ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Кафедра общей и клинической биохимии №1

З.И. Микашинович, Н.Р. Телесманич,
О.Г. Саркисян, Т.Э. Харатян

ГЕНОМИКА И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Учебное пособие

Ростов-на-Дону
2018

УДК547.96(075.8)
ББК 28.072я7
С 86

Геномика и генная инженерия: учебное пособие / Н.Р. Телесманич, О.Г. Саркисян, Т.Э. Харатян;под ред. З.И. Микашинович; ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, каф. общей и клинической биохимии №1. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2018. – 90 с.

Структура пособия основана на логике компетентностного подходаи направлена на теоретическое осмысление материала с акцентом на результат, что достигается включением заданий для самоподготовки.
Предназначено для студентов медицинских вузов.

Рецензенты:
Внуков В.В. – профессор кафедры биохимии и микробиологии Академии биологии и биотехнологии ФГАОУ ВО ЮФУ, д.б.н., профессор;

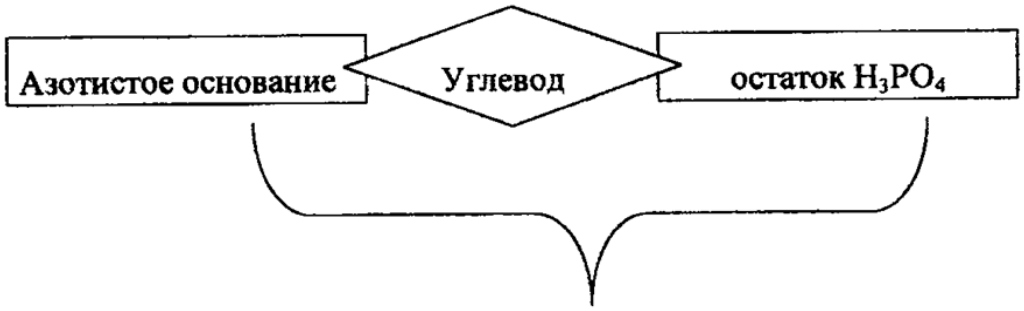
КорниенкоИ.В. – главный научный сотрудник отдела стратегических исследований Южного научного центра РАН, д.б.н.

Утверждено на заседании Центральной методической комиссии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, протокол № 7 от 1. 03. 2017г.

©ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,2018
©Микашинович З.И., Телесманич Н.Р., ЛетуновскийА.В.,
СаркисянО.Г., ХаратянТ.Э., 2018

Модуль 1. Строение нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты (НК) – полимеры мононуклеотидов со специфической структурой. Общая формула НК=n×мононуклеотид, где n – число мононуклеотидов $=7{,}5\times10^{3,6}$. Число комбинированных мононуклеотидов равно 4^n. НК состоит из мононуклеотидов. Мононуклеотид – структурная единица, состоящая из гетероциклического (азотистого) основания связанного с углеводным остатком, этерефицированными фосфорной кислотой.



мононуклеотид

1-й компонент – азотистое (или нуклеиновое) основание. В состав мононуклеотида входят гетероциклические (азотистые или нуклеиновые) основания:

а) пиримидинового ряда (т.к. являются производными пиримидина) это: урацил, тимин, цитозин.

б) пуринового ряда (т.к. являются производными пурина) это аденин и гуанин.

Пиримидиновые и пуриновые основания являются ароматическими системами и имеют плоское строение.

Азотистые основание могут иметь функциональные группы:

а) оксо- (урацил, тимин);

б) амино- (аденин).

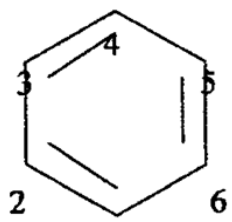
Для оксопроизводных пурина и пиримидина возможна лактим-лактамная таутомерия - они способны существовать в 2-х таутомерных формах:

1) лактамной (оксо- или кето-) – наиболее термодинамически устойчивой;

2) лактимной (гидрокси-), менее устойчивой.

В НК АО находятся преимущественно в кето-форме. Способность к таутомерным переходам необходима для формировании пространственной структуры НК.

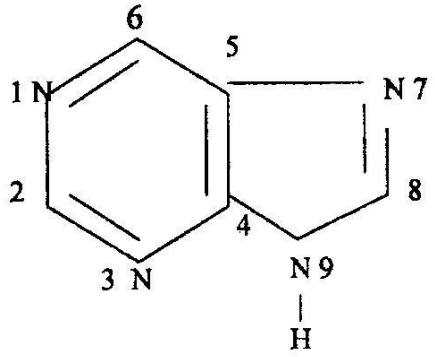
Пиримидиновые основания



N
1

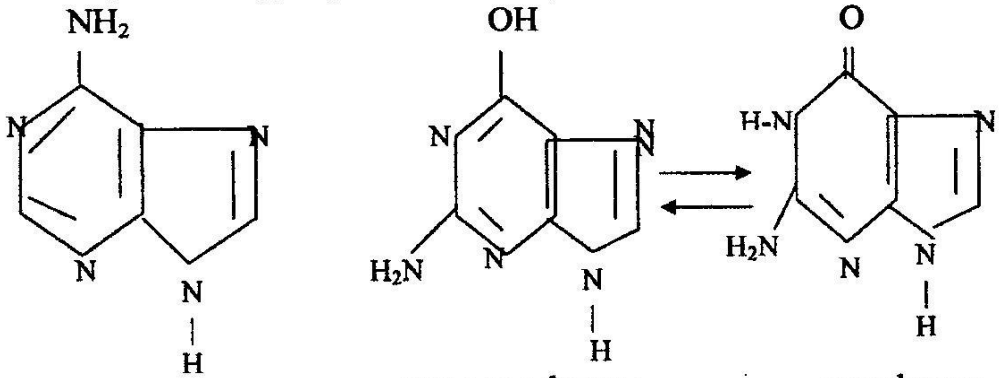
Пиримидин

Пуриновые основания



Пуриновые основания

Аденин (6-аминопурин) гуанин (2-амино-6-гидроксипурин)



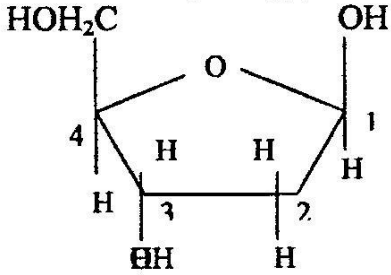
енольная форма (лактимная форма) кетоформа (лактамная форма)

Гуанин содержится в нуклеиновых кислотах в кетоформе.

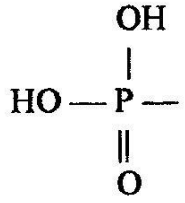
2-й компонент НК – углевод, который может быть:

а) β-D-рибофураноза (рибоза);

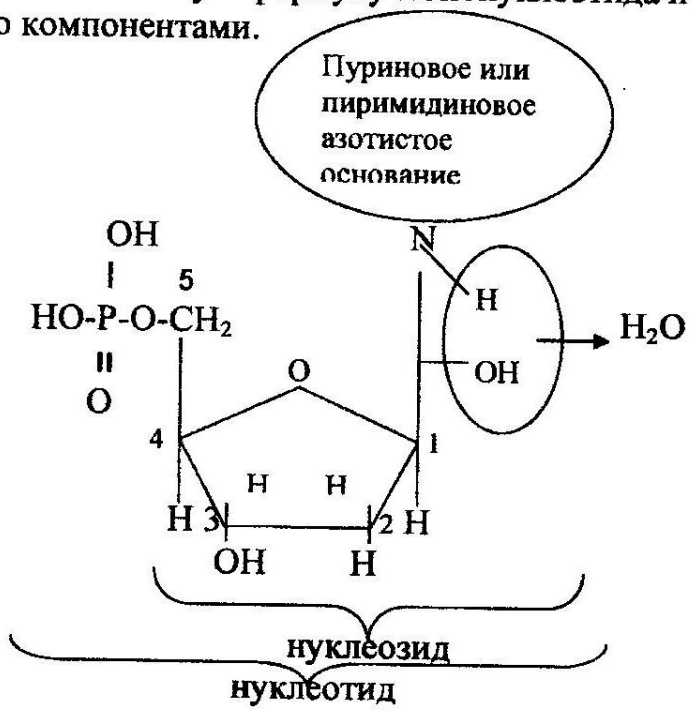
б) β-D-2-дезоксирибофураноза (дезоксирибоза):



3-й компонент – остаток фосфорной кислоты:



Запишите общую формулу мононуклеотида и укажите характер связи между его компонентами.



N-гликозидная связь – очень прочная, образуется между С-атомом дезоксрибозы (или рибозы) и N-атомом (1 или 9) азотистого основания. (N-1 у пиримидиновых и N-9 у пуриновых). При этом всегда образуется β-гликозидная связь. При частичном гидролизе мононуклеотида образуется нуклеозид и H_3PO_4.

Нуклеозид – N-гликозид, образованный нуклеиновым основанием и рибозой (или дезоксирибозой). Это двухкомпонентный продукт.

Нуклеотид – это фосфорилированный нуклеозид.

В зависимости от природы углеводного остатка мононуклеотиды делятся на 2 группы.

Нуклеотиды

Рибонуклеотиды (производные рибозидов)

Дезоксирибонуклеотиды (производные дезоксирибозидов)

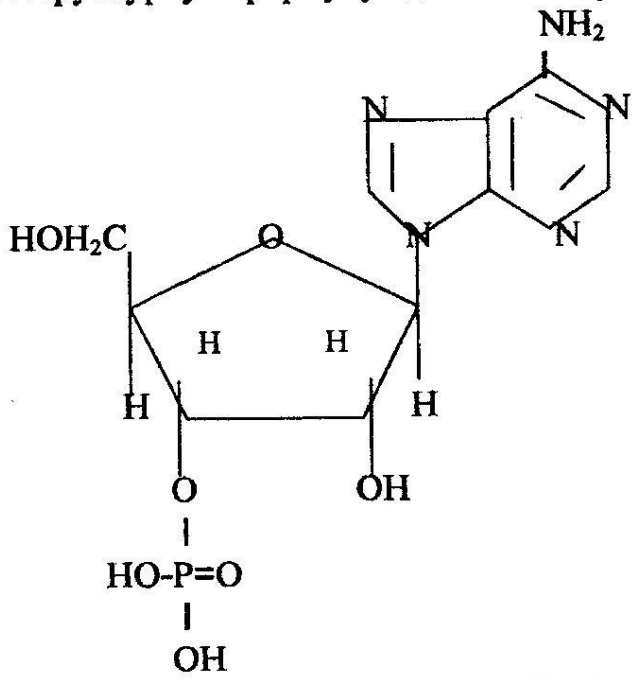
В состав рибонуклеотидов (РНК) входят следующие азотистые основания: А, Г, Ц, У. В состав дезоксирибонуклеотидов (ДНК) входят следующие азотистые основания: А, Г, Ц, Т.

Для нуклеотидов используют два вида названий. Первое включает наименование нуклеозида с указанием положения в нем фосфорного остатка. В зависимости от положения фосфорного остатка в рибо- и дезоскирибонуклеозиде различаю три типа нуклеотидов:

1) нуклеозид-5-фосфаты;
2) нуклеозид-3-фосфаты;
3) нуклеозид-2-фосфаты.

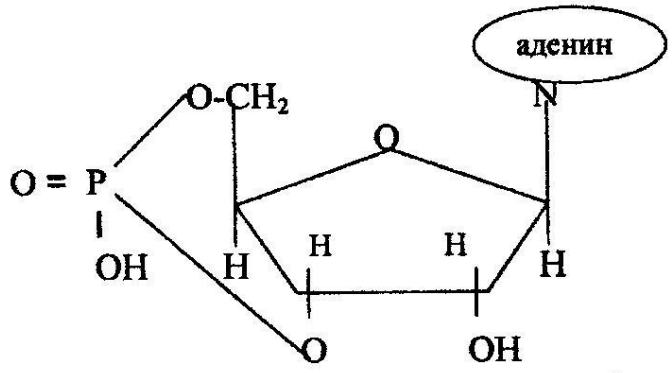
Например, аденозил-3'-фосфат, уридил-5'-фосфат.

Изобразим структурную формулу аденозил-3'-фосфата.



Известны нуклеотиды, в которых фосфорная кислота одновременно этерифицирует две гидроксильные группы. Такие нуклеотиды относятся к группе циклофосфатов. (Например, аденозин-3',5'-циклофосфат, гуанин-3',5'-циклофосфат).

Изобразим структуру аденозин 3',5'-циклофосфат (цАМФ).



Второе строится с добавлением "-овая кислота" к названию азотистого основания. Например: 3'-адениловая кислота, 5'-уридиловая кислота, циклическая адениловая кислота (цАМФ), циклическая гуаниловая кислота (цГМФ).

Минорные основания – пиримидиновые или пуриновые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот в малом количестве, помимо главных азотистых оснований. Особенностью строения минорных оснований является наличие в них дополнительных одной или двух NH_2-, CH_3-, и HO-групп, которые присоединяются к пуриновым и пиримидиновым основаниям. Пиримидиновые минорные основания чаще содержатся в т-РНК. Пуриновые минорные основания могут входить как в РНК, так и в ДНК. На долю минорных оснований приходится до 10% всех нуклеотидов.

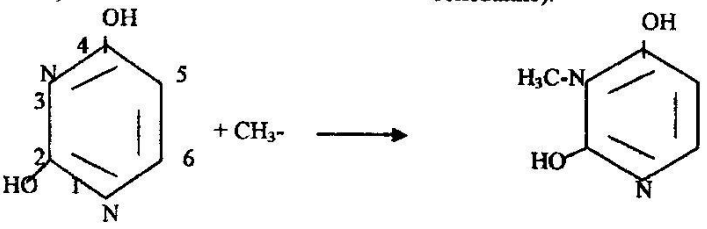
Нуклеотиды, входящие в состав НК.

