедиться, что отбор против гомозиготных рецессивов неэффективен: элиминация (устранение)  $q^2$  носителей генотипа  $aa$  не влияет существенно на частоты аллелей. Большинство носителей рецессивного аллеля являются гетерозиготами. В этом причина генетического груза в популяциях человека – значительного числа гетерозиготных носителей летальных (приводящих к смерти) аллелей и аллелей, связанных со снижением жизнеспособности и репродуктивной функции. Понятие генетического груза является фундаментальным в популяционной генетике, его ввел Г. Меллер в 1950 г. в своей книге «Наш груз

мутаций». Для расчета порядкового номера поколения ( $t$ ), в котором начальная частота рецессивного аллеля ( $q_0$ ) примет ожидаемое значение  $q_t$  при отборе против гомозиготных рецессивов, используют формулу

$$t = \frac{1}{q_t} - \frac{1}{q_0} .$$

*Пример*

Частота рецессивного летального аллеля 0,01. Требуется установить, сколько потребуется поколений для ее уменьшения в 10 раз при условии отсутствия новых мутаций?

$$q_0 = 0,01$$

$$q_t = 0,001$$

$$t = \frac{1}{0,001} - \frac{1}{0,01} = 1000 - 100 = 900 .$$

Итак, для уменьшения частоты рецессивного летального аллеля с 0,01 до 0,001 потребуется целых 900 поколений.

### ***Контрольные вопросы и задания***

1. Рассчитайте частоты аллелей групп крови системы АВ0 в популяции англичан, где I группа крови встречается с частотой 0,462, II – 0,436, III – 0,074, IV – 0,028.

2. Изменяется ли генетический груз в популяциях человека со временем? Если да, то благодаря действию каких факторов?

3. На одном острове дикари приносили в жертву всех альбиносов до достижения ими половозрелого возраста. Исходная частота встречаемости носителей этого фенотипа была 0,0001. Насколько она изменилась через 180 поколений?

## Глава 10. Эпигенетика

Под термином «эпигенетика», в настоящее время понимают наследуемые в ряду митотических и мейотических делений состояния хроматина и экспрессии генов, которые не связаны с изменениями в нуклеотидной последовательности ДНК.

В основе эпигенетической памяти лежит биохимическая модификация структуры хроматина. Установлено, что остатки цитозина в составе CpG-последовательностей ДНК у животных и CpNpG-последовательности у растений могут быть метилированы. Такая модификация характерна для неактивного хроматина, транскрипция с которого не осуществляется. Перенос метильной группы с S-аденозилметионина на остаток цитозина осуществляется несколькими группами метилтрансфераз. Одна группа осуществляет поддерживающее метилирование вновь синтезированной дочерней нити ДНК на основе рисунка метилирования материнской нити, а другая группа производит метилирование *de novo* в ответ на сигналы клеточной дифференцировки и различные факторы внешней среды.

С модификацией ДНК сопряжена также ферментативная модификация другого компонента хроматина – гистонов. Четыре коровых гистона образуют нуклеосому – структуру, на которую намотана нить ДНК. Существует множество вариантов модификаций аминокислотных остатков гистонов, с разным сродством к ДНК и характерных для различных состояний хроматина. В связи с этим даже появилось понятие «гистонового кода» – набора модификаций, соответствующих транскрипционно активному, транскрипционно неактивному или конденсированному хроматину митотических хромосом, а также гистонам, смещающимся с ДНК в S-фазе клеточного цикла. Так, ацетилирование остатков лизина и аргинина обычно связано с транскрипционно активным состоянием хроматина, а метилирование этих аминокислотных остатков, наоборот, со снижением транскрипционного статуса.

Модификация хроматина лежит в основе такого явления, как геномный импринтинг (запечатление). Этот термин появился в 1960 г. и первоначально относился к выборочной элиминации отцовских хромосом у некоторых насекомых. Исследования по трансплантации ядер половых клеток мышей в 1980-х гг. показали невозможность развития эмбрионов, несущих только материнские или только отцовские пронуклеусы. Более того, даже наличие лишь двух гомологичных хромосом от одного родителя может привести к гибели эмбриона. Оказалось, что причина данного явления – различия метилирования ДНК в мужских и женских гаметах. Вследствие этого появление в геноме обеих копий аллелей, подвергшихся импринтингу (выключению), приводит к эпигенетической неполноценности эмбриона, хотя с точки зрения классической генетики, он имеет нормальный набор генов. У человека на сегодняшний день обнаружено более 30 импринтированных генов, а общее их число оценивается в пределах 200–500.

Широко известный пример геномного импринтинга у человека – *синдромы Прадера-Вилли и Ангельмана*, которые обусловлены микроделецией в районе HSA15q11-q13. Если аберрантная хромосома приходит от отца, развивается синдром Прадера-Вилли (ожирение, склонность к переданию, гипотонус, нарушение координации движений, маленькие кисти и стопы, низкий рост, повышенная сонливость, косоглазие; пониженная плотность костей, гипогонадизм, речевая задержка, задержка психического развития, отставание в освоении навыков общей и мелкой моторики) (рис. 108). Если аномальная хромосома получена от матери, то развивается синдром Ангельмана (размер головы меньше среднего, нередко с уплощением затылка, задержка в развитии навыков общей моторики, задержка речевого развития, дефицит внимания и гиперактивность, сложности с обучением, часто эпилепсия, необычные движения – мелкий тремор, хаотические движения конечностей, частый смех без повода, ходьба на негнущихся ногах) (рис. 109). Различия в метилировании цито-

зина в мужском и женском организмах приводят к различному проявлению одной и той же мутации в зависимости от того, кто из родителей передал аномальную хромосому ребенку.



*Рис. 108. Синдром Прадера-Вилли\**

---

\* URL: [http://www.medico.ru/cgi-](http://www.medico.ru/cgi-bin/medatlas/comment.pl?rlink=&publ=1115220228_01_168&page=)

[bin/medatlas/comment.pl?rlink=&publ=1115220228\\_01\\_168&page=](http://www.medico.ru/cgi-bin/medatlas/comment.pl?rlink=&publ=1115220228_01_168&page=)

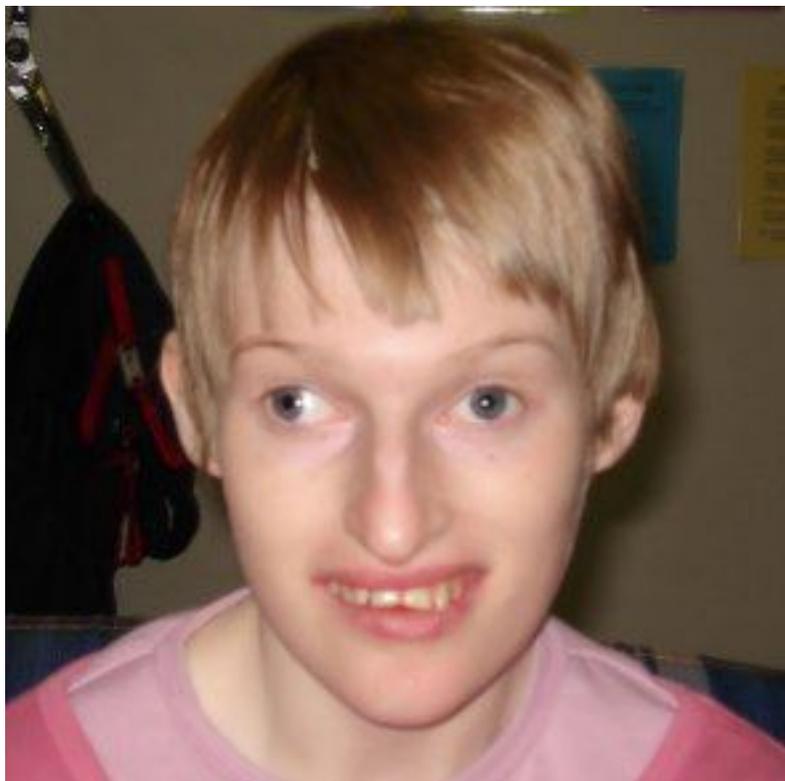


Рис. 109. Синдром Ангельмана\*

К давно известным и одним из хорошо изученных эпигенетических феноменов относится инактивация половой X-хромосомы у самок плацентарных млекопитающих (лайонизация). В соматических клетках самок млекопитающих присутствуют две X-хромосомы, соответственно и набор генов на них двойной, по сравнению с соматическими клетками самцов, у которых в ядре находится только одна X-хромосома. Для компенсации дозы генов у самок одна из X-хромосом инактивируется с формированием специфической ядерной структуры, названной тельцем Барра. В основе этого процесса

---

\* URL: <http://www.primehealthchannel.com/angelman-syndrome-symptoms-pictures-causes-life-expectancy-and-treatment.html>

лежит экспрессия РНК XIST, которая не кодирует белок. Она взаимодействует с хроматином X-хромосомы, как бы облепляя её, и привлекает белковые комплексы, активирующие ДНК-метилазы и гистоновые ацетилазы, следствием работы которых является формирование факультативного гетерохроматина и инактивации X-хромосомы. Интересно, что экспрессия другой некодирующей РНК TSIX антисмысловой к XIST препятствует её экспрессии в активной X-хромосоме.

Нобелевская премия по медицине и физиологии 2006 г. была присуждена Э. Файеру и К. Мелло за открытие другого интересного эпигенетического феномена – РНК-индуцируемого подавления экспрессии генов или РНК-интерференции. Исследователи обнаружили, что введение в организм круглого червя *Caenorhabditis elegans* двухцепочечной РНК ведет к специфической репрессии гомологичного ей по нуклеотидной последовательности гена. Позже РНК-интерференция была обнаружена почти у всех эукариотических организмов. На первом этапе этого эпигенетического процесса происходит расщепление ферментом РНК-эндонуклеазой III типа экзогенной двухцепочечной РНК, попавшей в клетку, на небольшие, двухцепочечные фрагменты длиной 20–25 нуклеотидов, названные малыми интерферирующими РНК. Одна из нитей таких фрагментов переходит в состав специфического эндонуклеазного комплекса и, взаимодействуя с комплементарной последовательностью матричной РНК, разрушает последнюю, либо в составе другого комплекса, попадая в ядро, переводит в транскрипционно неактивное состояние хроматин с комплементарной ДНК. Функции РНК-интерференции на уровне клетки сравнивают с функциями иммунной системы на уровне организма. Считается, что РНК-интерференция является внутриклеточным аналогом иммунной системы, предохраняющим эукариотическую клетку от РНК-вирусов и мобильных генетических элементов (транспозонов). Ведутся активные работы по созданию лекарственных средств на основе интерферирующих РНК, позволяющих заблокировать

синтез продуктов, принимающих участие в развитии заболеваний человека; однако эффективных и безопасных векторов для доставки интерферирующих РНК в клетку пока не найдено. Перспективно применение малых интерферирующих РНК и в биотехнологических целях.

Известно, что геном растений метилирован в значительно большей степени, чем животных. В первичной нуклеотидной последовательности 5-метилцитозин встречается даже чаще, чем неметилированный цитозин. Значительная часть генов у растений находится в неактивном состоянии. Показано, что применение деметилирующих агентов приводит к наследуемой в ряду поколений активации промоторов и экспрессии ранее выключенных генов. Такое изменение фенотипа напоминает обычную мутацию.

До недавнего времени считалось, что эпигенетический рисунок генома млекопитающих формируется в период эмбрионального развития и впоследствии остается неизменным. Хотя этот период по-прежнему считается эпигенетически наиболее важным, однако эксперименты с лабораторными животными показали, что употребление ряда веществ определенным образом сказывается на метилировании различных участков хроматина. Так, недостаток или, наоборот, избыток в пище веществ, служащих предшественниками для субстратов метилирования ДНК, сказывается на поддержании метилирования ДНК. Кроме того, ряд веществ может влиять на эпигеном и через более сложные механизмы.

### ***Контрольные вопросы и задания***

1. Какие модификации гистоновых белков приводят к активации, а какие – к инактивации хроматина?
2. В семье родился ребенок с синдромом Ангельмана. Кто из его родителей является носителем аберрантной 15-й хромосомы?
3. В чем заключается явление РНК-интерференции?

## Глава 11. Генетика и селекция

### 11.1. Отбор, подбор и оценка генотипа в селекции

Селекция, по словам Н.И. Вавилова, представляет собой эволюцию, направляемую волей человека. Под селекцией понимают совокупность методов создания новых пород, типов, кроссов и линий животных, сортов и линий растений, штаммов и клонов микроорганизмов, обладающих желательными для человека свойствами. Теоретической базой селекции является генетика.