	основания	нуклеозиды	мононуклеотид	
		рибозы	Как монофосфат	Как кислота
Рибонуклеотиды	Аденин	Аденозин	Аденозин-5-монофосфат	5'- адениловая
	Гуанин	Гуанозин	Гуанозин-5-монофосфат	5'-гуаниловая
	Урацил	Уридин	Уридин-5-монофосфат	5'-уридиловая
	Цитозин	Цитидин	Цитидин-5-монофосфат	5'-цитидиловая
Дезоксирибонуклеотид	дезоксирибозы			
	Аденин	Аденозин	Дезоксиаденозин-5-монофосфат	5'-дезоксиадениловая
	Гуанин	Гуанозин	Дезоксигуанозин-5-монофосфат	5'-дезоксигуаниловая
	Цитозин	Цитидин	Дезоксицитидин-5-монофосфат	5'-дезоксицитидиловая
	Тимидин	Тимидин	Тимидин-5-монофосфат	5'-тимидиловая

Пример минорных АО:

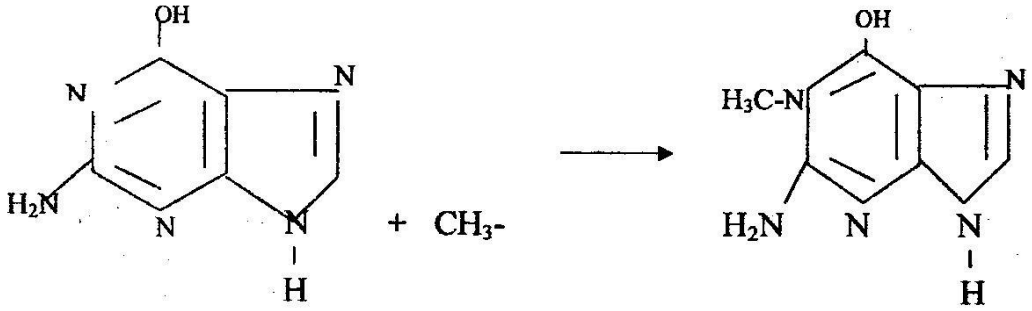
Урацил + CH_3 → 3-метилурацил.

(пиримидиновое основание) (минорное пиримидиновое основание).

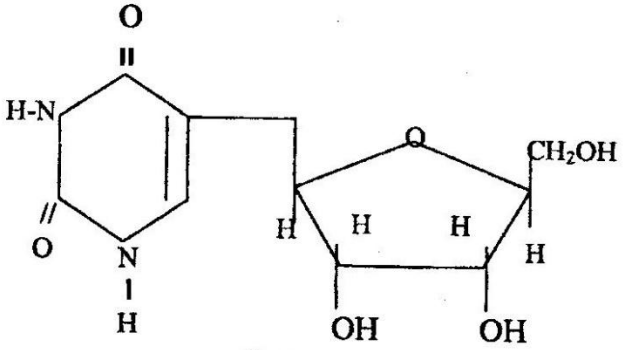


Гуанин + CH_3 → 1-метилгуанин.

(пуриновое основание) (минорное пуриновое основание).



Минорные нуклеотиды содержат минорные основания (например, метилированные), причём связь между основанием и рибозой не N-C, а C-C.



псевдоуридин

Физиологичекое значение минорных оснований.

1. Защита молекул ДНК и РНК от действия гидролитических ферментов.
2. Минорные нуклеотиды содержатся в петлях т-РНК и р-РНК. Они препятствуют образованию двойной спирали и участвуют в формировании вторичной структуры т-РНК и р-РНК.

Биологическая роль моно- и ди- нуклеоидов

Мононуклеотиды	Циклические нуклеотиды	Динуклеотиды.
являются исходным продуктом для построения макроэргов: АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ, УТФ.	участвуют в передаче информации в клетку. Это циклический АМФ И ГМФ.	1. выполняют роль коферментов, принимая участие в тканевом дыхании (НАФ, НАДФ, ФАД). 2.входят в состав ферментов оксидоредуктаз.

Модуль 2.

Классификация нуклеиновых кислот.

Структурная Организация.

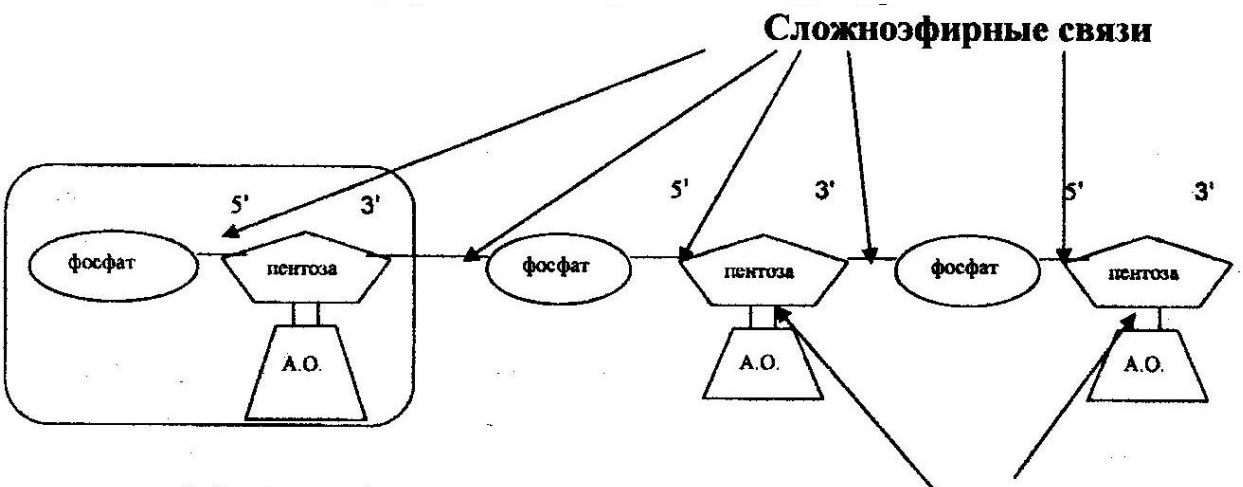
Классификация НК. Структурная организация НК.

В зависимости от химического строения, биологической роли и пространственной структуры НК делятся на ДНК и РНК (и-РНК т-РНК р-РНК).

Для НК характерны 3 вида структур (первичная, вторичная, третичная)

Первичная структура НК – это последовательность нуклеотидных звеньев, связанных ковалентными связями в непрерывную цепь полинуклеотида. Рибонуклотиды образуют РНК, дезоксирибонуклеотиды – ДНК. Характер связи между нуклеотидами фосфорная группа в полинуклеотидной цепи образует две сложноэфирные связи: с С-3' (углеводного атома) предыдущего нуклеотидного звена и С-5' последующего нуклеотидного звена. Полимерная цепь НК состоит из чередующихся пентозных и фосфатных остатков, а АО являются «боковыми» группами, присоединенными к пентозным остаткам. Концы линейной полинуклеотидной цепи обозначают: 5'-конец (слева) и 3'-конец (справа).

Написание цепи обычно начинают с 5'-конеца. 5'-конец ещё называют буквой Ф, т.к. на 5-м конце находится фосфатная группа, связанная только с одним нуклеотидным звеном. 3'-конец обозначают как ОН-конец, т.к. в пентозном остатке сохраняется свободной гидроксильная группа у С-3. Фосфорная кислота соединяется 5'-С атом рибозы (дезоксирибозы) одного нуклеотида с 3'-С атом другого нуклеотида. Первичная структура НК возникает за счёт 3'-5'-фосфоэфирных связей. Это – одна полинуклеотидная цепь ДНК или м-РНК (или и-РНК). М-РНК – синтезируется в ядре на одной тяжевой спирали ДНК. М-РНК представлена одной полинуклеотидной цепью. После синтеза м-РНК выходит из ядра в цитоплазму и направляется к рибосоме. Зрелые м-РНК содержатся в цитоплазме. К м-РНК, находящейся в рибосоме, прикрепляется своими антикодоновыми участкам т-РНК, несущие α-аминокислоты. Она несёт информацию о первичной структуре белка.



Нуклеотидное звено

5'-конец

|

Пентоза—основание

|

Фосфат

|

Пентоза—основание

|

Фосфат

|

Пентоза—основание

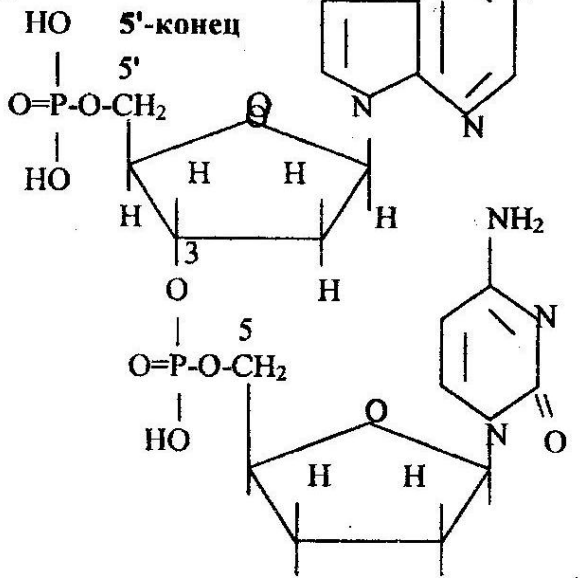
|

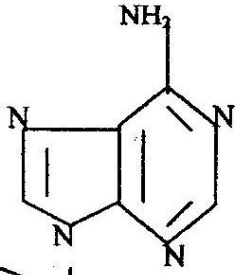
Фосфат

|

3'-конец

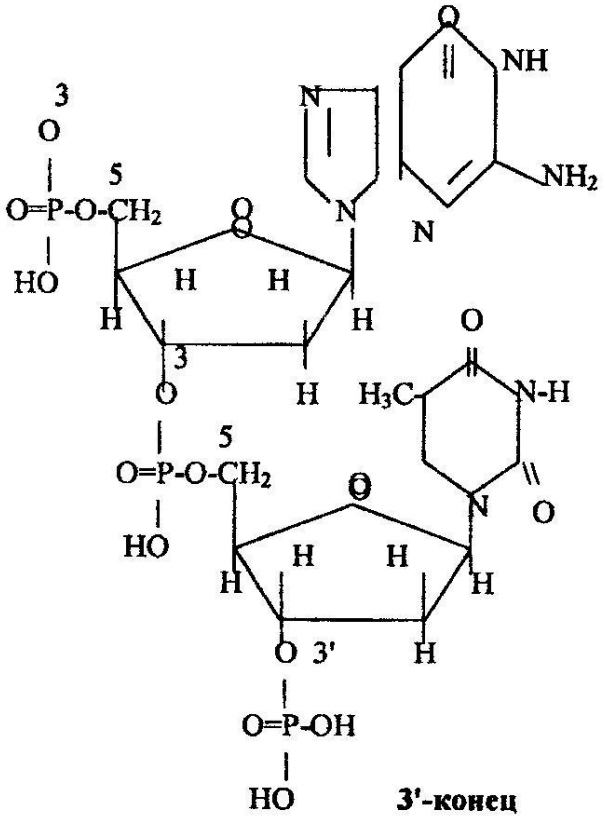
Или



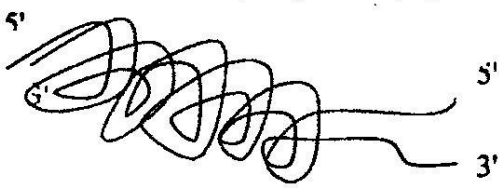


Аденин

Цитозин



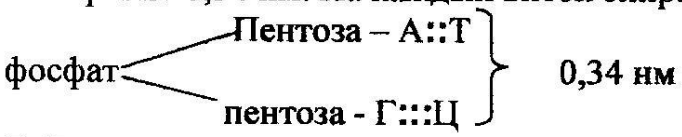
Вторичная структура НК – пространственная организация полинуклеотидных цепей в пространстве. Для ДНК – это двойная спираль. Вторичная структура РНК представлена т-РНК и р-РНК. Вторичная структура ДНК – представлена $2^{мя}$ правозакрученными (по часовой стрелке) полинуклеотидными цепями вокруг общей оси с образованием двойной спирали. Диаметр спирали 1,8 – 2,0 нм. Эти цепи антипараллельны друг другу: у одной цепи направление образования фосфодиэфирной связи 5'-3', у другой 3'-5'.



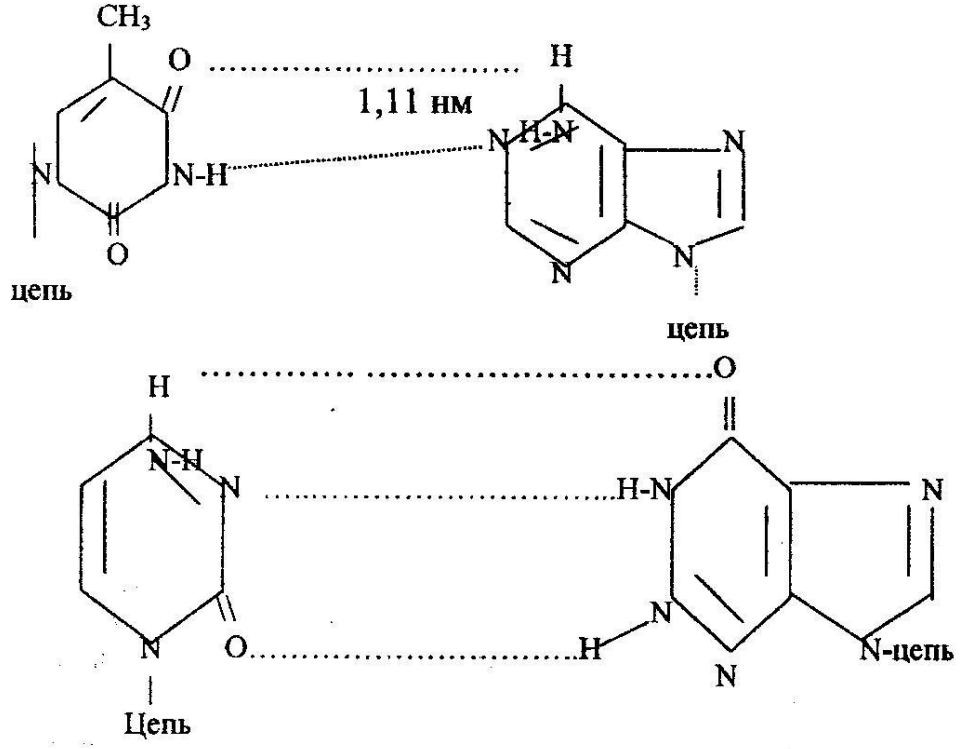
Пуриновые и пиримидиновые основания направлены внутрь двойной спирали. Эти основания составляют комплементарные пары: А=Т, Г=Ц.

Между пуриновыми основаниями одной цепи и пиримидиновыми основаниями другой цепи возникают водородные связи, за счёт аминогруппы одного основания и кетогруппы (С=О) другого: –NH • • • O=C-. Между А-Т образуется 2 водородные связи, между Г-Ц – 3 (связь более прочная и компактна). Комплементарные (взаимодополняющие) основания – это спаренные основания (одно пуриновое, другое пиримидиновое) за счет водородных связей. Площади, занимаемые парами комплементарных оснований, приблизительно одинаковые. Их плоскости расположены внутри двойной спирали перпендикулярно общей оси спирали, что обуславливает постоянный диа-

метр двойной спирали. Расстояние между плоскостями оснований по вертикали равно 0,34 нм. На каждый виток спирали приходится 10 пар оснований.



Т=Г

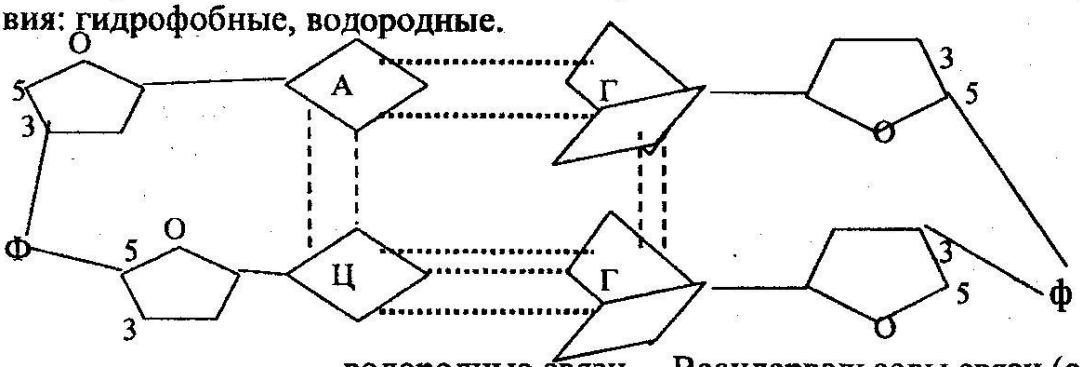


1,08 нм

Структура двойной спирали поддерживается 2[мя] видами связей.

1. Водородными (между А=Т, Г=Ц). Это поперечные связи т.к. они перпендикулярны центральной оси.
2. Ваандервальсовы связи. Если двойную спираль уподобить винтовой лестнице, то плоскости оснований будут играть роль ступенек этой лестницы.

Межплоскостные вертикальные взаимодействия в основном определяются Ваандервальсовыми силами. Это электростатические слабые взаимодействия: гидрофобные, водородные.



водородные связи Ваандервальсовы связи (силы).

Водная среда контактирует с наружной (гидрофобной) частью спирали, а внутренняя (гидрофобная) часть спирали с водной не контактирует. Две цепи ДНК, образующие двойную спираль не идентичны, но комплементарны между собой. Комплементарность оснований лежит в основе закономерностей, которым подчиняется нуклеотидный состав ДНК различного происхождения, сформулированных Э. Чаргаффом.

Правила построения ДНК (правило Чаргаффа)

1. Количество пуриновых оснований равно количеству пиримидиновых оснований, т.е. (А+Г)=(Ц+Т).
2. Количество А равно количеству Т (А=Т), аналогично количеству Г равно количеству Ц (Г=Ц).
3. Количество оснований, содержащих аминогруппу в положении 4 пиримидинового и положении 6 пуринового ядра, равно количеству оснований, содержащих в этих же положениях оксогруппу. Это означает, что А+Ц=Г+Т (т.е. комплементарность азотистых оснований, возникновение связей между ними).
4. Существенным для характеристики вида оказался так называемый *коэффициент специфичности*, отражающий отношение Г+Ц/А+Т.

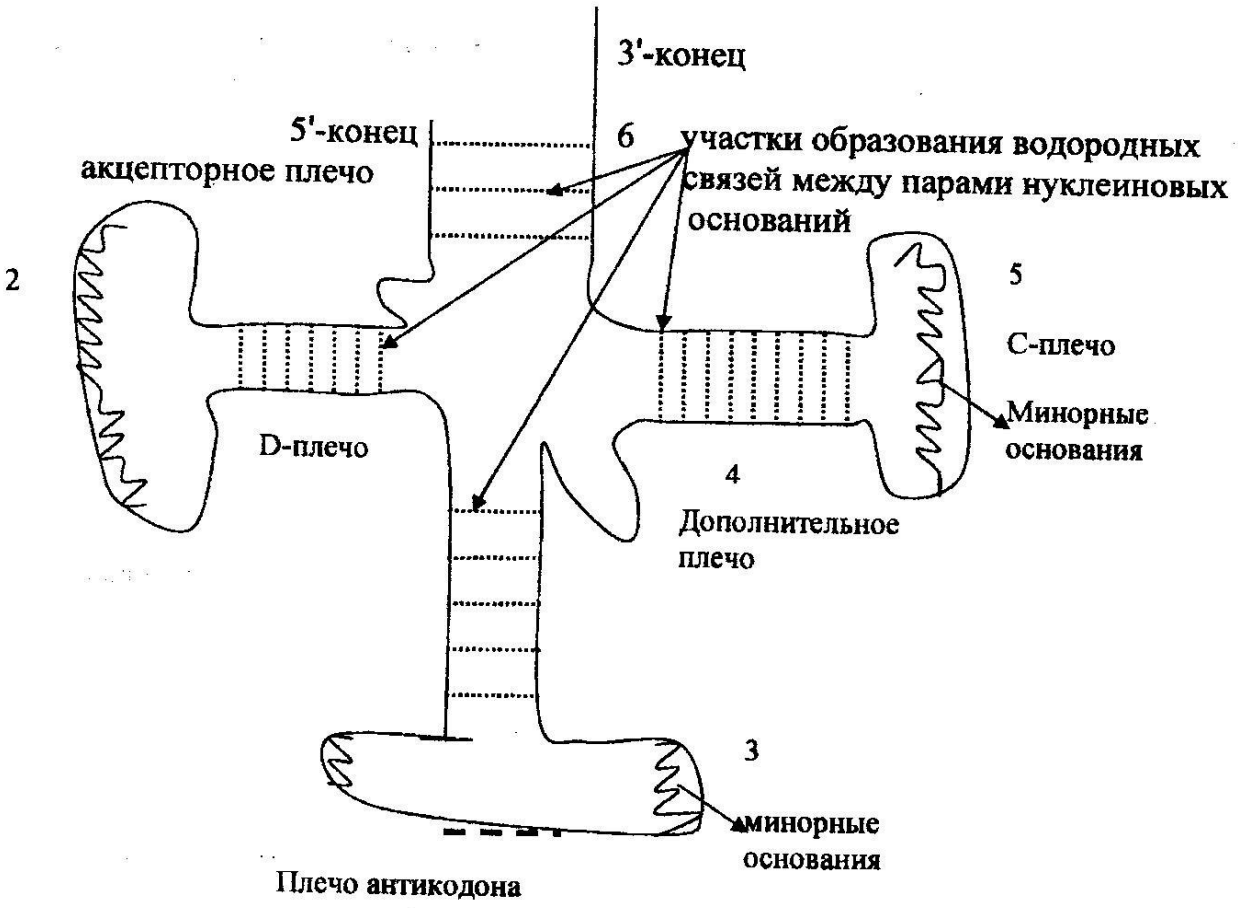
Это отношение часто выражается в молекулярных процентах или процентах Г-Ц пар (N=0,54 – 0,94). Mr ДНК = $2 \cdot 10^4$ -10^4-10^6 тысяч единиц. Для РНК правило Чаргаффа либо не выполняется, либо выполняется с некоторым приближением. Это обусловлено тем, что в составе РНК содержатся много минорных оснований.

Локализация ДНК – ядро клетки, митохондрии. Биологическая функция: хранение генетической информации. Код генетической информации записан 4 нуклеотидами в определенной последовательности.

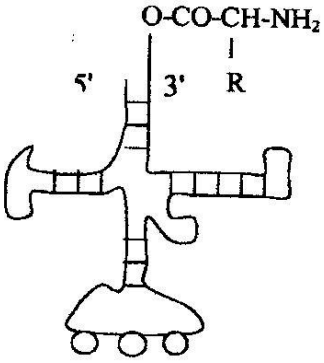
Т-РНК содержит около 75 нуклеотидов. M_r РНК $\approx 3 \times 10^4$. Вторичная структура представлена однотяжевой полинуклеотидной цепью, которая благодаря нескольким внутрицепочечным комплементарным участкам имеет вид «клеверного листка», или вид «пяти шпилек».

В цепи т-РНК имеются следующие участки:

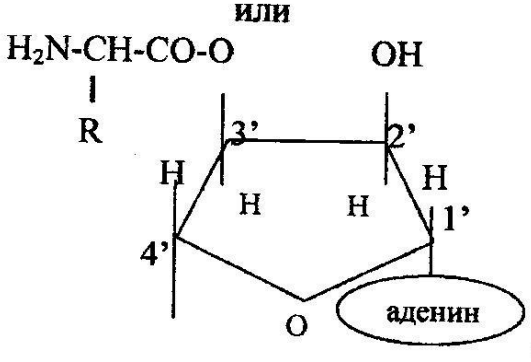
1) 5'-концевой участок, который заканчивается остатком гуаниловой кислоты;
2) дигидроуридиловая ветвь, которая содержит несколько остатков дигидроуридиловой кислоты;
3) антикодоновая ветвь – содержит специфический тринуклеотид, называемый антикодоном и соответствует определенной аминокислоте;
4) дополнительная петля – у разных т-РНК оно имеет разную длину, т-РНК различаются длиной этой дополнительной петли.
5) универсальная ветвь – в её состав входит характерный для всех т-РНК олигонуклеотидный участок ГТфЦ;
6) 3'-концевой участок, который оканчивается тринуклеотидом ЦЦА.

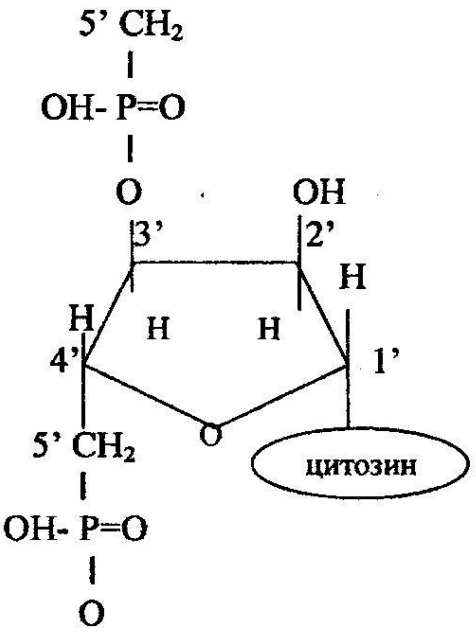


Для ковалентного связывании α-аминокислоты с т-РНК путём ацилирования 3'-ОН группы адениловой кислоты, необходима актививация α-аминокислота за счёт энергии АТФ. Т-РНК, соединённая с активированной α-аминокислотой называется *аминоацил-т-РНК*.



или

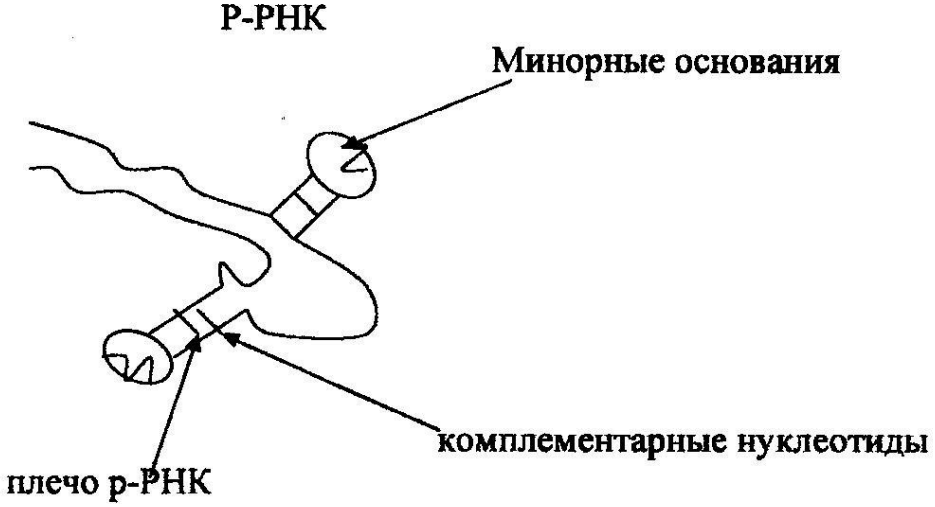




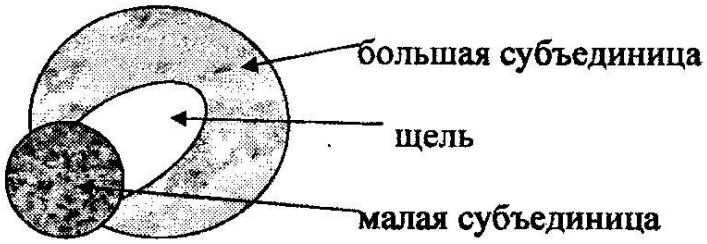
Для структуры т-РНК характерно наличие четырёх зон со спаренными основаниями, и трех петель с неспаренными (минорными) основаниями. Минорные нуклеотиды содержатся в основном в петлях. Они не вступают в комплементарное связывание с другими основаниями и поэтому препятствуют образованию двойной спирали.