Основные методы селекции – отбор (полное или частичное устранение какой-либо части особей от размножения) и подбор (формирование пар родительских форм с целью получения потомства, обладающего желательными признаками) на основе оценки генотипа. Генотип можно оценивать исходя из фенотипических особенностей самой особи или (например, в случае ограниченных полом признаков) по фенотипам сибсов, родителей или потомков. Так например, в молочном скотоводстве наиболее точная оценка генотипа быков (по которым проводится интенсивный отбор) получается по продуктивности их дочерей.

Залогом успеха селекционных мероприятий является высокая наследуемость признака, с которым проводят работу. Мерой наследуемости считается коэффициент наследуемости  $h^2$  – отношение генотипической дисперсии (показатель изменчивости внутри генетически однородной группы) к фенотипической дисперсии (показатель изменчивости в популяции).

#### *Пример*

Имеются две линии кур с разной толщиной скорлупы яйца – тонкой и толстой. У одной линии птиц средняя толщина скорлупы 320 мкм, дисперсия 12, у другой соответственно 320 мкм и 16. У гибридов первого поколения (генетически однородные гетерозиготы) дисперсия составила 14. У гибридов второго поколения (они уже генетически гетерогенны!) дисперсия 39. Понятно, что изменчивость у роди-

тельских линий и  $F_1$  обусловлена только влиянием среды, а в  $F_2$  – влиянием генотипа и средовых факторов. Рассчитываем среднюю дисперсию родительских линий и  $F_1$  (она равна 14) и тогда:

$$h^2 = \frac{39 - 14}{39} = 0,64 .$$

Рассмотрим основные понятия селекции на примере животноводства. В растениеводстве и селекции микроорганизмов имеются отличия, определяемые биологией объектов. Племенным животным называют особь, которая имеет подтвержденное происхождение и может быть использована для воспроизводства определенной породы. При этом племенная ценность животного – уровень генетического потенциала племенного животного и влияние данного генетического потенциала на хозяйственно полезные признаки потомства. Группу особей, интенсивно использующихся для воспроизводства, называют племенным ядром породы. Для оценки эффективности селекции служат понятия «фенотипический сдвиг» – изменение признака за определенный период времени, «генетический прогресс» – разность между средней племенной ценностью потомства, отобранного для воспроизводства родителей, и средней племенной ценностью популяции, из которой отобраны родители, и «селекционный дифференциал» – разность между средним значением признака в исходной популяции и средним значением того же признака у особей, отобранных в одном из последующих поколений. Для количественной оценки реакции группы особей на отбор используют селекционный ответ – произведение коэффициента наследуемости  $h^2$  и селекционного дифференциала. Товарным называют хозяйство, где производят продукцию, племенным – где разводят молодняк для воспроизводства определенной породы.

Под линиями в селекции подразумевают не совсем то же, что под чистыми линиями – группами гомозиготных особей – в генетике. Выделяют генеалогические линии – группы особей с общим происхождением и заводские линии – группы особей с общим происхождением и близкими продуктивными и экстерьерными признаками.

В свиноводстве и птицеводстве товарные хозяйства используют двух- или трехлинейные кроссы – гибридов от скрещивания материнских линий, которые часто обладают гетерозисом (гибридной мощностью) по желательным признакам.

В последние годы все большее распространение находит индексная селекция – отбор и подбор на основе комплексной оценки продуктивных качеств. В селекционный индекс входят основные продуктивные и экстерьерные признаки, каждому из которых придается свой коэффициент исходя из объективной ценности данного признака для породы.

Большое значение для селекции имеет сохранение генофонда малочисленных пород - групп редко встречающихся животных определенной породы, отличающихся генетико-селекционными особенностями и находящимися под угрозой исчезновения.

### *11.2. Селекция на основе молекулярных маркеров и геномная оценка*

Большинство хозяйственно ценных признаков домашних животных и культурных растений имеют сложный полигенный тип наследования и контролируются многими генами, расположенными в локусах количественных признаков – QTL. Для выявления QTL используют полногеномное сканирование – анализируют генетическое сцепление (разд. 2.7) большого числа равномерно распределенных по хромосомам молекулярных маркеров (например, микросателлитов) с изучаемыми признаками (например, удой у коров, яйценоскость у несушек, скорость роста у бройлеров). После установления района локализации QTL на генетической карте проводят тонкое картирование по сцепленному наследованию с наиболее близко расположенными маркерами. Определение границ QTL позволяет проводить позиционное клонирование – получение геномных клонов из района его локализации. Исследование полученных геномных клонов при помощи молекулярно-генетических методов дает возможность выявить гены-кандидаты для изучаемого признака.

Сравнение экспрессии генов-кандидатов в тканях, участвующих в формировании признака, у организмов с разным его проявлением дает возможность определить ген, оказывающий влияние на проявление признака. Секвенирование регуляторных и кодирующих областей выявленного гена позволяет найти его аллельные варианты, связанные с проявлением признака, по которым можно проводить отбор – генную селекцию (разновидность маркерной селекции). В более общем случае маркерной селекцией называют отбор и подбор по аллелям молекулярно-генетических маркеров, которые проявляют генетическое сцепление или имеют физиологическую связь с желательным признаком.

Классический пример создания системы маркерной селекции – выявление гена *DGAT1*, аллели которого определяют разную жирность молока у крупного рогатого скота при помощи позиционного клонирования. Последовательное сокращение интервала локализации QTL методом анализа ко-сегрегации жирности молока с аллелями микросателлитных локусов позволило авторам установить, что ген-кандидат этого признака находится в хромосомном районе величиной 3 сМ, ограниченном микросателлитами BULGE13 и BULGE09. Скринирование геномной библиотеки крупного рогатого скота с использованием этих маркеров в качестве ДНК-зондов для гибридизации, позволило получить протяженные ДНК-клоны границ этого района. Методом «прогулки по хромосоме» (концы клонов были секвенированы и их последовательности использованы для создания ДНК-зондов для серии последовательных скринингов) и с привлечением данных по генному составу ортологического района хромосом человека был построен контиг из 50-ти искусственных хромосом бактерий, который втроекратно перекрывал район интереса. При секвенировании нуклеотидных последовательностей этого контига был обнаружен ген *DGAT1* (ацил-кофермент А – диацилглицерол ацилтрансфераза), который по физиологическому действию мог быть кандидатом для данного QTL. Анализ нуклеотидной последовательности этого гена у пород коров с альтернатив-

ным проявлением признака жирности молока позволил идентифицировать точковую мутацию K232A, которая оказывает решающее влияние на проявления этого признака. В настоящее время эта нуклеотидная замена обязательно учитывается во всех системах маркерной селекции крупного рогатого скота молочного направления.

Система маркеров плодовитости, стрессоустойчивости, качества мяса и резистентности к некоторым инфекциям широко применяется в селекции свиней.

В последние годы в селекции крупного рогатого скота молочного направления используют геномную оценку при помощи биочипов, содержащих большое число (как правило, 250 000) маркеров мононуклеотидного полиморфизма (SNP). Специальное программное обеспечение позволяет с высокой вероятностью (порядка 0,6 – 0,8) предсказать молочную продуктивность дочерей на основе известной корреляции (статистической связи) аллелей SNP и интересующих признаков. Следует отметить, что геномная оценка пока остается достаточно приблизительной, а наиболее точной (с вероятностью 0,95) является оценка по качеству потомства. Аналогичные системы создаются в птицеводстве.

### *Контрольные вопросы и задания*

1. У некоторых пород крупного рогатого скота белково-молочность имеет коэффициент наследования 0,85, а устойчивость к маститам (заболеваниям вымени) – 0,18. По какому из этих признаков селекция будет более эффективной?

2. Имеется две линии кроликов. У одной площадь шкурки имеет дисперсию 1,8, а у другой – 2,6. У гибридов первого поколения дисперсия 2,3, а в  $F_2$  – 4,2. Рассчитайте коэффициент наследования этого признака.

3. Можно ли отказаться от традиционных селекционных методов и использовать только маркерную селекцию и геномную оценку?

### 12.1. Близнецовый метод

В предыдущих главах речь преимущественно шла о наследовании дискретных (качественных) признаков. Большинство морфологических (рост, телосложение, форма отдельных частей тела), физиологических (интенсивность обмена веществ, скорость роста) и психологических (темперамент) признаков являются количественными, их можно выражать числовыми значениями и сравнивать между собой. Одним из подходов генетического анализа количественных признаков у человека является близнецовый метод.

Следует различать два принципиальных типа близнецов – разнойцовые (дизиготные), которые возникают при оплодотворении двух разных яйцеклеток двумя различными сперматозоидами, и однойцовые (монозиготные), которые появляются в результате дробления уже оплодотворенной яйцеклетки (зиготы). Дизиготные близнецы ничем не отличаются от обычных сибсов. Монозиготные близнецы являются клонами – генетически идентичными организмами.

Известны случаи, когда дизиготные близнецы имели разных отцов. В этом случае, с точки зрения генетики, они являются полусибсами. Рождение однополых дизиготных близнецов случается несколько чаще, чем разнополых, но это связано скорее всего с разной подвижностью сперматозоидов, несущих X- и Y-хромосомы. Разнойцовые близнецы появляются в результате одновременного созревания двух и более яйцеклеток – полиовуляции, которая обычна для многих млекопитающих, но у человека происходит с небольшой частотой. Склонность к полиовуляции наследуется (если у женщины уже были близнецы, то частота их рождения во второй раз в четыре раза выше, чем в среднем в популяции).

Монозиготные близнецы иногда разделены не полностью, у них могут быть даже общие органы. В таких случаях производят хирургическое разделение, зачастую сопряженное с риском для жизни обоих близнецов.

Средняя частота рождения монозиготных близнецов – около 40 на 10000 и мало варьирует в разных популяциях человека. Дизиготные близнецы чаще рождаются у представителей негроидной расы (около 100 на 10000), у европеоидов – около 80 на 10000, у монголоидов – около 20 на 10000. Этот факт можно объяснить наследственным характером склонности к полиовуляции и негенетическими причинами дробления оплодотворенной яйцеклетки.

Влияние на признак наследственности и факторов среды можно определить исходя из степени сходства (конкордантности) дизиготных (имеющих разный генотип, но выросших в близких условиях) и монозиготных (имеющих один генотип и выросших в близких условиях) близнецов. Особое значение имеет изучение разлученных в младенческом возрасте монозиготных близнецов (рис. 110), так как они выросли в разных условиях, но являются генетически идентичными организмами. Существенным ограничением метода является то, что он позволяет установить только факт наследования изучаемого признака, но не дает возможности ответить на вопросы о типе наследования, количестве участвующих генов и их возможном взаимодействии.



*Рис. 110.* Разлученные в раннем возрасте близнецы, выросшие в разных социальных условиях

## 12.2. Молекулярные маркеры в изучении наследственной патологии

Патология – это любое отклонение от нормального течения биологических процессов – обмена веществ, роста, развития, размножения.

Наследственная патология – отклонение от нормы с установленным фактом наследования, т. е. передачи от поколения к поколению. Следует различать врожденную патологию – присутствующую от рождения индивидуума – от наследственной патологии. Врожденная патология может быть обусловлена действием факторов внешней среды – недостатком питательных веществ и кислорода во время внутриутробного развития, родовыми травмами, инфекциями и так далее. Установление в соответствии с требованиями генетического анализа (гл. 2) факта наследования аномального признака является единственным основанием признания наследственного характера патологии.

Существует два типа классификации наследственной патологии. Первый (принятый преимущественно в отечественной литературе) – *клинический* тип. Согласно этому типу классификации существует четыре группы заболеваний:

- группа I – это собственно наследственные болезни – хромосомные и генные заболевания (синдромы Эдвардса и Патау, фенилкетонурия, муковисцидоз);
- группа II – болезни с выраженной наследственной предрасположенностью, в патогенезе которых проявление наследственных факторов определяется действием специфических внешних обстоятельств (артериальная гипертензия, сахарный диабет, подагра);
- группа III – заболевания, которые определяются преимущественно факторами внешней среды, но в патогенезе которых некоторую роль играют наследственные факторы (глаукома, атеросклероз, рак молочной железы);
- группа IV – болезни, к которым наследственность, на первый взгляд, не имеет отношения (пищевые отравления, переломы, ожоги).

Следует отметить, что часто используемые понятия «семейные» и «спорадические» заболевания не имеют прямого отношения к наследственности. Семейные заболевания наблюдаются у родственников, но могут быть вызваны и действием одинаковых внешних причин, например характером питания. Спорадические случаи наблюдаются у отдельных индивидуумов, но могут быть обусловлены и редким сочетанием аллелей или возникшей *de novo* мутацией.