Биологическая роль т-РНК – транспорт α-аминокислоту в рибосому, где за счёт системы водородных связей находится кодон в М-РНК, соответствующий собственному антикодону. Число Т-РНК превышает число α- аминокислот, участвующих в построение белков. Это связанно с тем, что некоторые α- аминокислоты переносятся не одной, а несколькими Т-РНК.

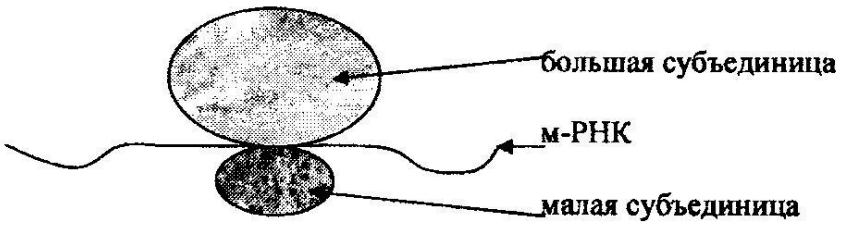
Р-РНК – высокомолекулярная РНК. Синтезируются в ядрышке ядра. В ядрышке происходит упаковка Р-РНК с рибосомальными белками. Р-РНК находится в рибосоме. Молекула Р-РНК представлена одноцепочечным полинуклеотидом, в котором имеются участки аналогичные плечам Т-РНК, образованными комплементарными основаниями, участвующими в формировании вторичной структуры.



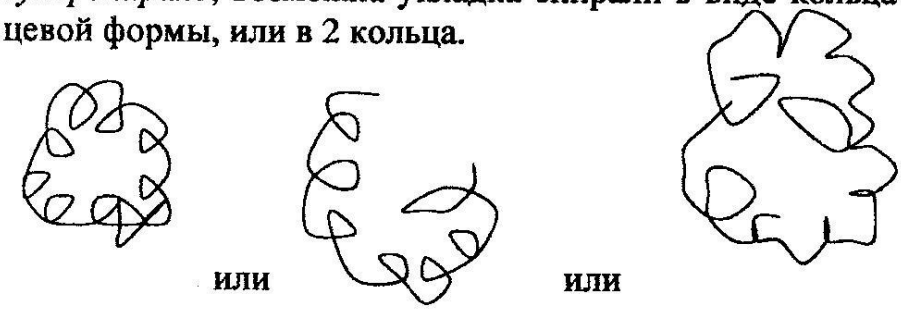
Рибосома – это нуклеопротеидная структура, предназначенная для синтеза белка по м-РНК-матрице. Зрелая рибосома состоит их 2-х субъединиц: большой и малой, соединенными между собой ионами Mg^{2+}. Большая субъединица содержит несколько Р-РНК и 50 полипептидов. Малая субъединица содержит одну Р-РНК и 30 полипептидов. Между большой и малой субъединицами рибосомы остается узкая щель, занимая молекулой М-РНК.



Биологическая роль – рибосома обеспечивает специфический контакт м-РНК и т-РНК, в результате которого и происходит трансляция. Т.е. на р-РНК идет синтез белка. Синтез белка начинается с того момента, когда образуется комплекс, состоящий из большой субъединицы, малой субъединицы, м-РНК, аминоацил-т-РНК, и ионов Mg^{2+}, которые соединяют большую и малые субъединицы. При снижении концентрации ионов Mg^{2+} рибосома распадается на 2 субъединицы: большую и малую.

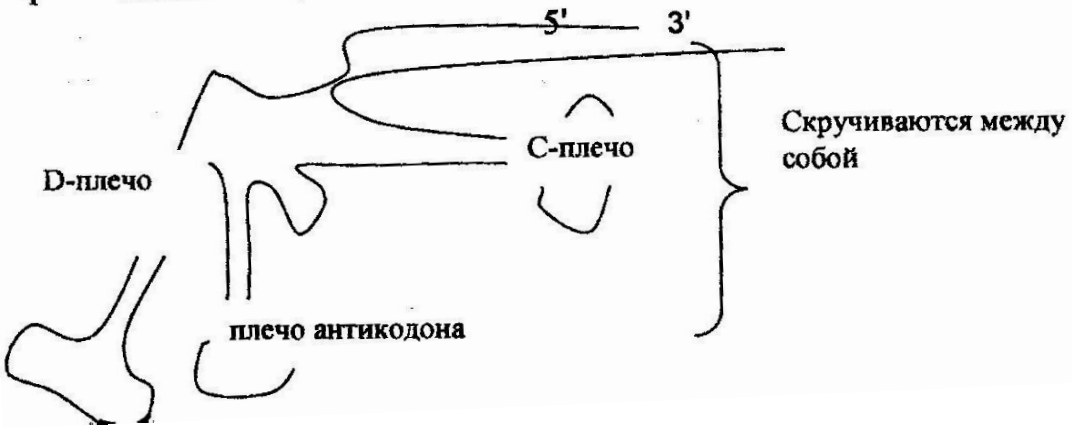


Третичная структура НК – способ укладки двойной полинуклеотидной спирали в единице объёма. Для ДНК это – скручивание двойной спирали в *суперспираль*, возможна укладка спирали в виде кольца или открытой кольцевой формы, или в 2 кольца.



Образование кольцевой формы молекулы ДНК вызвано ковалентным соединением их открытых концов. Биологическое значение: Суперскрученная структура (т.е. III структура) обеспечивает экономную упаковку огромной

молекулы ДНК в хромосоме. Так вместо 8 см длины, которую ДНК могла бы иметь в вытянутой форме, она настолько упакована, что её длина укладывается в 5 нм. Для РНК это – укладка полинуклеотидной цепи в форме буквы Г. Характерна для т-РНК. Акцепторный и т-стебли уложены так, что образуют одну непрерывную спираль – «перекладину» буквы Г. Антикодоновый и Д-стебли образуют ножку. Эти две части содержат каждая около 10 пар оснований. Третичная структура стабилизируется ваандервальсовыми и гидрофобными связями.



Модуль 3.

Матричные биосинтезы.

Последовательность аминокислот в пептидных цепях зашифрована в молекуле ДНК с помощью генетического кода.

Генетический код – это система записи информации с ДНК на и-РНК о белке.

Свойства генетического кода:

1. Триплетность - каждой аминокислоте соответствуют 3 нуклеотида.
2. Неперекрываемость - триплеты независимы друг от друга.
3. Вырожденность или избыточность - большинство аминокислот кодируется несколькими триплетами.
4. Специфичность - триплет кодирует определенную аминокислоту.
5. Универсальность - свойства генетического кода характерны для всех живых организмов.
6. Коллинеарность - соответствие линейной последовательности кодонов и-РНК и аминокислот в белке

БИОСИНТЕЗ ДНК(РЕПЛИКАЦИЯ).

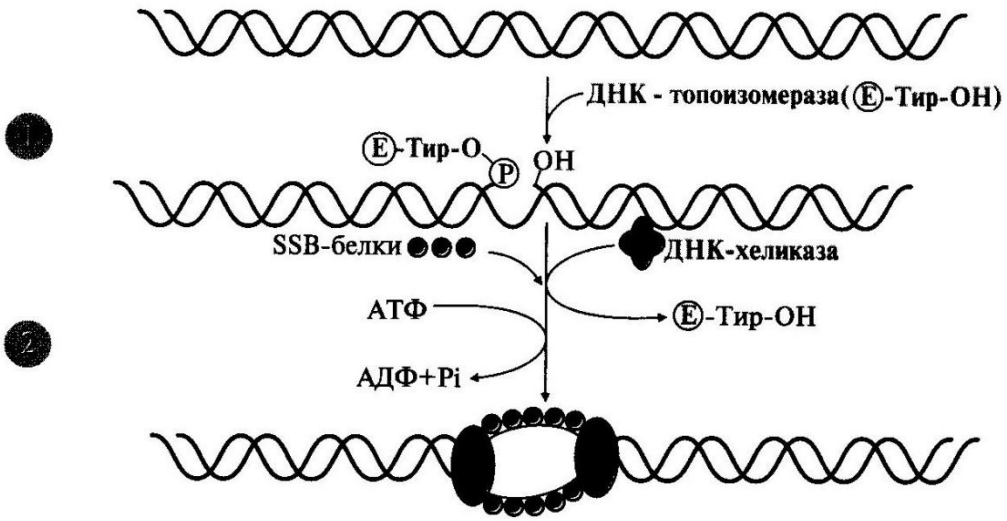
Репликация — матричный процесс. Во время репликации каждая из двух цепей ДНК служит матрицей для образования новой цепи. Субстратами и источниками энергии для синтеза ДНК являются дезоксирибонуклеозид-трифосфаты (дНТФ: дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ).

Процесс включает следующие основные этапы.

I. Формирование репликативной вилки.
II. Синтез новых цепей ДНК.
III. Исключение праймеров. Завершение формирования отстающей цепи ДНК.

I. Формирование репликативной вилки идет при участии:

ДНК-топоизомеразы, которая является «обратимой нуклеазой». Сначала фермент разрывает 3′-,5′-фосфодиэфирную связь в одной из цепей ДНК



Участие ДНК-топоизомеразы в образовании репликативной вилки.

1 — фермент расщепляет 3′,5′-фосфодиэфирную связь в одной из цепей ДНК и присоединяется к 5′-концу в точке разрыва; 2 — в область разрыва цепи присоединяются две молекулы ДНК-хеликаз и обеспечивают локальное разделение двойной спирали ДНК. ДНК-топоизомераза восстанавливает расщепленную 3′,5′-фосфодиэфирную связь и отделяется, а к одноцепочечным участкам присоединяются SSB белки

и присоединяется к 5′-концу в точке разрыва, вызывая сброс суперспиралей ДНК-хроматина. Это облегчает присоединение в область разрыва цепи двух молекул ДНК-хеликаз и образование репликативной вилки. По окончании формирования репликативной вилки ДНК-топоизомераза восстанавливает целостность молекулы ДНК и отделяется;

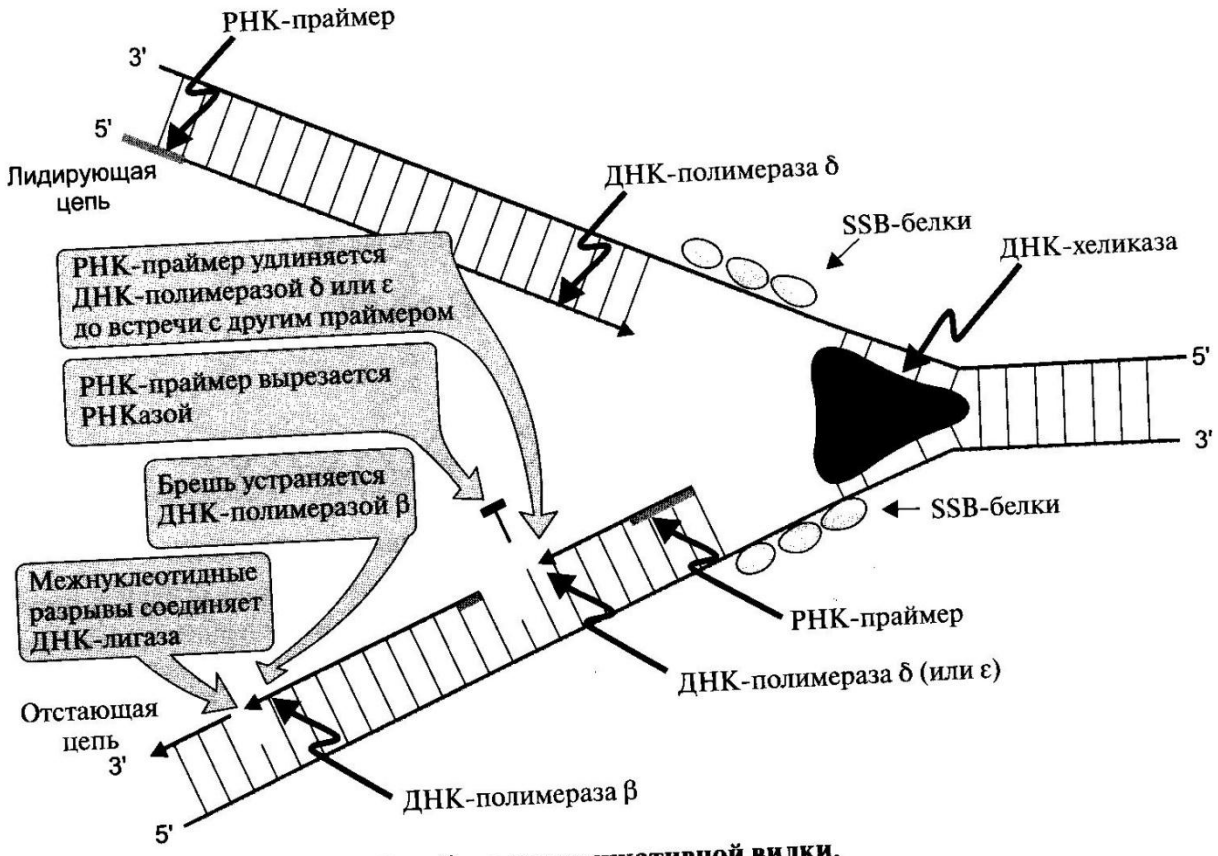
ДНК-хеликаз — ДНК-зависимых АТФаз, использующих энергию АТФ для расплетения двойной спирали ДНК;

SSB (single strand binding)-**белков**, связывающихся с одноцепочечными участками ДНК. Эти белки, не закрывая оснований, предотвращают повторное комплементарное скручивание матричных цепей и образование шпилек.

II. Синтез новых цепей ДНК

На этой стадии дочерние нити ДНК образуются на обеих нитях материнской ДНК. Процесс катализирует несколько **ДНК-полимераз**, которые **синтезируют** полинуклеотидные **цепи из дНТФ**: дАТФ, дГТФ, дТТФ и дЦТФ **в направлении от 5′- к 3′-концу** антипараллельно матрице, имеющей направление от 3′- к 5′-концу

Новые цепи синтезируются по-разному. На матрице ДНК с направлением от 3′- к 5′-концу цепь растет непрерывно по ходу движения репликативной вилки и называется **лидирующей**. На матрице с направлением от 3′- к 5′-концу вторая цепь синтезируется против движения репликативной вилки в виде коротких отрезков — **фрагментов Оказаки**. Рост этой цепи начинается только тогда, когда на матрице ДНК появляется одноцепочечный участок длиной около 200 нуклеотидов, поэтому ее называют **запаздывающей** или **отстающей**.



Рост новых цепей в области репликативной вилки.

Лидирующая нить растет непрерывно, а отстающая — в виде фрагментов Оказаки, каждый из которых включает:

— РНК-праймер (~10 нуклеотидов);

— участок ДНК, примерно равный длине цепи из 150 нуклеотидов

ДНК-полимеразы δ, β и ε не способны инициировать синтез новых цепей ДНК, они могут лишь удлинять имеющуюся нуклеотидную цепь. Синтез лидирующей и отстающей нитей начинается с образования затравки или **праймера**-олигорибонуклеотида (РНК), включающего около 10 мононуклеотидов. Его образование катализирует **праймаза — субъединица ДНК-полимеразы α.** Далее этот же фермент, используя в качестве субстратов дНТФ, переключается на образование ДНК и включает во вновь синтезируемую нить 20—50 дезоксирибонуклеотидов, после чего заменяется другими ДНК-полимеразами. Синтез лидирующей цепи продолжает **ДНК-полимераза δ,** а отстающей — **ДНК-полимераза δ** или **ε**. Оба фермента, помимо, полимеразной обладают еще и экзонуклеазной активностью. В ходе синтеза они могут исправлять допущенную ошибку и отщеплять неправильно включенный нуклеотид, что обеспечивает высокую точность синтеза ДНК.

III. Исключение праймеров. Завершение формирования отстающей цепи ДНК

В отстающей нити праймер удаляется **эндонуклеазой** или **РНКазой**. Затем **ДНК-полимераза β** заполняет образованную «брешь», присоединяя по принципу комплементарности матрице дезоксирибонуклеотиды в количестве,

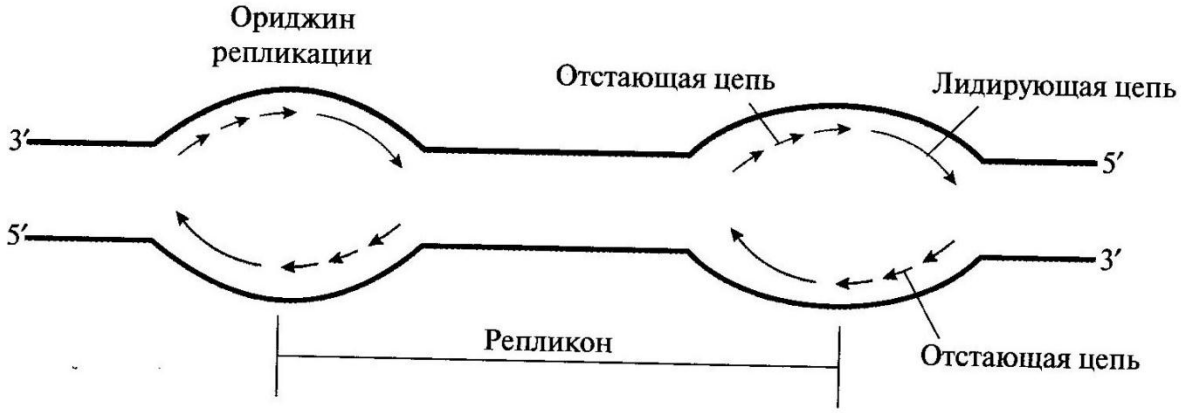
равном вырезанному праймеру. Связывание 3′—ОН-группы одного фрагмента с 5′-фосфатом предыдущего фрагмента и образование фосфодиэфирной связи катализирует **ДНК-лигаза**. Фермент, используя энергию АТФ, из множества фрагментов Оказаки образует непрерывную цепь ДНК.

Результатом процесса является образование дочерних цепей, комплементарных и антипараллельных нитям материнской ДНК. Без учета НТФ, участвующих в синтезе праймеров и объединении фрагментов Оказаки, суммарное уравнение синтеза ДНК может быть записано следующим образом:

$$m\,(\text{дАТФ} + \text{дТТФ}) + n\,(\text{дГТФ} + \text{дЦТФ}) \xrightarrow[\text{репликативный комплекс}]{\text{ДНК-матрица, } Mg^{2+}} \text{ДНК} + 2\,(m + n)\,H_4P_2O_7.$$

В активном центре всех ДНК- и РНК-полимераз находится ион Zn^{2+} (кофактор фермента). Для взаимодействия полимераз с субстратами необходимо также присутствие ионов Mg^{2+}, которые образуют с нуклеотидами комплексы и повышают их реакционную способность.

Молекула ДНК человека имеет очень большие размеры, поэтому инициация синтеза ДНК происходит в нескольких точках хромосомы, которые называются точками инициации репликации, или **ориджинами («origin») репликации** (рис. 3.7). Ориджины репликации имеют специфическую нуклеотидную последовательность.



Образование репликативных вилок, перемещающихся в противоположных направлениях от ориджина.

Синтез начинается в области ориджина и идет в противоположных направлениях. В каждом ориджине образуется две репликативные вилки. Процесс полуконсервативный, и каждая дочерняя молекула ДНК получает одну родительскую и одну вновь синтезированную нить

Единица репликации у эукариотов называется **репликоном** — это участок ДНК между соседними ориджинами. На ориджинах инициируется двунаправленная репликация, т.е. образуются две репликативные вилки, перемещающиеся в противоположных направлениях, до тех пор пока не встретятся со следующим репликоном.

По завершении репликации образуется тетраплоидный набор молекул двухспиральной ДНК, каждая из которых содержит одну «материнскую» нить и одну «дочернюю» — вновь синтезированную (**полуконсервативный механизм** образования новых молекул ДНК). В результате митоза дочерняя клетка получает диплоидный набор хромосом, идентичный материнской клетке. Таким образом, репликация обеспечивает воспроизведение генотипа в новых поколениях.

Репликация происходит в S-фазу клеточного цикла. В регуляции клеточного цикла участвуют белки **циклины**. Различают циклины A, B, D, E. Циклины являются активаторами **циклин-зависимых протеинкиназ**, которые в активной форме могут фосфорилировать специфические белки, участвующие в подготовке и продвижении клетки по клеточному циклу. В каждом цикле концентрация циклинов постепенно возрастает от нуля, а затем резко падает опять до нуля.

Циклины, регулирующие прохождение клеточного цикла

Циклин	Функция
D	Регулируют переход клетки из G1-фазы в фазу S
E, A	Активируют синтез ДНК на начальной стадии S-фазы
B	Регулируют переход клетки из G2-фазы в M-фазу

РЕПАРАЦИЯ ОШИБОК И ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

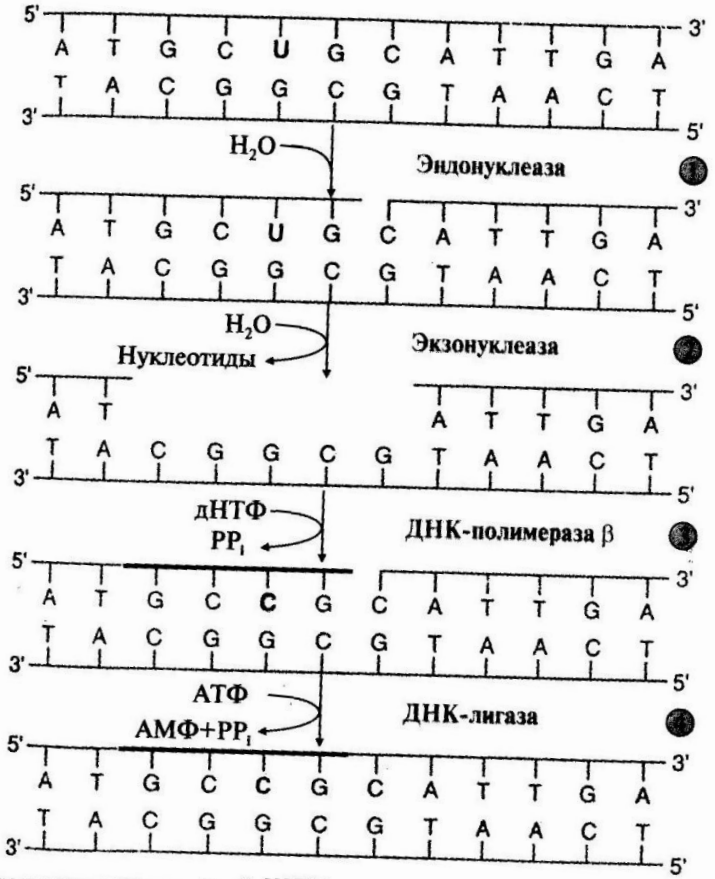
Молекула ДНК постоянно подвергается разнообразным изменениям, вызванным действием различных веществ внешней и внутренней среды, радиацией и ультрафиолетовым облучением. Под влиянием этих факторов в структуре ДНК происходит:

- **дезаминирование оснований**, при котором цитозин превращается в урацил, аденин — в гипоксантин, а гуанин — в ксантин. Чаще всего дезаминируется цитозин;
- **депуринизация**, или **депиримидинизация**, результатом которой является появление в ДНК остатков дезоксирибозы, лишенных основания;
- образование под действием ультрафиолета (УФО) **пиримидиновых димеров** между рядом расположенными в цепи основаниями;
- **разрыв нуклеотидных цепей**;
- появление **ковалентных сшивок** между цепями или цепями и гистонами;
- возникновение **ошибок репликации**;
- образование **продуктов алкилирования ДНК** (6-метилгуанина, 7-метилгуанина, 3-метиладенина) под воздействием некоторых химических веществ.

Поврежденные основания ДНК обнаруживаются и удаляются **ДНК-N-гликозилазами**. Ферменты гидролитически расщепляют N-гликозидную связь между поврежденным основанием и остатком дезоксирибозы. Участки на молекуле ДНК, лишенные азотистого основания, получили название **АП-сайтов** (от англ. «apurinic» — apyrimidinic site). АП-сайты могут также

возникать в результате самопроизвольного гидролитического отщепления пуриновых или пиримидиновых оснований. Дальнейший ход репарации идет по одному из двух путей:

- либо фермент **ДНК-инсертаза** может присоединять к дезоксирибозе основание в соответствии с правилом комплементарности;
- либо **эндонуклеаза** определяет место повреждения (если это дезоксирибоза, лишенная основания, то фермент называют АП-эндонуклеазой) и гидролизует 3′, 5′-фосфодиэфирную связь (рис. 3.8).



Репарация эукариотической ДНК

Экзонуклеаза находит место разрыва цепи и удаляет поврежденный участок. **ДНК-полимераза β** присоединяется к 3′-концу образовавшейся «бреши» и достраивает недостающий участок цепи (ликвидирует «брешь»). Матрицей служит неповрежденная цепь ДНК.
ДНК-лигаза соединяет неповрежденный и вновь синтезированный участки цепи ДНК.

Репарация возможна благодаря существованию двух цепей в молекуле ДНК — двух копий генетической информации. Если одновременно повреждается комплементарная пара нуклеотидов, репарация в гаплоидных клетках невозможна, а в диплоидных может идти за счет присутствия идентичного гена в гомологичной хромосоме.

Репарация необходима для сохранения генетического материала на протяжении всей **жизни организма** (сохранение структуры генома). Все ферменты постоянно активны и процесс идет непрерывно. Снижение активности ферментов репарации приводит к накоплению повреждений (мутаций) в ДНК.

БИОСИНТЕЗ РНК (ТРАНСКРИПЦИЯ). ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ РНК

Транскрипцией называется **синтез РНК** на **ДНК-матрице.** В результате образуются первичные траскрипты мРНК, тРНК, рРНК, комплементарные матричной цепи ДНК, имеющей направление от 3′-, к 5′-концу. Субстратами и источниками энергии для синтеза РНК являются рибонуклеозидтрифосфаты (НТФ: АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ).

Катализируют синтез РНК ферменты **РНК-полимеразы**. В ядре клеток эукариотов обнаружены три фермента:

- РНК-**полимераза I**, синтезирующая пре-рРНК;
- РНК-**полимераза II**, ответственная за синтез пре-мРНК;
- РНК-**полимераза III**, синтезирующая пре-тРНК.