Вторая система классификации – *генетическая* – является общепринятой в зарубежной литературе и в последнее время находит все более частое применение и в литературе на русском языке. Согласно этой системе выделяют пять групп:

- группа I – генные болезни, определяемые мутациями в определенных генах. Это преимущественно моногенные признаки с аутосомно-доминантным, аутосомно-рецессивным, сцепленным с полом доминантным, сцепленным с полом рецессивным, голандрическим и митохондриальным типом наследования (гл. 2);

- группа II – хромосомные болезни, т. е. геномные и хромосомные мутации (гл. 8);

- группа III – болезни с наследственной предрасположенностью, в патогенезе которых играют роль средовые и наследственные факторы, имеющие моногенный или полигенный тип наследования (миопия, патологическое ожирение, язва желудка).

- группа IV – генетические болезни соматических клеток, зачастую связанные со злокачественными новообразованиями (ретинобластома, опухоль Вильмса, некоторые формы лейкемии);

- группа V – болезни генетической несовместимости матери и плода, которые развиваются в результате иммунной реакции матери на антигены плода (несовместимость по резус-фактору и некоторым другим эритроцитарным системам антиген-антитело).

Наследственные заболевания могут начать свое проявление в разном возрасте. Характер манифестации (времени

проявления первых симптомов болезни) является специфическим для разных форм наследственной патологии. Как правило, для наследственных заболеваний характерно хроническое (продолжительное) прогрессивное (с нарастанием степени выраженности симптомов) течение.

Значительная часть наследственных болезней и болезней с наследственной предрасположенностью имеют немоногенную природу. Их можно отнести к количественным признакам, т. е. тем, которые имеют непрерывный ряд изменчивости и могут быть измерены – например, рост, вес, длина конечностей. Аллели большого числа генов вносят вклад в проявление таких признаков, поэтому их называют полигенными. Проследить их наследование и выявить гены, аллели которых участвуют в патологических процессах, можно при помощи генетических маркеров. Выявление сцепленного наследования (ассоциации) фенотипических признаков с генетическими маркерами позволяет найти районы хромосом, оказывающие решающее влияние на изучаемые процессы (позиционное клонирование), и получить надежные системы для молекулярной диагностики (молекулярное маркирование). В настоящее время наиболее распространенными маркерами в генетике человека являются микросателлитные локусы (рис. 111) и мононуклеотидные полиморфные сайты – SNP (рис. 112), основные особенности которых показаны в таблице.

*Таблица*

Сравнение основных характеристик SNP и микросателлитов

	SNP	Микросателлиты
Число аллелей в популяции	1–2 (4)	1 – более 20
Средняя гетерозиготность	~0,3	~0,7
Информативность	+	+++
Число локусов в геноме человека	~10 <sup>6</sup>	~10 <sup>5</sup>
Возможность автоматизации	+++	+

Анализ экспрессии генов (всех или группы) на биочипах в тканях, имеющих отношение к определенному наследственному заболеванию, в норме и патологии часто позволяет выявить гены-кандидаты для изучаемой болезни. Хромосомную локализацию последовательностей ДНК, влияющих на количественный признак (QTL), можно определить на основе совместного наследования с несколькими близкорасположенными маркерами. Если удастся найти маркеры, ограничивающие QTL с двух сторон, то на основе данных геномного сиквенса можно составить список генов, являющихся позиционными кандидатами для QTL изучаемого заболевания. При одновременном использовании анализа экспрессии и исследования ассоциаций заболевания с молекулярными маркерами можно определить наиболее вероятные гены-кандидаты – те, которые окажутся в обоих списках.

Степень восприимчивости к определенным лекарственным препаратам и эффективность их применения варьирует в широких пределах. При одном и том же заболевании подходящий для конкретного индивидуума препарат часто подбирают методом проб и ошибок. Кроме потери времени такой подход иногда наносит непоправимый вред здоровью. В настоящее время для большого количества лекарственных средств разработаны системы маркеров на основе SNP, позволяющие *a priori* (до опыта) предсказать реакцию индивидуального организма на то или иное химическое вещество. Ассоциации отдельных аллельных вариантов ДНК-маркеров с особенностями биохимических реакций являются основой индивидуальной терапии (рис. 113).

# Микросателлиты



Рис. 111. В микросателлитных локусах единицей изменчивости является группа нуклеотидов

## Мононуклеотидные полиморфные сайты (SNP)



Рис. 112. В мононуклеотидных полиморфных сайтах (SNP) единицей изменчивости является один нуклеотид

## Подбор индивидуальной терапии



Рис. 113. Принцип подбора индивидуальной терапии на основе полиморфизма мононуклеотидных повторов - SNP

### 12.3. Лабораторная диагностика наследственных заболеваний

Методы лабораторной диагностики наследственных заболеваний можно условно разделить на две группы: *прямые* (позволяющие выявить этиологическую причину, т. е. мутацию, – цитогенетические и молекулярно-генетические методы) и *косвенные* (позволяющие выявить особенности патогенеза – биохимические, гематологические, иммунологические, эндокринологические, электрофизиологические, рентгенорадиологические методы).

Диагностика хромосомных болезней может проводиться у взрослых индивидуумов любого возраста или пренатально (до рождения) – в этом случае при наличии патологии может

быть рекомендовано прерывание беременности. Для проведения пренатальной диагностики требуются показания – наличие хромосомных аномалий в семье, возраст матери старше 35 лет, долговременный контакт с мутагенами. Обычно на 10–11-й неделе проводят биопсию хориона – небольшое количество хориональной ткани отсасывается шприцем через катетер или длинную иглу. Вероятность выкидыша при этой процедуре 2–6 %. Во втором триместре используют плацентоцентез (позднюю биопсию хориона) – процедура аналогична хориоцентезу, но объектом лабораторного исследования при этом являются клетки плаценты. На 15–16-й неделе иногда проводят амниоцентез: из амниотической жидкости выделяют находящиеся в ней клетки плода (слущенные клетки кожи плода, эпителиоциты из мочевыводящих путей и т. д.), которые культивируют для получения препаратов хромосом. Риск выкидыша при этом способе – около 1 %. Обычно клеток выделяется мало, размножить их в значительной степени затруднительно, поэтому провести полноценный кариологический анализ на митотических хромосомах (гл. 4) не всегда возможно. В последние годы для пренатальной диагностики все более широко применяется FISH с хромосомоспецифическими ДНК-зондами на интерфазных ядрах или CGH – сравнительная геномная гибридизация, которые не требуют получения клеток на стадии метафазы (разд. 4.5). Наконец, после 18-й недели используют кордоцентез – образцы крови плода получают из вены пуповины. Риск осложнений при последнем способе минимален, но прерывание беременности в случае обнаружения серьезной патологии в этот период требует длительной госпитализации и чревато осложнениями.

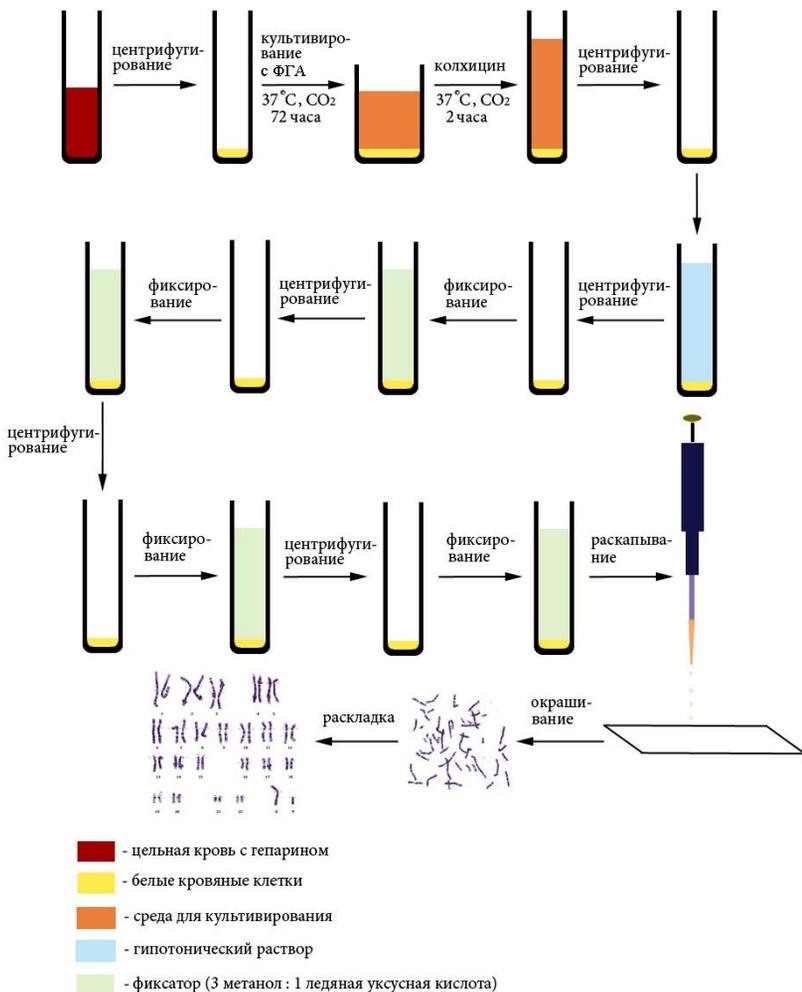


Рис. 114. Приготовление препаратов митотических хромосом из культуры лейкоцитов периферической крови

Основным методом диагностики хромосомных аномалий после рождения является цитогенетический (кариологический) анализ на метафазных хромосомах. Иногда применяют методы экспресс-диагностики на интерфазных клетках. Например, для быстрого подсчета числа X-хромосом клетки буккального эпителия окрашивают ацетоорсеином или любым неспецифическим красителем. При кариотипе

46, XX в ядре присутствует относительно крупная плотная глыбка – тельце Барра – инактивированная X-хромосома. У мужчин тельце Барра отсутствует. Нетрудно догадаться, что число телец Барра равно числу X-хромосом за вычетом единицы. Для выявления Y-хромосомы в интерфазе используют окраску АТ-специфическими флуорохромами. При этом крупный гетерохроматиновый блок длинного плеча Y-хромосомы очень ярко флуоресцирует. Число таких блоков соответствует числу Y-хромосом. Для получения препаратов митотических хромосом чаще всего используют культуры лейкоцитов периферической крови (рис. 114). В последние годы как отдельную группу хромосомных аномалий выделяют микроцитогенетические синдромы (микроделеции и микродупликации). Для их диагностики используют молекулярно-цитогенетические методы.

Молекулярно-генетическая диагностика проводится прямым методом (если при этом анализируют ген, непосредственно вовлеченный в патологию) или косвенным (при помощи ассоциированных с заболеванием ДНК-маркеров). Основными методами молекулярно-генетической диагностики являются ПЦР и секвенирование. Биологическим образцом для выделения ДНК может быть любая ткань. Чаще используют соскоб буккального эпителия (с внутренней стороны щеки), периферическую кровь или волосяные луковицы, потому что их получение наименее травматично. Для диагностики наследственных заболеваний у умерших можно использовать костные останки или фрагменты мумий. Выделение ДНК проводят фенол-хлороформным методом или путем очистки на колонках. Результаты ПЦР обычно анализируют при помощи капиллярного электрофореза (рисунки рис. 115). Молекулярно-генетическая диагностика может проводиться как пренатально, так и в любом возрасте после рождения, так как ДНК не изменяется в онтогенезе.

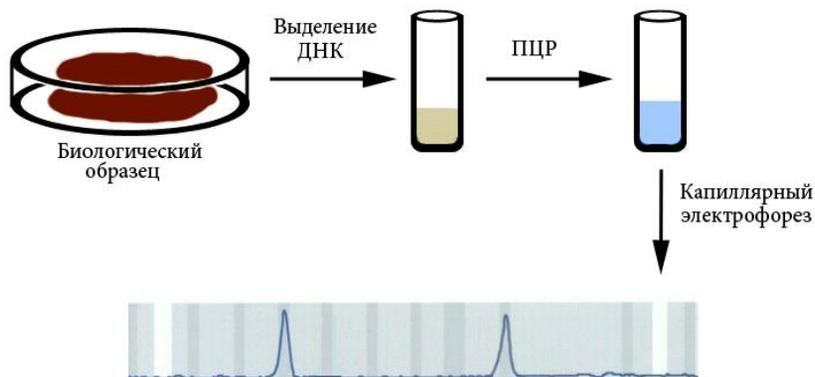


Рис. 115. Схема наиболее типичного способа молекулярно-генетической диагностики

Расчет генетического риска при моногенных заболеваниях основан на законах Менделя (гл. 2). Если один из супругов является гомозиготой по аллелю дикого типа (отсутствие заболевания), а генотип второго супруга неизвестен, то риск рождения больного ребенка соответствует частоте встречаемости данного заболевания в популяции. При полной пенетрантности в семье гетерозигот по аутосомно-рецессивному заболеванию риск рождения больного ребенка – 0,25. При неполной пенетрантности необходимо внести поправку. Например, при пенетрантности 80 % у гетерозигот по аутосомно-рецессивному заболеванию риск составит  $0,25 \times 0,8 = 0,2$ . В случае аутосомно-доминантных заболеваний с поздней манифестацией вносят дополнительные поправки с учетом возраста пробанда.