В основе процесса лежит принцип комплементарности оснований в полинуклеотидной цепи матричной ДНК и синтезируемой РНК, когда против А встает U, против G — C, а против T — A.

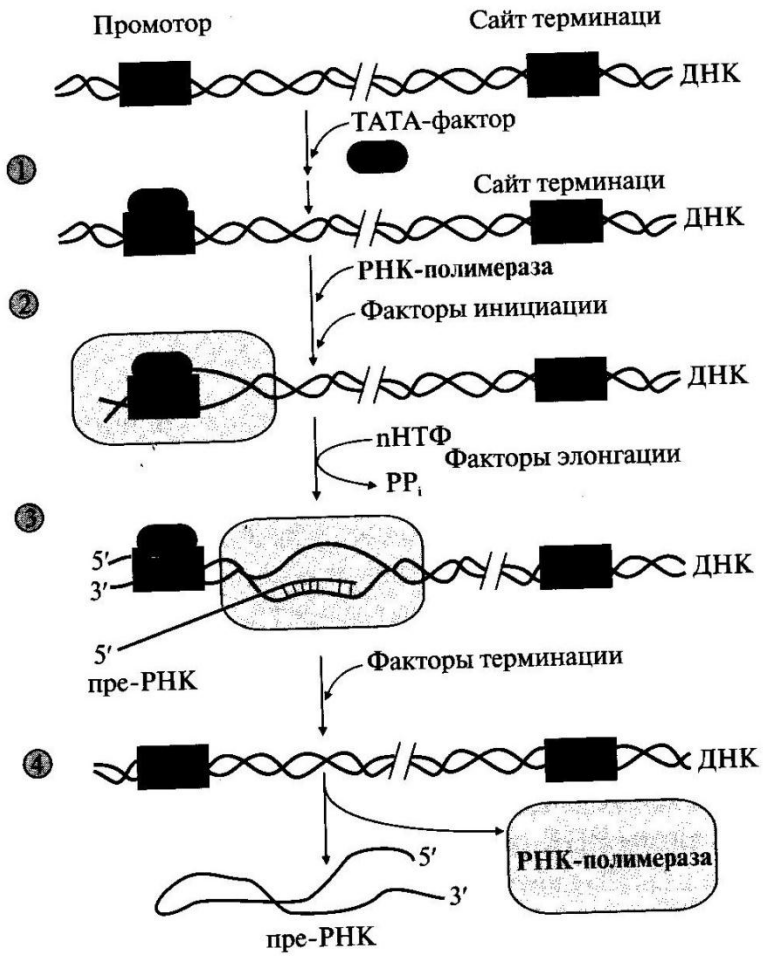
Суммарное уравнение синтеза РНК можно представить следующим образом:

$$\text{аГТФ} + \text{bАТФ} + \text{cУТФ} + \text{mЦТФ} \xrightarrow[Mg^{2+},\ \textbf{РНК полимераза}]{\text{матричная нить ДНК}} \text{РНК} + (a + b + c + m)\ H_4P_2O_7.$$

Специфическая последовательность ДНК (сайт), в которой РНК-полимераза связывается с матрицей и начинает синтез РНК, называется **промотором**, а последовательность, на которой завершается синтез РНК, — **сайтом терминации.** Участок ДНК, ограниченный промотором и сайтом терминации, представляет собой единицу транскрипции — **транскриптон**. У эукариотов в состав транскриптона, как правило, входит только один ген.

Существование на молекуле ДНК множества транскриптонов позволяет с разной активностью проводить индивидуальное считывание (транскрипцию) разных генов. РНК-полимеразы — большие, олигомерные ферменты, состоящие из нескольких субъединиц и имеющие несколько центров связывания регуляторных факторов. В процессе транскрипции различают стадии **инициации, элонгации и терминации**

«Активация» промотора происходит с помощью белка, который получил название **ТАТА-фактора**, потому что он взаимодействует со специфической последовательностью нуклеотидов промотора -ТАТА-. **ТАТА-фактор облегчает взаимодействие промотора с РНК-полимеразой**. Связывание РНК-полимеразы с промотором увеличивает сродство фермента к **факторам инициации** (A, B), которые обеспечивают раскручивание примерно одного витка двойной спирали ДНК.



Стадии транскрипции:

1 — присоединение в область промотора белка, который называется «ТАТА-фактор»; 2 — включение РНК-полимеразы в промоторный участок, при этом в зоне присоединения РНК-полимеразы происходит локальное расплетение двойной спирали ДНК; 3 — рост нити пре-РНК; 4 — освобождение в сайте терминации пре-РНК и РНК-полимеразы из комплекса с ДНК ускоряют факторы терминации

Факторы элонгации (E, H, F) повышают активность РНК-полимеразы и облегчают локальное расхождение нуклеотидных цепей. **Синтез молекулы РНК идет от 5′- к 3′-концу на матричной цепи ДНК по принципу комплементарности и антипараллельности.** По мере продвижения РНК-полимеразы по цепи ДНК в направлении от 3′- к 5′-концу впереди нее происходит расхождение, а позади — восстановление двойной спирали.

Расхождение двойной спирали ДНК в области сайта терминации делает его доступным для **факторов терминации**. Когда РНК-полимераза достигает сайта терминации, транскрипция прекращается. Факторы терминации облегчают отделение первичного транскрипта от матрицы.

Посттранскрипционные модификации. Прежде чем выйти из ядра, каждый первичный транскрипт после ряда ковалентных модификаций превращается в «зрелую» молекулу РНК.

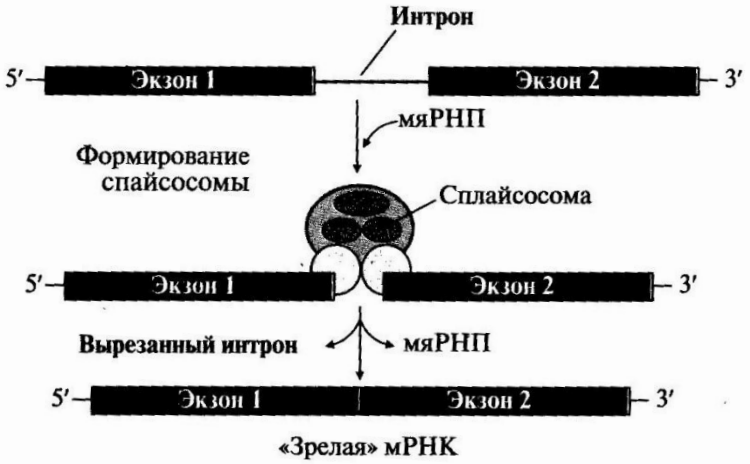
- **Модификации пре-мРНК** начинаются на стадии элонгации. Когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 нуклеотидов, происходит **«кэпирование» 5′-конца**. Остаток ГТФ присоединяется своим 5′-концом к 5′-концу фрагмента пре-мРНК с образованием 5′-, 5′-фосфодиэфирной связи. Последующее метилирование гуанина в составе ГТФ завершает образование «кэпа»:

7-метил-G(5')ppp(5')X.....,

где 7-метилгуанозинтрифосфат присоединен к 5′-концу первого нуклеотида (X) в составе пре-мРНК.

По завершении транскрипции на 3′-конце первичного транскрипта мРНК специальным ферментом **поли-А-полимеразой** синтезируется поли-А-последовательность, которая состоит из 100—200 остатков адениловой кислоты. Наличие **поли-А-последовательности на 3′-конце** облегчает выход мРНК из ядра и замедляет ее гидролиз в цитоплазме. Молекулы тРНК и рРНК не содержат «кэпа» и поли-А-последовательности.

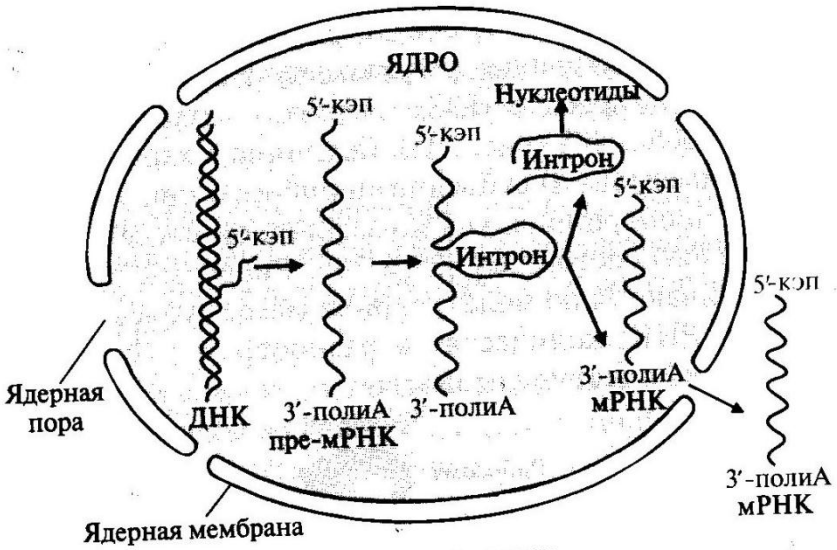
Первичный транскрипт или пре-мРНК комплементарен гену, содержит как **экзоны** — последовательности, кодирующие определенные участки молекулы белка, так и **интроны** — некодирующие последовательности. В процессе образования молекул «зрелой» мРНК интроны вырезаются из первичного транскрипта, концы экзонов соединяются друг с другом — эту реакцию называют **сплайсингом РНК**



Сплайсинг пре-мРНК

Процесс вырезания интронов протекает при участии малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП), которые образуют комплексы — **сплайсосомы**. мяРНП состоят из малой ядерной РНК (мяРНК), связанной с белковым остовом, в который входит несколько протомеров. Отдельные мяРНП по принципу комплементарности узнают специфические последовательности интронов в первичном транскрипте, они катализируют реакцию расщепления 3′, 5′-фосфодиэфирной связи на границе экзона с интроном и последующее соединение двух экзонов. После завершения сплайсинга «зрелая»

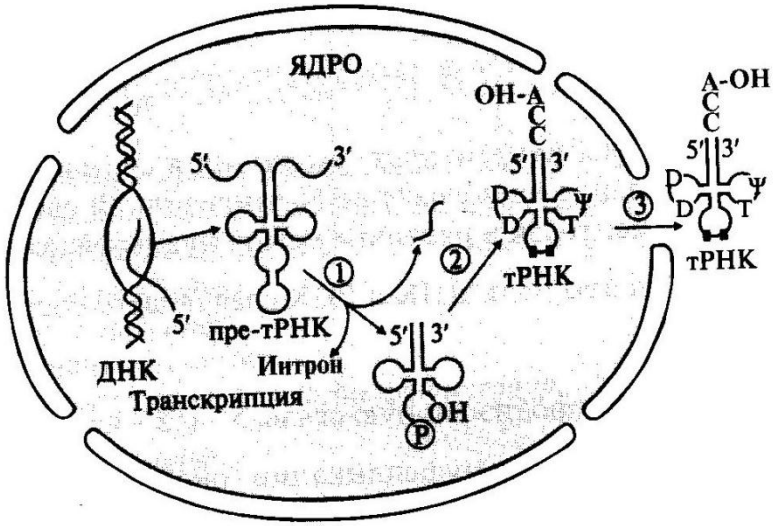
мРНК становится примерно в четыре раза короче первичного транскрипта. Сплайсинг происходит в ядре, в цитоплазму переносится уже «зрелая» мРНК



Образование и выход из ядра зрелой мРНК

Модификации пре-тРНК. В процессе посттранскрипционных модификаций первичных транскриптов тРНК:

- молекулы укорачиваются с 5′- и 3′-концов и удаляется интрон;
- 10—15% азотистых оснований в молекулах модифицируется;
- на 3′-конце формируется **акцепторный участок (-ССА)** для присоединения аминокислот, а в средней части **антикодон** — триплет нуклеотидов, обеспечивающий взаимодействие тРНК с кодоном мРНК

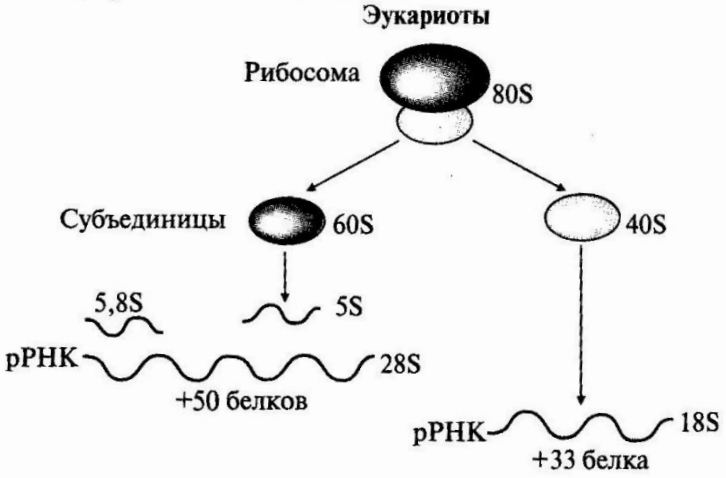


Цитоплазма

Посттранскрипционные модификации пре-тРНК:

1 — удаляются участки полинуклеотидной цепи на 5′- и 3′-концах молекулы пре-тРНК и интрон в центральной области молекулы; 2 — модифицируются азотистые основания (■), к 3′-концу присоединяется триплет-ССА; 3 — в цитоплазму выходят зрелые тРНК

- **Посттранскрипционные модификации пре-рРНК** сопровождаются образованием из высокомолекулярного предшественника 28S, 18S и 5,8S «зрелых» рРНК, входящих в рибосому — органеллу клетки, участвующую в биосинтезе белка. В состав рибосом входят рРНК и белки, выполняющие структурную, регуляторную и каталитическую функции. Рибосома эукариотов (80S) состоит из двух (большой и малой) субъединиц — 60S и 40S Величина S характеризует скорость оседания (седиментации) субъединиц рибосом при ультрацентрифугировании. Она пропорциональна молекулярной массе частиц. Рибосома прокариотов (70S) состоит из 50S и 30S. Рибосомы эукариотов и прокариотов различаются по молекулярной массе субъединиц, количеству рРНК, массе рРНК, количеству и разнообразию белков, способных связывать специфические лиганды.



Строение эукариотических рибосом

ТЕМА 3.5. ТРАНСЛЯЦИЯ КАК МЕХАНИЗМ ПЕРЕВОДА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ В ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ

Синтез белка отличается от других матричных биосинтезов тем, что между матрицей (мРНК) и продуктом-белком нет комплементарного соответствия. Поскольку матрица построена из 4 нуклеотидов, а продукт — полипептидная цепь из 20 аминокислот, то существует определенный закон шифрования аминокислот в нуклеотидной последовательности матрицы, т.е. биологический код.

Биологический код — это способ записи информации об аминокислотной последовательности белков с помощью последовательности нуклеотидов в ДНК или РНК. Его характеризуют следующие свойства: **триплетность и наличие терминирующих кодонов, специфичность, вырожденность, универсальность, однонаправленность, колинеарность**

Свойства биологического кода

Триплетность и наличие терминирующих кодонов	Кодовое число равно 3. Три нуклеотидных остатка (триплет) кодируют одну аминокислоту. Терминирующие триплеты — UAA, UAG, UGA не кодируют аминокислот, а являются сигналами к прекращению синтеза белка
Специфичность	Каждый триплет кодирует только одну аминокислоту
Вырожденность	Одну аминокислоту могут кодировать несколько триплетов (от 2 до 6)
Универсальность	Почти у всех видов организмов биологический код одинаков
Однонаправленность	Информация, записанная в зрелой мРНК в виде линейной последовательности кодонов (триплетов), считывается в направлении от 5'- к 3'-концу
Колинеарность	Последовательность кодонов в зрелой мРНК соответствует последовательности аминокислот в синтезированном белке

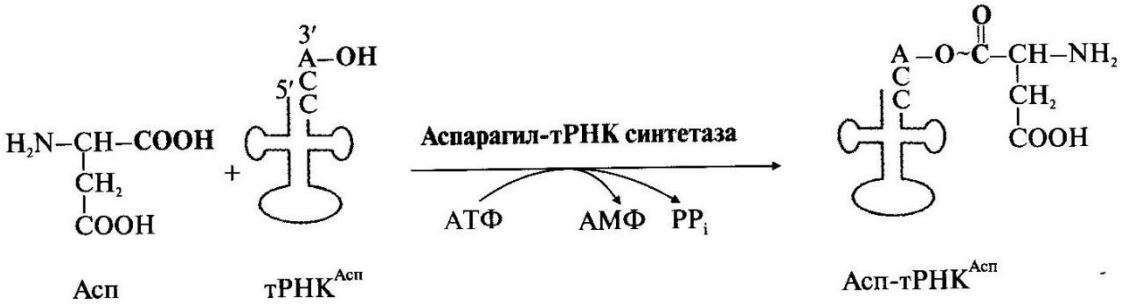
Основными компонентами синтеза белка являются: аминокислоты, тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы, мРНК, рибосомы, источники энергии, белки — факторы инициации, элонгации и терминации и кофакторы

Основные компоненты белок-синтезирующей системы и их функции в процессе трансляции

Необходимые компоненты	Функции
1. Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
2. тРНК	Выполняют функцию адапторов — приспособителей аминокислот к кодонам мРНК. Акцепторным концом (—CCA) они взаимодействуют с аминокислотами, а антикодоном — с кодоном мРНК
3. Аминоацил-тРНК-синтетазы	Каждый фермент катализирует реакцию специфического связывания 1 из 20 аминокислот с соответствующей тРНК
4. мРНК	Матрица содержит линейную последовательность кодонов, определяющих первичную структуру белков
5. Рибосомы	Рибонуклеопротеиновые субклеточные структуры, являющиеся местом синтеза белков
6. АТФ, ГТФ	Источники энергии
7. Белковые факторы инициации (IF), элонгации (EF), терминации (RF)	Специфические внерибосомные белки, необходимые для процесса трансляции
8. Ионы магния	Кофактор, стабилизирующий структуру рибосом

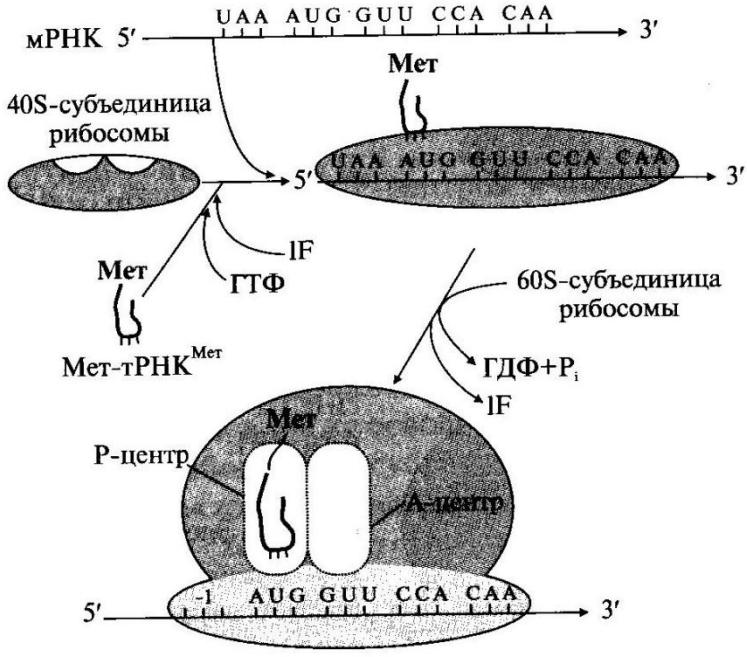
Аминоацил-тРНК-синтетазы катализируют синтез аминоацил-тРНК — соединений, которые обеспечивают включение аминокислот в полипептидную цепь. Они обладают абсолютной специфичностью к аминокислоте и относительной к тРНК, так как в связи с вырожденностью кода разных типов тРНК больше, чем аминокислот. Существуют изоакцепторные тРНК, отличающиеся по строению антикодона, но связывающиеся с одной и той же

аминокислотой. Указанием на способность тРНК присоединять определенную аминокислоту служит индекс в верхнем правом углу: тРНК, связывающаяся с глутаматом, обозначается как $тРНК^{Глу}$, а с аланином — $тРНК^{Ала}$. Название каждой из 20 аминоацил-тРНК-синтетаз отражает название аминокислоты, которая активируется в ходе этой реакции. Так, реакцию активации аспартата катализирует аспарагил-тРНК-синтетаза, которая присоединяет α-СООН-группу аминокислоты к 3′—ОН концу тРНК за счет энергии АТФ



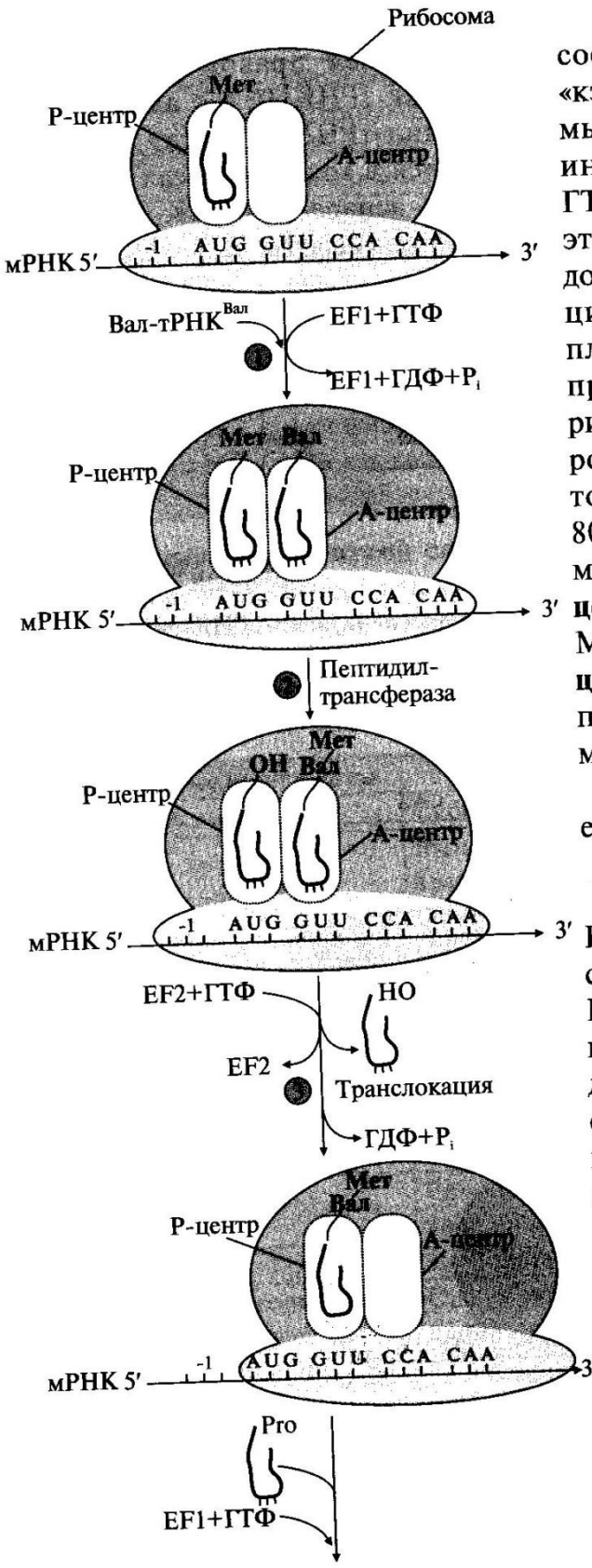
Реакция активации аспартата, катализируемая аспарагил-тРНК-синтетазой

События на рибосоме включают этапы: инициации, элонгации и терминации



Инициация белкового синтеза.

Комплекс, состоящий из 40S-субъединицы рибосомы, $Мет-тРНК^{Мет}$, факторов инициации и молекулы ГТФ, присоединяется к мРНК и перемещается по ней до встречи с инициирующим кодоном AUG. Антикодон $Мет-тРНК^{Мет}$ связывается с кодоном AUG, это сопровождается присоединением к комплексу 60S-субъединицы рибосомы, гидролизом ГТФ и удалением факторов инициации. На рибосоме формируются А- и Р-центры. $Мет-тРНК^{Мет}$ оказывается в Р-центре рибосомы. В процессе инициации участвует более 10 факторов инициации



Инициация начинается с присоединения к мРНК в области «кэпа» малой субъединицы рибосомы 40S, факторов инициации (IF), инициирующей Мет-тРНК^{Мет} и ГТФ. Когда в результате движения этого комплекса по мРНК антикодон Мет-тРНК^{Мет} свяжется с инициирующим кодоном AUG, комплекс останавливается. Происходит присоединение 60S-субъединицы рибосомы, сопровождающееся гидролизом ГТФ и отделением факторов инициации. Формируется 80S-рибосома с двумя активными центрами: **Р** (пептидильным) **центром**, в котором находится Мет-тРНК^{Мет}, и **А** (аминоацильным) **центром**, в область которого поступает первый смысловой кодон мРНК.

Этап **элонгации** включает три последовательные стадии

Связывание аа-тРНК^{аа} в А-центре. В свободный А-центр присоединяется первая аа$_1$-тРНК$^{аа}{}_1$ (на рисунке это Вал-тРНК^{Вал}), у которой антикодон комплементарен кодону мРНК, находящемуся в области этого центра. Эта фаза процесса требует затраты энергии ГТФ и участия фактора элонгации EF1.

Элонгация полипептидной цепи:

1 — связывание аа-тРНК^{аа} в А-центре требует затраты энергии ГТФ и участия фактора элонгации EF1 (на схеме аа-тРНК^{аа} — Вал-тРНК^{Вал}); 2 — образование пептидной связи катализирует пептидилтрансфераза, активный центр которой формируется рРНК, входящей в состав большой субъединицы рибосомы; 3 — перемещение рибосомы по мРНК на один кодон в направлении от 5′- к 3′-концу идет с использованием энергии ГТФ (транслокация) и при участии фактора EF2

Образование пептидной связи. На этой стадии происходит пептидилтрансферазная реакция, в ходе которой метионин от Мет-тРНК^{Мет}, входящей в Р-центр, переносится на α-аминогруппу аминокислоты (валина), находящейся в А-центре в составе аа-тРНК^{аа}, с образованием дипептидил-тРНК. В **пептидилтрансферазной реакции** ферментативную активность проявляет рРНК большой субъединицы рибосомы.