#### 12.4. Хромосомные болезни

Если не все клетки организма имеют одинаковый кариотип, то такие организмы называют мозаичными или мозаиками. У человека обычно фенотипическое проявление наблюдается у мозаиков, если мутантных клеток больше четверти. На этом наблюдении основан широко распространенный в диагностической практике метод анализа хромосом. На

первом этапе анализируют 11 метафазных пластинок – это число соответствует рассчитанному числу клеток, где при 25-процентном мозаицизме статистически достоверно присутствует более одной мутантной клетки. Если мутантных клеток не обнаружено, то индивидуума считают кариотипически нормальным. Если среди одиннадцати проанализированных клеток две и более окажутся мутантными – диагностируется мозаицизм. Если только одна клетка окажется мутантной – анализируют еще шесть клеток. Если среди них не находят ни одной мутантной (причем именно с такой мутацией, как и у первой выявленной мутантной клетки) – индивидуум считается кариотипически нормальным, а обнаружение первой мутантной клетки считают случайным. Если среди проанализированных шести клеток находят еще одну мутантную с той же мутацией, то в анализ берут еще шесть клеток. Анализ продолжают до тех пор, пока не обнаружат две или более мутантных клетки среди очередной проанализированной серии. Тогда ставят диагноз – мозаицизм. Если в очередной серии проанализированных клеток все они будут иметь нормальный кариотип – индивидуума считают кариотипически нормальным.

Из всех возможных вариантов полиплоидов у человека описаны только триплоиды – обычно это выкидыши на разных стадиях внутриутробного развития. Иногда живорожденные дети-триплоиды смогли прожить несколько часов или дней, причем большинство из них были мозаиками. Известны отдельные случаи выживания мозаиков по триплоидии. Фенотипически триплоидия проявляется прежде всего в пузырном перерождении плаценты. Характерные для многих хромосомных аномалий признаки – умственная отсталость, неполное зарастание родничка, локальные пороки развития – наблюдаются и при этом типе геномных мутаций.

Наиболее распространенный случай анеуплоидии у человека – трисомия (наличие одной добавочной хромосомы) по хромосоме 21 или *синдром Дауна*. Эта аномалия встречается с частотой 1 на 700 новорожденных. Риск рождения ребен-

ка с синдромом Дауна повышается с увеличением возраста матери. В последние годы частота рождения детей с этим синдромом в развитых странах снижается по причине использования пренатальной (дородовой) диагностики. У больных отмечается задержка роста и развития, умственная отсталость, врожденный порок сердца, снижение иммунитета, снижение мышечного тонуса. Внешне их легко узнать – широкое лицо, раскосые глаза с эпикантусом (складкой верхнего века), короткий нос, большой складчатый язык (рис. 116). Как и для всех хромосомных аномалий человека, для синдрома Дауна характерна высокая изменчивость фенотипических проявлений – у разных индивидуумов может наблюдаться разная выраженность отдельных симптомов, а некоторые из них могут отсутствовать вовсе. Обычно больные миролюбивы, неплохо проходят социальную адаптацию – некоторые даже образуют семьи. Средняя продолжительность жизни – 49 лет. Больные мужчины бесплодны, у некоторых женщин могут быть дети как с синдромом Дауна, так и нормальные. Запись кариотипа с трисомией по хромосоме 21 выглядит так: 47, XX, +21 или 47, XY, +21. Кроме дополнительной хромосомы 21 причиной этого синдрома могут быть внутривхромосомные перестройки с ее участием.



Рис. 116. Ребенок с синдромом Дауна (фото С.В. Дундуковой)

Другой пример анеуплоидии человека с множественными пороками развития – трисомия по хромосоме 18 или *синдром Эдвардса*. Это второе по частоте встречаемости хромосомное заболевание после синдрома Дауна – 1 на 7000. Кариотип больных девочек и мальчиков соответственно 47, XX, +18 и 47, XY, +18. Больные рождаются с низким весом (около 2 кг), у них отмечается задержка роста и развития, умственная отсталость, широкие роднички при рождении и открытые швы черепа, грудная клетка шире и короче нормальной, нижняя челюсть и ротовое отверстие маленькие (рис. 117). Глазные щели узкие и короткие, слуховые отверстия деформированы и иногда отсутствуют. Отмечаются пороки сердца и крупных сосудов, гипоплазия мозжечка и мозолистого тела. До годовалого возраста доживает 5–10 %, все выжившие – глубокие олигофрены.



Рис. 117. Ребенок с синдромом Эдвардса\*

\* URL: <http://medgen.genetics.utah.edu/photographs/diseases>

*Синдром Патау* – трисомия по хромосоме 13 в различных популяциях человека встречается с частотами от 1 на 14000 до 1 на 7000, кариотип – 47, +13. Есть связь возраста матери и риска рождения ребенка с этим синдромом, хотя она не такая строгая, как в случае синдрома Дауна. При вынашивании плода с синдромом Патау у половины беременных наблюдается многоводие. Дети рождаются с небольшим весом – около 2,5 кг, имеют умеренную микроцефалию, низкий скошенный лоб, суженные глазные щели, расстояние между которыми уменьшено, помутнение роговицы, микрофтальмию, колобому, расщелину верхней губы и неба, деформированные ушные раковины, полидактилию (рис. 118). По причине множественных врожденных аномалий большинство больных (до 95 %) умирает в возрасте до года. При должном уходе около 15 % выживших после достижения годовалого возраста имеют продолжительность жизни 5 лет, 2–3 % доживают до 10 лет.



Рис. 118. Ребенок с синдромом Патау\*

\* URL: <http://ptgandg.com/peter.htm>

*Синдром Варкани* – трисомия по хромосоме 8 описан преимущественно у мозаиков 46 / 47, +8. Полная трисомия по хромосоме 8, как правило, летальна. Частота встречаемости среди новорожденных – 1 на 5000. Дети рождаются доношенными, возраст матери не влияет на вероятность рождения ребенка с этим синдромом. Характерны умственная отсталость (97,5 % случаев), выступающий лоб, косоглазие, глубоко посаженные глаза, эпикантус, гипертелоризм (увеличенное расстояние между парными органами) глаз и сосков, высокое нёбо (иногда расщелина), толстые губы, вывернутая нижняя губа, аномалии скелета, аплазия мозолистого тела, пороки мочевой системы, узкий таз, узкие плечи (рис. 119). Со временем развиваются гидроцефалия, паховая грыжа. Продолжительность жизни – не более 17 лет.



Рис. 119. Ребенок с синдромом Варкани (мозаицизм по трисомии 8)\*

\* URL: <http://web.coehs.siu.edu/GrantsTRIS/kids/sofTRIS/DateOrder.html>

Анеуплоидии по половым хромосомам также достаточно часто встречаются в популяциях человека. Моносомия (отсутствие одной из гомологичных хромосом) по X-хромосоме или синдром Шерешевского-Тёрнера встречается с частотой 1 на 1500. Кариотип – 45, X. Пол ребенка с моносомией по X-хромосоме женский, так как у всех млекопитающих мужской пол определяется наличием Y-хромосомы, а не количеством X-хромосом. Вынашивание девочек с этим синдромом часто проходит с токсокозом и угрозой выкидыша, а роды бывают преждевременными и патологическими. Во второй половине беременности происходит инволюция (обратное развитие) половых клеток, и к моменту рождения у ребенка резко уменьшено количество фолликулов или они вообще отсутствуют. Следствиями недоразвития гонад являются недостаточность женских гормонов, аменорея (отсутствие менструаций) и бесплодие. Для больных девочек характерен низкий рост, отставание в развитии, широкая бочкообразная грудная клетка, короткая шея, крыловидные складки на боковых поверхностях шеи, деформация локтевых суставов (рис. 120). Часто встречаются пороки сердца и крупных сосудов, аплазия фаланг пальцев, склонность к ожирению и гипертензия. Молочные железы у большинства больных неразвиты, соски расположены низко. Матка недоразвита, вход во влагалище – воронкообразный, малые половые губы, клитор и девственная плева недоразвиты, большие половые губы по виду напоминают мошонку. При этом синдроме проявляются все имеющиеся сцепленные с полом рецессивные мутации.

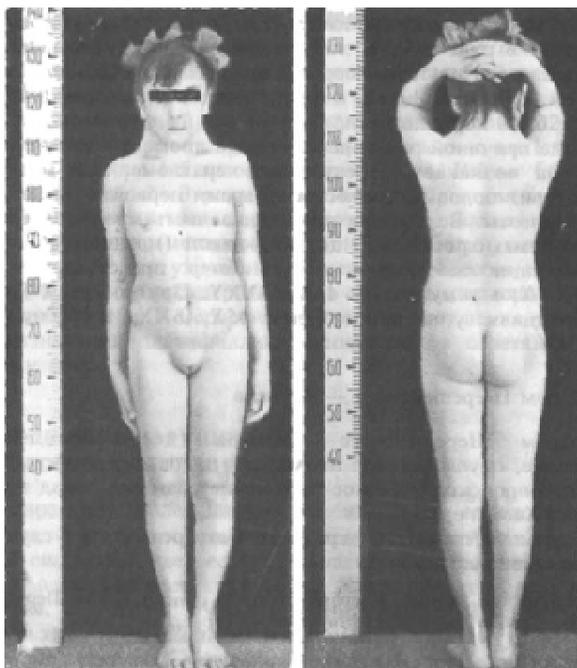


Рис. 120. Шестнадцатилетняя девушка с синдромом Шершевского-Тёрнера\*

*Синдром тройной X-хромосомы* встречается с частотой 1 на 700. Все больные – внешне нормальные женщины с кариотипом 47, XXX. Иногда встречаются две или более дополнительные X-хромосомы. Умственная отсталость и алалия отмечаются у 75 % больных, часто наблюдается недоразвитие фолликулов, ранний климакс и бесплодие.

Одна или несколько дополнительных X-хромосом у представителей мужского пола – *синдром Клайнфельтера*. Возможны кариотипы: 47, XXУ; 48, XXУУ; 48, XXXУ; 49, XXXXУ; 49, XXXУУ). Частота встречаемости 1 на 500–700 новорожденных мальчиков. Для больных характерны высокий рост, длинные конечности при сравнительно коротком туловище, гинекомастия, евнухоидизм, бесплодие, повышенное содержание женских гормонов, ожирение, психические нарушения, склонность к асоциальному поведению (рис. 121).

\* URL: <http://lekmed.ru/infoarhivendokrinologiya-56.html>



Рис. 121. Мужчина с синдромом Клайнфельтера\*

*Синдром дополнительной Y-хромосомы* (кариотип 47, XYY) встречается с частотой 1 на 500. Клинические проявления практически не выражены. Часто встречаются высокий рост, атлетическое телосложение, несколько повышенный уровень агрессивности, неадекватная реакция на критику, склонность к импульсивным поступкам, любовь к риску и приключениям. Синдром с большей, чем в среднем по популяции, частотой встречается среди осужденных за насильственные преступления, представителей опасных профессий и любителей экстремальных видов спорта.

---

\* URL: <http://dermline.ru/hm/23/233709.htm>

Наиболее известным случаем хромосомных аберраций человека является синдром кошачьего крика (или синдром Лежена) – HSA5 del (5p-). Обычно делетировано от трети до половины короткого плеча хромосомы 5, реже встречается полная делеция 5p (рис. 122). Синдром встречается с частотой 1 на 45000. Наследуется по аутосомно-доминантному типу. Отмечается низкая масса при рождении, мышечная гипотония, гипертелоризм глаз, изменение гортани, приводящее к характерному типу плача ребенка, напоминающему мяуканье кошки. Последний признак проходит к концу первого года жизни. У больных встречаются микроцефалия, врожденные пороки сердца, костно-мышечной системы и внутренних органов, деформация ушных раковин, эпикантус, антимонолоидный разрез глаз (рис. 123).

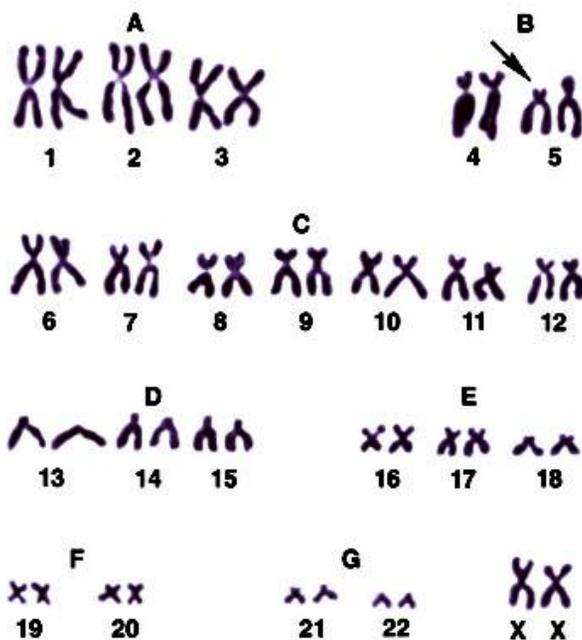


Рис. 122. Хромосомный набор больной с синдромом кошачьего крика: групповая (от А до G) и индивидуальная идентификация хромосом (стрелкой указан дефект короткого плеча хромосомы 5-й пары)\*

\* URL: <http://medarticle23.moslek.ru/articles/45310.htm>



Рис. 123. Ребенок с синдромом кошачьего крика\*

*Синдром Вольфа-Хиришорна* (синдром 4p) возникает по причине дефицита (терминальной делеции) короткого плеча хромосомы 4. Синдром встречается с частотой 1 на 96000 живых новорожденных. У большинства больных делетирован район 4p16.3, величина делеции – около 165 т.п.н. При меньшем размере делетированного участка проявляется менее выраженный фенотип. Использование рутинной окраски хромосом позволяет выявить эту абберацию только в 60 % случаев. Флуоресцентная гибридизация *in situ* дает возможность выявлять до 95 % носителей. Для больных характерны микроцефалия, задержка внутриутробного развития, «рыбий» рот, краниофациальный дисморфизм, расщелина губы

---

\* URL: <http://medarticle23.moslek.ru/articles/34943.htm>

и нёба, низкорасположенные деформированные ушные раковины, гипертелоризм (рис. 124). Из внутренних органов чаще всего поражаются почки (дисплазия, кисты), сердце (атриальный или вентрикулярный септальные дефекты) и семенники (крипторхизм). Выживает не более 20 % новорожденных с этим синдромом, продолжительность жизни – до 25 лет. У больных наблюдается глубокая задержка умственного развития.



Рис. 124. Ребенок с синдромом Вольфа-Хиршхорна\*

Причиной *хронического миелобластного лейкоза (ХМЛ)* является соматическая мутация – слияние части гена тирозинкиназы *ABL1* 9-й хромосомы с геном *BCR* 22-й хромосомы с образованием химерного белка (рис. 125). Филадельфийская хромосома, выявляемая у всех страдающих ХМЛ, – результат реципрокной транслокации  $t(9; 22), (q34; q11)$ . Название «филадельфийская» этой aberrантной хромосоме дано потому, что впервые ее обнаружили сотрудники Пенсильванского университета в Филадельфии. ХМЛ – миелопролиферативное заболевание, при котором в норме находящиеся в фазе  $G_0$  гранулоциты (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы) начи-

\* URL: [http://en.wikipedia.org/wiki/Wolf-Hirschhorn\\_syndrome](http://en.wikipedia.org/wiki/Wolf-Hirschhorn_syndrome)

нают активно делиться под влиянием химерного белка BCR/ABL1. В хронической фазе заболевания больные обычно чувствуют недомогание и переполнение живота. Акселеративная фаза заболевания может привести к бластному кризу, который протекает подобно острому лейкозу с быстрой прогрессией и небольшой выживаемостью.

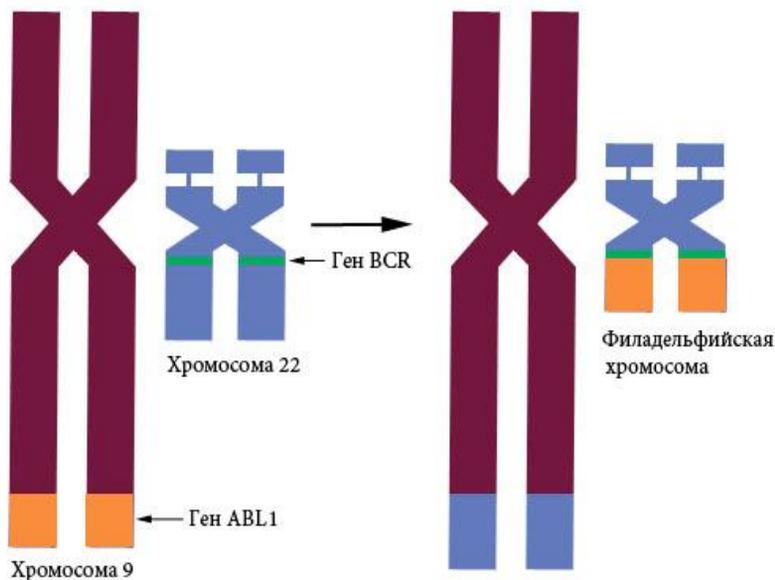


Рис. 125. Филадельфийская хромосома

*Синдром Дауна* иногда имеет транслокационную природу. Значительная часть хромосомы 21 может быть перемещена на другие хромосомы (чаще на 15, реже на 14, ещё реже на 21, 22 и Y-хромосому). В таких случаях при нормальном числе хромосом функционально будет присутствовать анеуплоидия по хромосоме 21.

На хромосоме X с частотой 1 на 1000 – 1 на 2000 новорожденных мальчиков в районе q27-28 наблюдается вторичная перетяжка – так называемый *фрагильный сайт*. Это *синдром Мартина-Белл* или *синдром ломкой X-хромосомы*. Молекулярный механизм заключается в экспансии тринуклеотидных ЦГТ (цитозин-гуанин-гуанин) повторов. В норме в районе Xq27.3 должно быть от 6 до 54 таких повторов, предмутац-

онное состояние – от 55 до 200 таких повторов, в этом случае у матерей с предмутационным состоянием возможно увеличение числа повторов в мейозе из-за неравного кроссинговера, и их потомки могут получить мутантную (с числом повторов более 200) X-хромосому. Наиболее выражено появление синдрома в гемизиготе, т. е. у мальчиков с мутантной по фрагменту сайту X-хромосомой. Такие мальчики рождаются с весом 3,5–4 кг и макроорхизмом. Часто наблюдаются увеличенные размеры головы, длинное лицо с увеличенным подбородком, низкое расположение ушных раковин, повышенная подвижность суставов (рис. 126). Главные симптоматические признаки – умственная отсталость и своеобразные нарушения речи – эхолалия (неосмысленное повторение чужих слов) и персеверация (бормочущая речь). Иногда отмечается ранний детский аутизм.



Рис. 126. Синдром Мартина-Белл\*

\* URL: <http://blog.ahfr.org/2008/05/fragile-x-syndrome.html>

Следует отметить, что для всех хромосомных аберраций человека характерны общие фенотипические проявления: низкий вес при рождении, задержка развития, низкий рост, микроцефалия, микрогнатия, нарушения остеогенеза, аномальное расположение глаз.

### **12.5. Моногенные заболевания человека**

Моногенными болезнями называют патологические состояния, причиной которых являются генные мутации. Чаще всего это понятие применяют к моногенным заболеваниям.

Для этой группы характерна гетерогенность – одинаковые заболевания могут быть вызваны мутациями в разных генах. Общими принципами развития патологии на уровне генов могут быть следующие:

- выработка аномального белкового продукта;
- отсутствие нормального белка;
- недостаточное количество нормального белка;
- избыток нормального белкового продукта.

По характеру нарушений гомеостаза (постоянства внутренней среды организма) выделяют следующие группы генных болезней:

#### **1. Болезни аминокислотного обмена**

Самая многочисленная группа наследственных болезней обмена веществ. Почти все они наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Причина заболеваний – недостаточность того или иного фермента, ответственного за синтез аминокислот.

*Фенилкетонурия* – нарушение превращения фенилаланина в тирозин из-за резкого снижения активности фенилаланингидроксилазы – аутосомно-рецессивное заболевание. Проявляется в возрасте 2–4 месяцев, первые симптомы – вялость, судороги, экзема, «мышинный» запах (запах кетонов). Постепенно развиваются тяжелые поражения головного мозга, приводящие к резкому снижению интеллекта вплоть до идиотии. Если с первых дней жизни полностью исключить (или существенно ограничить количество) фенилаланин из ра-

циона больного ребенка до полового созревания, симптомы не развиваются. Болезнь обусловлена мутациями в гене *PAH*, который кодирует фенилаланин-4-гидроксилазу. Ген *PAH* локализован в HSA12q24.1. Описано несколько десятков мутаций этого гена в разных популяциях. Существуют диагностические системы на основе ПЦР, которые позволяют выявлять гетерозиготное носительство. В последнее время разрабатываются новые подходы к лечению фенилкетонурии: заместительная терапия фенилаланинлиазой – растительным ферментом, который катализирует расщепление фенилаланина на безвредные метаболиты, и генная терапия путем встраивания в геном нормального гена фенилаланин-гидроксилазы.

*Алкаптонурия* – аутосомно-рецессивное нарушение обмена тирозина и накопления в тканях организма (суставные хрящи, сухожилия) гомогентизиновой кислоты. Манифестация происходит в детском возрасте. Первый симптом – потемнение мочи. Часто развивается мочекаменная болезнь и пиелонефрит. Накопление продуктов распада гомогентизиновой кислоты приводит к поражению суставов (в первую очередь коленных и тазобедренных). Отмечается потемнение и повышенная хрупкость соединительной ткани. Характерно потемнение склер и ушных раковин. Мутации в гене *HGD* – оксидазы гомогентизиновой кислоты – являются причиной этого заболевания. Этот ген содержит 14 экзонов и локализован в HSA3q21-23. Описано около 100 различных миссенс-мутаций, мутаций типа сдвига рамки считывания и изменения сайта сплайсинга, которые связаны с этим заболеванием.

*Глазо-кожный альбинизм 1* – отсутствие или существенный недостаток пигмента кожи, волос, радужной и пигментной оболочек глаза (рис. 127).



Рис. 127. Представитель негроидной расы - альбинос\*

Заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Проявляется в различной степени депигментации кожи, волос, радужной и пигментной оболочек глаза, снижением остроты зрения, светобоязни, нистагме, частых солнечных ожогах. Различные миссенс-мутации, мутации типа сдвига рамки считывания и нонсенс мутации в гене тирозиназы (*TYR*, HSA11q24) ответственны за это заболевание.

## 2. Нарушения обмена углеводов

*Галактоземия* – отсутствие или существенное снижение активности фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы и накопление в крови галактозы и ее производных, которые оказывают токсическое действие на

---

\* URL: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/99a/Albinistic\\_man\\_portrait](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/99a/Albinistic_man_portrait)

центральную нервную систему, печень и хрусталик глаза. В первые дни и недели жизни наблюдаются желтуха, увеличение печени, нистагм, гипотония мышц, рвота. Со временем развивается катаракта, отставание в физическом и умственном развитии. Характерна непереносимость молока.

Болезнь имеет аутосомно-рецессивный тип наследования. Несколько форм этого заболевания обусловлены различными мутантными аллелями гена *GALT* (галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы), локализованного в районе HSA9p13. Миссенс-мутации в разной степени снижают активность фермента, что определяет разную степень выраженности симптомов заболевания. Например, галактоземия Дурте протекает почти бессимптомно, отмечается только склонность к расстройствам печени.

*Болезнь Гирке (гликогеноз I типа, гликогеновая болезнь I типа)* – неспособность превращения глюкозо-6-фосфата в глюкозу, которая приводит к нарушению как синтеза, так и разложения гликогена. Депонирование гликогена происходит, обратный процесс – нет. Развивается гипогликемия. Накопление избыточного количества гликогена в печени и почках приводит к печеночной и почечной недостаточности. Тип наследования – аутосомно-рецессивный. Причина заболевания – мутация в гене *G6PC*, который кодирует фермент глюкозо-6-фосфатазу. Описано 14 мутантных аллелей этого гена, которые связаны с болезнью Гирке. Существуют молекулярно-генетические тесты для выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики этого заболевания.

### 3. Нарушения липидного обмена

*Болезнь Ниманна-Пика типов А и В* – снижение активности фермента кислой лизосомальной сфингомиелиназы, который кодируется геном *SMPD1* (HSA11p15.4-p15.1). Тип наследования – аутосомно-рецессивный. Нарушение липидного метаболизма приводит к накоплению липидов в печени, легких, селезенке, нервных тканях. Характерна дегенерация нервных клеток, нарушение деятельности нервной системы,

повышенный уровень холестерина и липидов в крови. Тип А летален в раннем детском возрасте. Тип Б протекает более мягко, больные, как правило, доживают до взрослого состояния. Разные типы обусловлены разными мутациями в гене *SMPD1*.

*Болезнь Гоше (гликозилцерамидный липидоз)* – накопление глюкоцереброзидов в клетках нервной и ретикуло-эндотелиальной системы, обусловленное дефицитом фермента глюкоцереброзидазы, которая кодируется геном *GBA* (HSA1q21). Относится к группе лизосомных болезней накопления. Некоторые формы заболевания проявляются в тяжелых поражениях печени, селезенки, нервной и костной тканей.

#### 4. Наследственные болезни пуринового и пиримидинового обмена

*Синдром Леша-Нихена* – сцепленное с полом рецессивное заболевание, при котором резко возрастает содержание мочевой кислоты во всех жидкостях тела. Последствием этого является задержка развития, умеренная умственная отсталость, приступы агрессивного поведения с самоповреждением. Недостаточность ферментативной активности гипоксантин-гуанинфосфорилтрансферазы по причине мутаций в гене *HPRT1* (HSAXq26-q27.2) лежит в основе этого заболевания. Описаны несколько мутаций в том же гене, следствием которых является *подагра* (нарушение пуринового обмена и отложение мочекислых соединений в тканях).

#### 5. Нарушения обмена соединительной ткани

*Синдром Марфана («паучьи пальцы», арахнодактилия)* – поражение соединительной ткани вследствие мутации в гене *FBN1* (HSA15q21.1), ответственном за синтез фибриллина. Наследуется по аутосомно-доминантному типу. Клиническая полиморфность заболевания объясняется большим числом мутантных аллелей, каждый из которых может проявляться в гетерозиготном состоянии. Для больных характерен высокий

рост, астеническое телосложение (непропорционально длинные конечности), арахнодактилия (длинные тонкие пальцы), слабость связочного аппарата, отслойка сетчатки глаза, подвывих хрусталика, пролапс митрального клапана (рис. 128).



Рис. 128. Синдром Марфана\*

*Мукополисахаридозы* – группа заболеваний соединительной ткани, связанных с нарушением обмена кислых гликозаминогликанов (мукополисахаридов), вызванных недостаточностью некоторых лизосомных ферментов. Эти заболевания относят к лизосомным болезням накопления. Они проявляются в различных дефектах костной и соединительной тканей. *Мукополисахаридоз типа I (синдром Хурлера)* – ау-

---

\* URL: [http://www.spineinfo.ru/infosources/case/cases\\_14.html](http://www.spineinfo.ru/infosources/case/cases_14.html)

тосомно-рецессивное заболевание, возникающее в результате дефицита фермента альфа-L-идуронидазы из-за мутаций в гене *IDUA* (HSA4q16.3). Это приводит к накоплению белково-углеводных комплексов и жиров в клетках организма. В результате у больных наблюдается малый рост, существенная задержка умственного развития, увеличение печени и селезенки, пороки сердца, помутнение роговицы, деформация костей и огрубение черт лица (рис. 129).

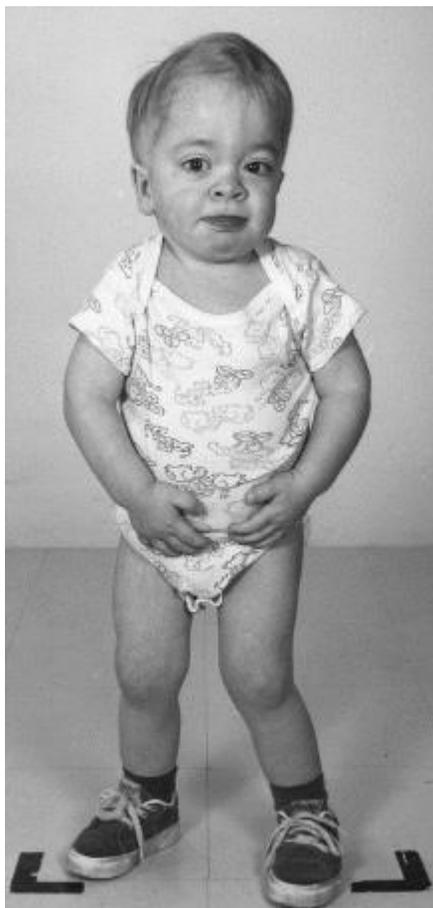


Рис. 129. Синдром Хурлера\*

---

\* URL: [http://medgen.genetics.utah.edu/photographs/pages/hurler\\_syndrome.htm](http://medgen.genetics.utah.edu/photographs/pages/hurler_syndrome.htm)

*Мукополисахаридоз типа II (синдром Хантера)* – сцепленное с полом рецессивное заболевание, которое обусловлено дефектом фермента идуронатсульфотазы из-за мутации в гене *IDS* (HSAХq28). Веществами накопления являются дерматан- и гепарансульфаты. Характерны грубые черты лица, скафоцефалия, шумное дыхание, низкий грубый голос, частые острые респираторные вирусные инфекции (рис. 130). В возрасте 3–4 лет появляются нарушения координации движений – походка становится неуклюжей, дети при ходьбе часто падают. Для больных характерны эмоциональная лабильность и агрессивность. Наблюдаются также прогрессирующая тугоухость, узелковые поражения кожи спины, остеоартриты, поражения роговицы.



Рис. 130. Синдром Хантера\*

*Мукополисахаридоз типа III (синдром Санфилиппо, болезнь Санфилиппо)* – заболевание, вызванное накоплением гепарансульфата. Для него характерна генетическая гетерогенность – существуют четыре типа этой болезни, вызванные мутациями в четырех разных генах, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме накапливаемого вещества. Первые сим-

---

\* URL: <http://lnsk.ru/news/russia/23335.html>

птомы болезни в виде нарушений сна появляются у детей старше трех лет. Постепенно развивается апатия, отмечается задержка психомоторного развития, нарушения речи, черты лица становятся грубыми. Со временем дети перестают узнавать окружающих. Для больных характерны задержка роста, контрактуры суставов, гипертрихоз, умеренная гепатоспленомегалия. В отличие от синдромов Хурлера и Хантера при болезни Санфилиппо преобладает умственная отсталость, а поражения роговицы и сердечно-сосудистой системы отсутствуют.

*Фибродисплазия (оссифицирующий миозит, параоссальная гетеротопическая оссификация, болезнь Мюнхеймера)* – заболевание соединительной ткани, связанное с ее прогрессирующим окостенением в результате мутации в гене *ACVR1* (HSA2q23-q24), который кодирует рецептор активина А. Тип наследования – аутосомно-доминантный. Заболевание проявляется врожденными дефектами развития – прежде всего искривленными большими пальцами стоп и нарушениями в шейном отделе позвоночника на уровне позвонков с2 – с7. Заболевание имеет прогредиентный характер, приводит к значительным нарушениям функционального состояния опорно-двигательного аппарата, глубокой инвалидизации больных и смерти преимущественно в детском и молодом возрасте (рис. 131). Болезнь еще называют «болезнь второго скелета», так как там, где в организме должны происходить штатные противовоспалительные процессы, начинается рост кости.



Рис. 131. Фибродисплазия\*

## 6. Нарушения циркулирующих белков

*Гемоглобинопатии* – наследственные нарушения синтеза гемоглобина. Различают две группы гемоглобинопатий. Для первой характерно изменение первичной структуры белка глобина, что может сопровождаться нарушениями его стабильности и функции (например, *серповидноклеточная анемия*). При гемоглобинопатиях второй группы структура гемоглобина остается нормальной, снижена лишь скорость синтеза глобиновых цепей (например,  *$\beta$ -талассемия*).

## 7. Нарушения обмена веществ в эритроцитах

*Наследственный сфероцитоз* – врождённая недостаточность липидов оболочки эритроцитов. Для заболевания характерен аутосомно-доминантный или аутосомно-рецессивный тип наследования в зависимости от мутации ге-

---

\* URL: <http://donbass.ua/news/health/2010/02/15>

на *SPTA1* (HSA1q21), который кодирует эритроцитарный  $\alpha$ -1 спектрин. Аномалия этого белка приводит к повышению концентрации ионов натрия внутри эритроцита, и проникновению в него избытка воды из-за повышения осмотического давления. Вследствие этого образуются сферические эритроциты – сфероциты, которые в отличие от двояковогнутых нормальных эритроцитов не обладают способностью изменять форму в узких участках кровотока, например при переходе в синусы селезенки. Это приводит к замедлению продвижения эритроцитов в синусах селезенки и отщеплению части мембраны эритроцита с образованием микросфероцитов. Разрушенные эритроциты поглощаются макрофагами селезенки. Гемолиз эритроцитов приводит к гиперплазии клеток пульпы и увеличению селезенки. Одним из основных клинических симптомов является желтуха. Основными симптомами наследственного сфероцитоза являются увеличение селезенки (обычно выступает из-под подреберья на 2–3 см) и желтуха. Иногда наблюдаются признаки замедленного развития, нарушения лицевого скелета, башенный череп, седловидный нос, высокое стояние нёба, нарушения расположения зубов, узкие глазницы.

#### 8. Наследственные болезни обмена металлов

*Болезнь Коновалова-Вильсона (гепатоцеребральная дистрофия)* – аутосомно-рецессивное нарушение метаболизма меди, приводящее к тяжелейшим поражениям центральной нервной системы и внутренних органов. Заболевание обусловлено низким или аномальным синтезом церулоплазмина (белка, транспортирующего медь) из-за недостаточности ферментативной активности медь-переносящей АТФазы. Мутации (их описано около 200) в гене *ATP7B* (HSA13q14-q21) приводят к изменениям  $\beta$ -полипептида этого фермента, что является генетической основой этой патологии. Основную роль в патогенезе играет нарушение обмена меди, её накопление в нервной, почечной, печёночной тканях и роговице, вследствие чего происходит токсическое повреждение медью данных ор-

ганов. В печени формируется крупноузловой или смешанный цирроз. В почках в первую очередь страдают проксимальные каналцы. В головном мозге поражаются в большей степени базальные ганглии, зубчатое ядро мозжечка и черная субстанция.

#### 9. Нарушения всасывания в пищеварительном тракте

*Муковисцидоз (кистозный фиброз)* – аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся поражением желез внешней секреции, тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Причиной являются мутации гена *CFTR* (HSA7q31.2), который кодирует трансмембранный регулятор кистозного фиброза. Заболевание характеризуется поражением желез внешней секреции, тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания и желудочно-кишечного тракта.

*Непереносимость лактозы (гиполактазия)* – аутосомно-рецессивное патологическое состояние плохого усвоения лактозы (молочного сахара), генетической основой которого являются мутации в регуляторной и кодирующей областях гена *LCT* (HSA2q21), который кодирует лактазу. Этот фермент экспрессируется преимущественно в ресничных клетках кишечника и отвечает за расщепление лактозы на галактозу и глюкозу. Основными симптомами лактазной недостаточности являются метеоризм, боли в животе, диарея, рвота. У детей лактазная недостаточность может проявляться хроническими запорами, беспокойством и плачем после еды. В разных популяциях человека частоты мутантных аллелей варьируют от 1 до 100 %.

#### 10. Гормональные нарушения

*Тестикулярная феминизация (синдром Морриса)* – сцепленное с полом рецессивное заболевание, когда при мужском кариотипе (46, XY) проявляется женский фенотип. Экспрессивность варьирует. При неполной феминизации гонады развиваются по мужскому типу, но некоторые половые признаки

соответствуют женскому полу с разной степенью выраженности – гипертрофированный клитор, неполное закрытие шва мошонки, мошонкообразные большие половые губы, укороченное влагалище (рис. 132). При полной феминизации основным симптомом является отсутствие менструаций и полового оволосения при хорошо развитых молочных железах и женском фенотипе. Причиной заболевания являются различные мутации в гене *AR* (HSAХq11-q12), который кодирует рецептор андрогена.



Рис. 132. Вид наружных половых органов при неполной тестикулярной феминизации\*

*Андрогенитальный синдром (женский псевдогермафродитизм)* – эндокринное нарушение с аутосомно-рецессивным типом наследования, при котором больная имеет наружные

---

\* URL: [http://www.health-ua.org/img/woman/tab1/8\\_17.jpg](http://www.health-ua.org/img/woman/tab1/8_17.jpg)

половые органы мужского типа и женскую гормональную структуру. У больных увеличен клитор, который становится похож на мужской половой член с одним уро-генитальным отверстием, отсутствует наружный вход во влагалище, малые половые губы отсутствуют, большие губы похожи на «разрубленную» мошонку. При этом внутренние половые органы могут иметь нормальный вид. Генетической основой заболевания являются мутации гена *CYP21* (HSA6q21.3), который кодирует фермент 21-гидроксилазу группы цитохрома P450, участвующий в синтезе гормонов альдостерона и кортизола.

## ***12.6. Генетика эмоционально-личностных расстройств и девиантного поведения***

*Шизофрения* – группа прогрессирующих психических заболеваний, протекающих с характерными изменениями личности – эмоциональное оскудение, утрата единства, потеря связи с реальностью, расстройства мышления и развитие бредовых, кататонических и аффективных расстройств. Описано 14 различных локусов, связанных с предрасположенностью к заболеваниям подобного рода, в районах 5q33-q35, 11q14-q21, 6p23, 22q11, 6q13-q26, 8p22-p21, 13q32, 18p, 1q42, 15q15, 10q22, 1p36.2, 15q13.3, 2q32.1.

*Ранний детский аутизм* – нарушение развития нервной системы, для которого характерно наличие триады: недостаток социальных взаимодействий, нарушенная взаимная коммуникация, ограниченность интересов и повторяющийся репертуар поведения. Это расстройство возникает в результате нарушения развития головного мозга и характеризуется выраженным и всесторонним дефицитом социального взаимодействия и общения, а также ограниченными интересами и повторяющимися действиями. Все указанные признаки проявляются в возрасте до трёх лет. Схожие состояния, при которых отмечаются более мягкие признаки и симптомы, относят к расстройствам аутистического спектра. Заболевание отличается генетической гетерогенностью – известно 17 ауто-

сомных: 7q22, 7q11, 13q14, 15q11, 2q, 17q11, 17q21, 3q25-q27, 7q31, 7q36, 1q41, 21p13-q11, 12q14, 16p11.2, 7q35-q36, 3q24, 11q13 и три X-сцепленных локуса предрасположенности к аутизму. В некоторых случаях известны мутации определенных генов, связанные с этим заболеванием. Например, три X-сцепленные формы этого заболевания обусловлены мутациями в генах *NLGN3* (HSAXq13), *NLGN4* (HSAXp22.33) и *MECP2* (HSAXq28), которые кодируют нейрوليгин 3, нейрوليгин 4 и метил-СpG-связывающий белок 2 соответственно. Три аутосомные формы – AUTS15, AUTS16 и AUTS17 – вызваны мутациями в генах *CNTNAP2* (HSA7q35-q36), *SLC9A9* (HSA3q24) и *SHANK2* (HSA11q13).

*Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ)* – неврологическо-поведенческое расстройство развития, которое начинается в детском возрасте и проявляется в трудности концентрации внимания, гиперактивности и плохо управляемой импульсивности. СДВГ можно диагностировать, начиная с позднего дошкольного или школьного возраста, так как для постановки диагноза необходима оценка поведения ребенка как минимум в двух условиях обстановки (например, дома и в школе). Наличие нарушений обучения и социальных функций является необходимым критерием для установления диагноза СДВГ. Одним из главных признаков СДВГ, наряду с нарушениями внимания, является импульсивность – недостаток контроля поведения в ответ на конкретные требования. Такие дети быстро реагируют на ситуации, не дожидаясь указаний и инструкций, которые позволяют выполнить задание, и неадекватно оценивают требования задания. Они очень небрежны, невнимательны, беспечны и легкомысленны, не всегда могут рассмотреть потенциально негативные последствия своих поступков. Показана связь СДВГ с мутациями в восьми генах: *DRD5* (HSA4p16), *DAT1* (HSA5p15), *HTR1B* (HSA6q1), *ADRA2A* (HSA10q24), *DRD4* (HSA11p15), *SCN8A* (HSA12q13), *SNAP25* (HSA20p11.2) и *COMT* (HSA22q11).

*Предрасположенность к алкоголизму* в первую очередь обусловлена мутантными аллелями генов кластера *ADH* (HSA4q22), кодирующих различные субъединицы алкогольдегидрогеназы. Этот фермент катализирует окисление спиртов до альдегидов и кетонов. При его дефиците этанол накапливается в организме, что усиливает токсическое действие алкоголя. Известно, что в районах традиционного употребления виноградного вина (например, Средиземноморье, Кавказ) наблюдается наименьшая частота встречаемости аллелей, кодирующих дефектную алкогольдегидрогеназу. Высокая частота мутантных аллелей наблюдается в Скандинавии, среди индейцев и азиатских монголоидов, что во многом определяет большее распространение алкоголизма у этих народов.

Кроме генов *ADH*, на развитие алкогольной зависимости влияют гены *SNCA* (HSA4q22.1), *GABRA2* (HSA5q34), *NPY* (HSA7p15), *TAS2R16* (HSA7q31), *TAS2R38* (HSA7q35), *CHRM2* (HSA7q35), *ANKK1* (HSA11q23), *DRD2* (HSA11q23), *ALDH2* (HSA12q24), *NRXN3* (HSA14q), *SLC6A4* (HSA17q) и гены опиоидных рецепторов.

*Криминальное поведение* характерно для лиц, страдающих некоторыми хромосомными болезнями (например, синдром Клайнфельтера, синдром дополнительной Y-хромосомы).

Кроме того, на большой выборке (более 14000) осужденных, которые были приемными детьми, было показано наличие корреляций (статистических связей) по криминальному поведению с биологическими родителями и отсутствие таковой с приемными родителями. Это свидетельствует о значительном влиянии наследственных факторов в склонности к совершению преступлений.

## ***12.7. Современные подходы к лечению и профилактике наследственных заболеваний***

Лечение наследственных заболеваний может быть четырех типов:

- симптоматическое – устранение или смягчение сим-

птомов. Применяется практически при всех наследственных патологиях, в некоторых случаях является единственно возможным;

- хирургическое – удаление, коррекция или трансплантация органов и тканей;

- патогенетическое – врачебное вмешательство в патогенез. Понимание молекулярно-генетических основ заболевания и особенностей протекания биохимических процессов позволяет во многих случаях корректировать развитие патологии на уровне ферментов или субстратов, либо замещать недостающих белковый продукт;

- этиологическое – устранение причины заболевания. Возможно при помощи генной терапии, которая заключается в замене мутантного участка ДНК на нормальный.

Генная терапия (генотерапия) — совместное применение методов генной инженерии и медицинских подходов с целью внесения изменений в геном соматических клеток человека для лечения заболеваний. Методы генной терапии появились в результате развития техники рекомбинантной ДНК. Широкое применение генотерапии в клинической практике началось в 1993 г., когда было проведено лечение пациентов, страдающих тяжелым комбинированным иммунодефицитным синдромом (SCID). У больных детей извлекли Т-лимфоциты, трансформировали ретровирусным вектором, введя нормальный ген аденозиндезаминазы и вернули клетки в организм. Такую процедуру было необходимо повторять каждые четыре года. Более эффективной оказалась аналогичная трансформация стволовых клеток костного мозга. Позднее были опубликованы данные о полном излечении 8-летнего мальчика, страдающего этим заболеванием. В настоящее время около четверти детей, страдающих SCID, лечат при помощи генотерапии.

Для лечения муковисцедоза неповрежденную копию гена *CFTR*, включенную в аденовирусный вектор или липосому, вводят в форме аэрозоля в дыхательные пути больного.

Введение нормальной последовательности гена *DMD* при помощи аденовирусного вектора в мышечные волокна больных миодистрофией Дюшенна позволяет добиться временного терапевтического эффекта.

В настоящее время около 400 проектов по генотерапии находятся на разных стадиях клинических испытаний.

Используют два основных подхода, различающиеся природой клеток-мишеней:

- фетальная генотерапия, т. е. введение ДНК в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития. В случае успеха введенная последовательность попадает во все клетки реципиента, включая половые, что обеспечивает передачу следующему поколению;

- соматическая генотерапия, при которой генетический материал вводят только в соматические клетки.

Стандартная схема коррекции наследственного дефекта при помощи генотерапии начинается с создания экспрессирующейся генетической конструкции, содержащей кодирующую и регуляторную части гена. Затем решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени. Затем проводится трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени, оценивается эффективность трансфекции, степень коррегируемости первичного биохимического дефекта в условиях клеточных культур (*in vitro*) и, что особенно важно, *in vivo* на животных – биологических моделях. Только после этого переходят к клиническим испытаниям.

В лечении онкологических и некоторых других заболеваний большие надежды возлагают на использование малой интерферирующей РНК, которая может подавлять синтез определенных белков и приводить соответствующую молекулу мРНК к деградации.

Принято выделять три вида профилактики наследственной патологии:

- первичная профилактика – предупреждение зачатия больного ребенка. При этом учитывается возраст матери, ге-

терозиготное носительство рецессивных патологий, кровность брака;

- вторичная профилактика – рекомендация по прерыванию беременности в случае диагностированной пренатально патологии или при высоком риске появления наследственного заболевания у плода;

- третичная профилактика – коррекция наследственных патологических состояний на уровне фенотипа.

В задачи медико-генетических консультаций входит диагностика наследственных заболеваний, определение генетического риска рождения больного ребенка, консультирование семейных пар по вопросам профилактики и лечения наследственных заболеваний. Основы лабораторной диагностики и расчета генетического риска изложены в разд. 12.3.

Основания для направления семейных пар в медико-генетическую консультацию:

- установленная или подозреваемая патология в семье (данные просеивающей лабораторной диагностики, рождение ребенка с наследственной патологией, задержка физического развития или умственная отсталость у ребенка, повторные спонтанные аборты, выкидыши, мертворождения);

- возраст матери старше 35 лет;

- кровнородственные браки;

- воздействие тератогенов (веществ, вызывающих врожденные аномалии) в первом триместре беременности;

- неблагоприятное протекание беременности.

Даже при отсутствии приведенных выше показаний молодым супругам рекомендуется обратиться в медико-генетическую консультацию при планировании деторождения.

В штате медико-генетической консультации должны быть специалисты – врач-генетик, цитогенетик и генетик-биохимик. Для составления заключения используют следующие методы: клинико-генеалогический, цитогенетический, молекулярно-генетический и неспецифические методы лабо-

ракторной диагностики в зависимости от характера наследственной патологии. На основе заключения врач-генетик проводит собеседование с супругами, в котором информирует их о возможных последствиях беременности и дает рекомендации.

### **Контрольные вопросы и задания**

1. У отца вторая группа крови, у матери – первая. Родились близнецы – мальчик с первой группой крови и девочка – с четвертой. Может ли формальный отец считаться биологическим отцом этих детей?

2. Зависит ли вероятность рождения близнецов у супружеской пары от наличия или отсутствия близнецов среди кровных родственников жены и мужа?

3. У пациента обнаружено три тельца Барра. Каков его предполагаемый кариотип?

4. Оба супруга – гетерозиготы по мутации гена *LCT*. Каков риск рождения ребенка с непереносимостью лактозы?

5. Рассчитайте генетический риск рождения мальчика с синдромом Леша-Нихена у гетерозиготной по мутации гена *HPRT1* матери и здорового отца.

6. Какие подходы применяются к лечению практически всех наследственных заболеваний?

7. Входит ли третичная профилактика наследственных заболеваний в сферу деятельности медико-генетических консультаций?

8. Есть ли необходимость практически здоровым молодоженам старше 35 лет обращаться в медико-генетическую консультацию?

9. К какой группе наследственных заболеваний можно отнести муковисцидоз?

10. Может ли у гетерозиготы по мутации гена *SPTA1* быть наследственный сфероцитоз?

11. Какое наследственное заболевание вызвано накоплением гепарансульфата?

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная*

1. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учеб. пособие. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во. 2003. – 478 с.

### *Дополнительная*

2. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. – М.: Мир, 1988. – Т. 3. – 332 с.

3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. – М.: Гэотар-Мед, 2002. – 457 с.

4. Завертяев Б.П. Биотехнология в производстве и селекции крупного рогатого скота. – М.: Агропромиздат, 1989. – 232 с.

5. Льюин Б. Гены. – М.: Мир, 1987. – 544 с.

6. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. – М.: Наука, 2000. 830 с.

7. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: в 2 т. – М.: Мир, 1998. – Т. 1. – 373 с.

8. Тихомирова М.М. Генетический анализ: учеб. пособие. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280 с.

9. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека. – М.: Мир, 1989. – Т. 1. – 308 с.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- 30 нм фибрилла – 4.3
- BLAST – 7.5
- C-метод – 4.4
- G+-район – 4.4
- G-метод – 4.4
- Hfr-клетки – 2.8
- in silico – 7.3
- LINE – 7.2
- N-метод – 4.4
- OMIM – 7.5
- PubMed – 7.5
- Q-метод – 4.4
- R+-район – 4.4
- R-метод – 4.4
- SINE – 7.2
- SYBR GREEN – 6.4
- T-метод – 4.4
- $\beta$ -талассемия – 12.5
- Аберрация хромосом – 8.4
- Автополиплоидия 8.3
- Акроцентрическая хромосома (acrocentric) – 4.1
- Алкаптонурия – 12.5
- Аллель дикого типа – 2.1
- Аллополиплоидия – 8.3
- Альтернативный сплайсинг – 3.4
- Амплификатор – 6.4
- Амплификация – 8.4
- Анализирующее скрещивание – 2.1
- Анафаза – 4.2
- Андрогенитальный синдром – 12.5
- Анеуплоидия – 8.3
- Ауксотрофы – 2.8
- Аутосомно-доминантный тип наследования – 2.4

Аутосомное сцепление – 2.7  
Аутосомно-рецессивный тип наследования – 2.4  
Аутосомный, ограниченный полом тип наследования – 2.4  
Аутосомы – 2.4  
Ацентрический фрагмент – 8.4  
Биоинформатика – 6.7  
Близнецовый метод – 12.1  
Блот-гибридизация по Саузерну – 6.2  
Болезнь Гирке – 12.5  
Болезнь Гоше – 12.5  
Болезнь Коновалова-Вильсона – 12.5  
Болезнь Ниманна-Пика – 12.5  
Внутрихромосомные перестройки – 8.4  
Возвратное скрещивание – 2.1  
Галактоземия – 12.5  
Гемизигота – 2.1  
Гемоглобинопатия – 12.5  
Ген – 1  
Генеалогический метод – 2.3  
Генетика – I  
Генетическая интерференция – 2.7  
Генетический анализ – II  
Генетический прогресс – 11.1  
Генетический риск – 12.3  
Ген-кандидат – 11.2  
Генная конверсия – 8.7  
Генная терапия (генотерапия) – 12.7  
Геномика – 7.1  
Геномная мутация – 8.3  
Геномная оценка – 11.2  
Геномные базы данных – 7.5  
Геномные библиотеки – 6.3  
Геномный импринтинг – 10  
Геномный фингерпринтинг – 7.2  
Генотип – 1  
Генотипический класс – 2.1

Гетерозигота – 2.1  
Гетерохроматин – 4.4  
Гибридизация *in situ* – 4.5  
Гибридизация нуклеиновых кислот – 6.2  
Гистоновый код – 10  
Гистоны – 4.3  
Глазо-кожный альбинизм 1 – 12.5  
Голандрический тип наследования – 2.4  
Гомозигота – 2.1  
Гомология – 7.4  
Гонадный пол – 5  
Гридированные геномные библиотеки – 6.3  
Делеция – 8.4  
Денатурация – 4.5  
Дефишенси – 8.4  
Диакинез – 4.2  
Дигибридное скрещивание – 2.5  
Диктиотена – 4.2  
Диплотена – 4.2  
Дискордантность – 12.1  
Дисперсный повтор – 7.2  
Дифференциальное окрашивание – 4.4  
Дицентрическая хромосома – 8.4  
ДНК – 3.1  
ДНК-полимераза – 3.2  
Доминирование – 2.2  
Дот-блот-гибридизация – 6.2  
Дупликация – 8.4  
Закон единообразия гибридов первого поколения – 1  
Закон независимого наследования – 1  
Закон расщепления – 1  
Закон Харди-Вайнберга – 9  
Зиготена – 4.2  
Изменчивость – 1  
Изохора – 7.3  
Изохромосома – 8.4

Инбридинг – 1  
Инвертированный повтор – 7.2  
Инсерция – 8.4  
Интерфаза – 4.2  
Интрон группы 2 – 8.8  
Интроны – 3.4  
Искусственная хромосома бактерий (ВАС) – 6.3  
Искусственные хромосомы дрожжей (УАС) – 6.3  
Капиллярный электрофорез – 6.5  
Клон – 2.8  
Клонирование нуклеиновых кислот – 6.1  
Кодоминирование – 2.2  
Колония микроорганизмов – 2.8  
Кольцевая хромосома – 8.4  
Комбинационная изменчивость – 8.1  
Комплементарность – 2.6  
Композиционная гетерогенность – 7.3  
Конкордантность – 12.1  
Консолидированный повтор – 7.2  
Контиг – 6.6  
Конъюгация – 2.8  
Космида – 6.3  
Коэффициент наследуемости – 11.1  
Криминальное поведение – 12.6  
Кросс – 11.1  
Кроссинговер – 2.7  
Кроссоверные гаметы – 2.7  
Кроссоверные особи – 2.7  
Кумулятивная полимерия – 2.6  
Кэпирование – 3.4  
Лайонизация – X  
Ламина – 4.1  
Лептотена – 4.2  
Лигирование – 6.1  
Линия – 11.1  
Локус количественного признака (QTL) – 11.2

Люмен – 4.1  
Малая интерферирующая РНК – 3.1  
Малая ядерная РНК (мяРНК) – 3.1  
Манифестация – 12.2  
Маркерная селекция – 11.2  
Медико-генетическое консультирование – 12.7  
Межаллельная комплементация – 2.2  
Мейоз – 4.2  
Метацентрическая хромосома (метацентрик) – 4.1  
Метод дробовика – 6.6  
Микросателлит – 7.2  
Микроцитогенетический синдром – 12.3  
Минисателлит – 7.2  
Митоз – 4.2  
Митохондриальный тип наследования – 2.4  
Митохондрии – 4.1  
Мобильный генетический элемент (МГЭ) – 8.8  
Модификационная изменчивость – 8.1  
Мозаицизм – 12.4  
Молекулярный маркер – 11.2  
Моногенное заболевание – 12.5  
Моногибридное скрещивание – 2.1  
Моносомия – 8.3  
Муковисцидоз – 12.5  
Мукополисахаридоз – 12.5  
МультиFISH – 4.5  
Мутаген – 8.5  
Мутантный аллель – 2.1  
Мутационная изменчивость – 8.1  
Наследственность – 1  
Наследственный сфероцитоз – 12.5  
Некумулятивная полимерия – 2.6  
Непереносимость лактозы – 12.5  
Неполное доминирование – 2.2  
Нозерн блот-гибридизация – 6.2  
Нонсенс-кодон – 3.5

Нуклеиновые кислоты – 3.1  
Нуклеонема – 4.3  
Нуклеосома – 4.3  
Нуклеотид – 3.1  
Нуллисомия – 8.3  
Однойцовые (монозиготные) близнецы – 12.1  
Оогенез – 4.2  
Определение пола – 5  
Ортология – 7.4  
Отбор – 11.1  
Открытая рамка считывания – 3.5  
Паралогия – 7.4  
Паралогон – 7.4  
Парацентрическая инверсия – 8.4  
Патология – 12.2  
Пахитена – 4.2  
Пенетрантность – 2.1  
Перицентрическая инверсия – 8.4  
Петлевой домен – 4.3  
Пластиды – 4.1  
Плейотропия – 2.6  
Поведенческий и метаболический пол – 5  
Подагра – 12.5  
Подбор – 11.1  
Позиционное клонирование – 11.2  
Полигибридное скрещивание – 2.5  
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – 6.4  
Полимерия – 2.6  
Полиплоидия – 8.3  
Полисома – 3.5  
Политенные хромосомы – 4.8  
Половой фактор – 2.8  
Полусибсы – 2.3  
Пора – 4.1  
Правило чистоты гамет – 1  
Праймер – 6.4

Предел Хейфлика – 4.6  
Предрасположенность к алкоголизму – 12.6  
Пренатальная диагностика – 12.3  
Пробанд – 2.3  
Прогрессирующее течение – 12.2  
Протеомика – 7.1  
Прототрофы – 2.8  
Профаза – 4.2  
Процессинг – 3.4  
Прямая репарация – 8.6  
Пуф – 4.8  
ПЦР в реальном времени – 6.4  
Разноййцовые (дизиготные) близнецы – 12.1  
Районы ядрышковых организаторов (ЯОР) – 4.7  
Ранний детский аутизм – 12.6  
Рекомбиназа – 8.2  
Рекомбинационное расстояние – 2.7  
Ренатурация – 6.2  
Репарация – 8.6  
Репликационная вилка – 3.2  
Репликация – 3.2  
Реципрокная транслокация – 8.4  
Реципрокные скрещивания – 2.7  
Рибозим – 8.8  
Рибосома – 3.1  
Рибосомная РНК (рРНК) – 3.1  
РНК – 3.1  
РНК-интерференция – 10  
РНК-полимераза – 3.3  
Робертсоновская транслокация – 8.4  
Рутинное окрашивание – 4.4  
Сайленсер – 3.3  
Сангиморган – 2.7  
Сателлит – 7.2  
Сборка сиквенсов геномов – 6.6  
Сверхдоминирование – 2.2

Секвенирование – 6.5  
Селекционный дифференциал – 11.1  
Селекция – 11.1  
Серия множественных аллелей – 2.2  
Серповидноклеточная анемия – 12.5  
Сестринские хроматидные обмены (СХО) – 4.2  
Сибсы – 2.3  
Синдром Ангельмана – 10  
Синдром Варкани – 12.4  
Синдром Вольфа-Хиршхорна – 12.4  
Синдром Дауна – 12.4  
Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) – 12.6  
Синдром дополнительной Y-хромосомы – 12.4  
Синдром Клайнфельтера – 12.4  
Синдром кошачьего крика (синдром Лежена) – 12.4  
Синдром Леша-Нихена – 12.5  
Синдром Мартина-Белл – 12.4  
Синдром Марфана – 12.5  
Синдром Патау – 12.4  
Синдром Прадера-Вилли – 10  
синдром Санфилиппо – 12.5  
Синдром тройной X-хромосомы – 12.4  
синдром Хантера – 12.5  
синдром Хурлера – 12.5  
Синдром Шерешевского-Тёрнера – 12.4  
Синдром Эдвардса – 12.4  
Спектральный анализ кариотипа – 4.5  
Сперматогенез – 4.2  
Сплайсинг – 3.4  
Сравнительная (эволюционная) геномика – 7.1  
Сравнительная геномная гибридизация (CGH) – 4.5  
Структурная геномика – 7.1  
Субклонирование – 6.6  
Супрессия – 2.6  
Супрессорная мутация – 8.5

Сцепление с полом – 2.7  
Сцепленное с полом доминантное наследование – 2.4  
Сцепленное с полом рецессивное наследование – 2.4  
Тандемный повтор – 7.2  
Теломера – 4.1  
Теломерная теория старения – 4.6  
Теломерный повтор – 4.6  
Телофаза – 4.2  
Тельце Бара – 10  
Терминация транскрипции – 3.3  
Тест на аллелизм – 2.2  
Тестикулярная феминизация – 12.5  
Транзиция – 8.5  
Трансверсия – 8.5  
Транскриптомика – 7.1  
Транскрипция – 3.3  
Транслокация – 8.4  
Трансляция – 3.5  
Транспозон – 8.8  
Транспортная РНК (тРНК) – 3.1  
Трисомия – 8.3  
Фаза клеточного цикла – 4.2  
Фенилкетонурия – 12.5  
Фенотип – 1  
Фенотипический класс – 2.1  
Фенотипический пол – 5  
Фенотипический сдвиг – 11.1  
Фибродисплазия – 12.5  
Флуорохром – 4.4  
Фрагмент Оказаки – 3.2  
Функциональная геномика – 7.1  
Химеризм – 6.3  
Хроматида – 4.1  
Хроматин – 4.3  
Хромомер – 4.3  
Хромонема – 4.3

Хромосома типа ламповых щеток – 4.9  
Хромосомный пейнтинг – 4.5  
Хромосомный пол – 5  
Хромосомоспецифический зонд – 4.5  
Хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ) – 12.4  
Центромера – 4.1  
Центромерный индекс – 4.1  
Цитогенетика – 4  
Чистая линия – 1  
Шизофрения – 12.6  
Штамм – 2.8  
Экзоны – 3.4  
Экспрессивность – 2.1  
Экцизионная репарация – 8.6  
Элонгация транскрипции – 3.3  
Эндорепликация – 4.8  
Энхансер – 3.3  
Эпигенетика – 10  
Эписома – 2.8  
Эпистаз – 2.6  
Эухроматин – 4.4  
Ядро – 4.1  
Ядрышко – 4.1

*Учебное издание*

**Алексей Александрович Сазанов**

**Г Е Н Е Т И К А**

Учебное пособие

Редактор *Т. Г. Захарова*  
Технический редактор *Н. В. Чернышева*  
Оригинал-макет *Н. В. Чернышевой*

---

Подписано в печать 29.03.2011. Формат 70х90  
*Бумага офсетная. Гарнитура Palatino Linotype. Печать офсетная.*  
Усл. печ. л. 16,5. Тираж 500 экз. Заказ № 623

---

Ленинградский государственный университет  
имени А.С. Пушкина  
196605, Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское шоссе, 10

---

РТП ЛГУ 197136, Санкт-Петербург, Чкаловский пр., 25а