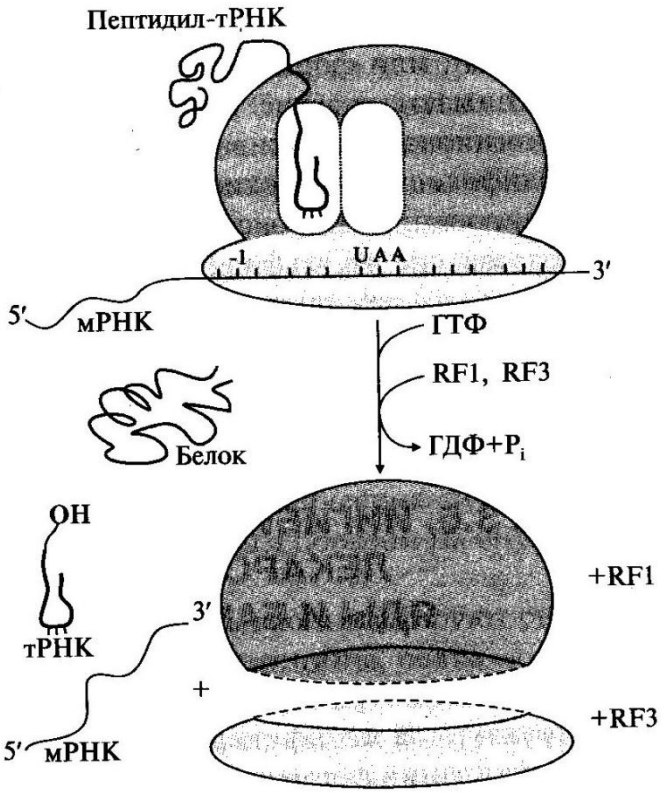


Рис. 3.18. Терминация синтеза белка.

При попадании в А-центр стоп-кодона вновь синтезированный пептид высвобождается из связи с тРНК и рибосомой с участием факторов терминации и энергии ГТФ

Транслокация — перемещение рибосомы по мРНК. В ходе этой стадии рибосома сдвигается на один кодон в направлении от 5′- к 3′-концу мРНК за счет энергии ГТФ и при участии фактора элонгации EF2. В результате дипептидил-тРНК (Мет-Вал-тРНК) из А-центра попадает в Р-центр, а в А-центре оказывается следующий кодон. Свободная тРНК^{Мет} теряет связь с Р-центром и покидает рибосому. Далее процесс продолжается по описанной схеме, повторяя стадии: 1→ 2 → 3.

Терминация трансляции происходит после включения в А-центр одного из стоп кодонов: UAG, UGA, UAA Белковые факторы терминации RF1 и RF3, взаимодействуя с этими кодонами, при участии пептидилтрансферазы обеспечивают гидролитическое отщепление синтезированного полипептида от тРНК, а также освобождение тРНК из пептидильного центра и диссоциацию рибосомы на субъединицы с затратой энергии молекулы ГТФ. Название факторов происходит от англ. releasing factor — RF, а цифры указывают на их сходство по строению с RF-факторами 1-го и 3-го прокариотов.

Одновременно несколько рибосом могут участвовать в трансляции одной мРНК. Каждая рибосома занимает участок, равный примерно 80 нуклеотидам мРНК. Таким образом, рибосомы располагаются на мРНК с интервалами около 100 нуклеотидов, образуя комплекс, называемый **полисомой**.

Функционально активные белки образуются в результате **посттрансляционных модификаций полипептидных цепей**, синтезированных на рибосомах. Они включают:

- **частичный протеолиз**;
- **фолдинг**, или формирование пространственной структуры, в котором принимают участие белки-шапероны, обеспечивающие образование функционально активной конформации полипептидной цепи;
- **модификации аминокислот**: карбоксилирование, фосфорилирование, йодирование, гидроксилирование, ацилирование и гликозилирование;
- **образование дисульфидных связей** между остатками цистеина, участвующими в формировании трехмерной структуры белка;
- **присоединение простетических групп**;
- **образование олигомерных структур**, которое также осуществляется при участии шаперонов.

ИНГИБИТОРЫ МАТРИЧНЫХ БИОСИНТЕЗОВ: ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ЯДЫ И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ТОКСИНЫ

Подавление матричных биосинтезов может быть достигнуто путем:
- структурной модификации матрицы и рибосом;
- инактивации ферментов;
- снижения синтеза исходных субстратов (НТФ и дНТФ).

Остановка любого из матричных биосинтезов опасна для клеток и может вызвать их гибель, поэтому многие ингибиторы матричных биосинтезов являются ядами для организма человека.

1. α-Аманитин — токсин, который содержится в бледной поганке *Amanita phalloides* и ингибирует эукариотические РНК-полимеразы, в особенности РНК-полимеразу II, которая отвечает за синтез мРНК.

2. Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* выделяет токсин, который в организме человека подвергается гидролитическому расщеплению. Образуется фрагмент, являющийся специфическим ингибитором трансляции у эукариотов. Он обладает ферментативной активностью и катализирует АДФ-рибозилирование — перенос остатка АДФ-рибозы с NAD^+ на ОН-группу остатка серина в молекуле фактора элонгации EF2. Инактивация фактора ингибирует продвижение рибосомы по мРНК на стадии транслокации. В результате растущая пептидная цепь остается в аминоацильном центре рибосомы, биосинтез белков в инфицированных клетках слизистой зева и гортани прекращается.

3. Некоторые ингибиторы матричных биосинтезов нашли применение в медицине. Так, **антибиотики**, подавляющие процесс транскрипции и трансляции и специфичные в отношении белок-синтезирующей системы прокариотов, могут использоваться как **антибактериальные препараты**, а антибиотики, нарушающие матричную функцию ДНК, нашли применение при лечении злокачественных новообразований и являются **противоопухолевыми препаратами**.

Избирательность противоопухолевых препаратов: доксорубицина, дауномицина — интеркаляторов, циклическая структура которых встраивается между комплементарными основаниями G:::C, и других лекарств, взаимодействующих с ДНК трансформированных клеток, невелика. Она обеспечивается, как правило, более высокой скоростью синтеза ДНК и РНК в этих клетках, а также повышенной проницаемостью клеточных мембран для метаболитов по сравнению с покоящимися, нормальными клетками. Эти соединения ингибируют репликацию и транскрипцию, токсичны для быстроделящихся нормальных клеток организма, таких, как стволовые клетки кроветворной системы, клетки слизистой желудка и кишечника, фолликулов волос. В последние годы проводятся исследования по созданию препаратов, обеспечивающих доставку ингибитора только в опухолевые клетки. Это достигается связыванием цитотоксических антибиотиков с белками, рецепторы к которым имеются главным образом на опухолевых клетках.

Некоторые лекарства и антибиотики селективно ингибируют синтезы: ДНК — семейство фторхинолонов, РНК — рифамицины, белка — эритромицин, тетрациклин только в бактериальных клетках, практически не влияя на матричные синтезы в клетках млекопитающих. Высокая избирательность этой группы соединений объясняется различиями в структуре ферментов и рибосом эукариотических и прокариотических клеток.

4. Течение многих вирусных инфекций сопровождается гибелью зараженных клеток. Многие **вирусы**, например оспы, гриппа, полиомиелита, попадая в эукариотические клетки, прекращают в них синтез нуклеиновых кислот и белков, характерных для данного организма, переключая ферментные системы и энергетические ресурсы на воспроизведение вирусных частиц.

5. Защиту организма от вирусных инфекций обеспечивают **интерфероны**. Семейство этих белков синтезируется в клетках эукариотов в ответ на вирусную инфекцию. Они индуцируют в зараженных клетках образование протеинкиназы, которая фосфорилирует фактор инициации трансляции IF2 и таким образом прекращает работу белок-синтезирующего аппарата. Кроме того, интерфероны повышают активность РНКаз, расщепляющих матричные и рибосомные РНК клетки, что также ведет к прекращению синтеза белка и гибели инфицированных клеток.

Процессинг белков

Некоторые вирусы животных, в особенности полиовирус (РНК-содержащий вирус), синтезируют длинные полицистронные белки, считываемые с одной протяженной цепи мРНК. Такие белковые молекулы расщепляются в определенных участках с образованием нескольких специфических вирусных белков. В клетках животных многие белки синтезируются по РНК-матрице в виде молекул-предшественников, которые затем для образования активных молекул должны быть модифицированы. В качестве примера такого белка можно привести инсулин — низкомолекулярный белок, состоящий из двух полипептидных цепей с внутрицепочечными и межцепочечными дисульфидными мостиками. Молекула инсулина синтезируется в виде одноцепочечного предшественника инсулина. Затем специфическая протеаза удаляет сегмент, соединяющий две цепи, обнаруживаемые в составе зрелого функционально активного инсулина

Многие другие полипептиды синтезируются в виде пробелков, требующих дальнейшей модификации для приобретения биологической активности Посттрансляционная модификация часто включает стадию удаления N-концевых аминокислотных остатков специфическими аминопептидазами. Коллаген — основной белок межклеточного пространства у высших эукариот — синтезируется в виде проколлагена. Три полипептидных молекулы проколлагена (часто неидентичные по первичной структуре) выстраиваются в четвертичную структуру в зависимости от присутствия у них на N-конце определенных пептидов. Специализированные ферменты направляют гидроксилирование и окисление определенных аминокислотных остатков проколлагеновых цепей с целью образования стабилизирующих перекрестных сшивок. Далее происходит отщепление аминоконцевых пептидов и образуется конечный продукт — прочная нерастворимая молекула коллагена

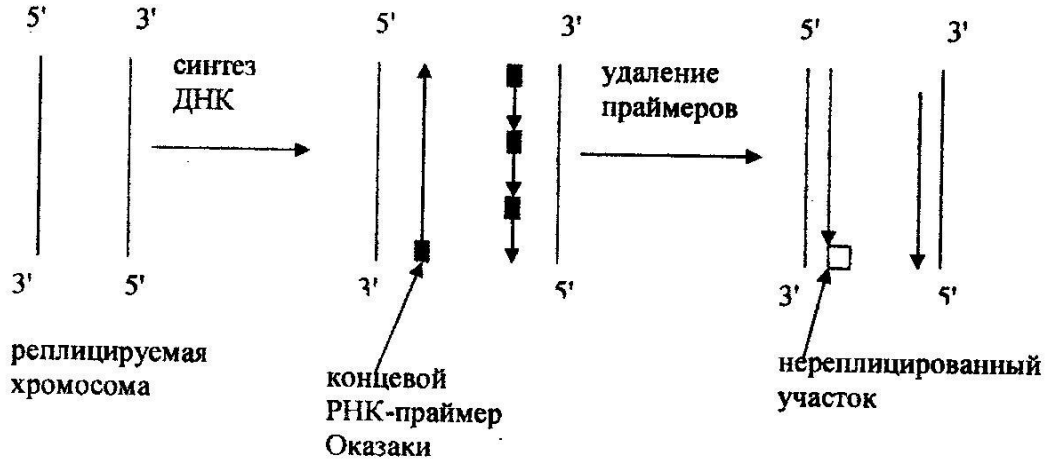
Известны и многие другие посттрансляционные модификации белков. Например, широко распространены ковалентные модификации. такие, как ацетилирование, фосфорилирование и гликозилирование.

Модуль 4.

Теломеры и теломераза.

1. Какой фермент является универсальным онкомаркером, и какие его свойства определяют его значение для онкодиагностики.
2. Значение теломеров для жизнедеятельности клеток.
3. Особенности строения и функции теломеразы.
4. Основная функция теломеров.
5. Строение теломеразного комплекса.
6. Функции белковых компонентов теломеразного комплекса.

Репликация теломер. *Теломеры* – концевые участки хромосом, которые не несут генетической информации. Теломеры служат для защиты материала хромосом от потерь при репликации и от атак эндонуклеаз.



При репликации молекул ДНК возникает проблема репликации концов (т.е. теломеров). После завершения репликации хромосомы и удаления концевого праймера (или РНК-затравки) 5'-концы дочерних цепей ДНК остаются недостроенными, т.е. образуется незаполненная брешь. Это происходит

потому, что ДНК зависимая ДНК-полимераза III не может вести синтез концевого участка цепи от 3' – к 5'-концу. Эта брешь заполняется теломерами, которые синтезируются ферментом теломеразой.

Теломераза в качестве простетической группы использует концевую РНК-затравку, которая служит матрицей при синтезе теломер.

Теломераза присоединяет нуклеотид за нуклеотидом к 3'-концу вновь синтезированной дочерней нити ДНК. Теломеры состоят из многократно повторяющихся фрагментов олигонуклеотидов. Во время деления клетки теломеры теряют от 5 до 20 фрагментов, и с каждым делением становится короче. Последовательное исчезновение концевых участков приводит к потере генов. Укорочение до определенной критической длины становится сигналом к прекращению деления. Обычно клетки имеют 20-90 делений (у новорождённых – 80-90 делений, а клетке 70 летних делятся только 20-30 раз).

Определенной число клеточных делений называют *порогом (лимитом) Хейфлика*. Поэтому уровень активности фермента в соматических клетках обеспечивает быструю или медленную степень старения или степень роста. В раковых клетках и в зародышевых клетках число делений не ограничено за счет высокой активности теломеразы. В большинстве соматических клеток теломераза неактивна, т.к. эти клетки имеют длину теломерной ДНК, достаточную для времени жизни клетки и её потомства. Активность теломеразы в физиологических условиях обнаруживают в клетках с высокой скоростью обновления, таких как лимфоциты, стволовые клетки костного мозга, клетки эпителия, эпидермиса кожи.

Биохимический анализ, обладая высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет не только определить наличие в исследуемом материале клеток опухоли, но и очень часто определить прогноз ее развития.

Решением проблемы является поиск и внедрение в клиническую практику онкомаркеров, которые являлись бы характерными для большинства опухолей, то есть универсальными.Одним из наиболее перспективных универсальных онкомаркеров сегодня является теломераза. Этот уникальный для человеческого организма фермент – обратная транскриптаза – является ключевым в поддержании стабильности генетического аппарата клетки в процессе многократного ее деления.При наступающем укорочении теломер белок освобождается и активирует транскрипцию митотического репрессора.

Теломераза может играть роль звена в регуляции процессов гибели клеток. Присутствие теломеразы в клетке обусловливает репрессию синтеза теломерсвязывающихбелков.Необходимо вспомнить, что теломеры принимают участие в поддержании жизненно важных процессов в клетке: защищают хромосомы от рекомбинации и деградации, распознавания их как поврежденной ДНК; играют одну из главных ролей в фиксации хромосом в ядре; участвуют в регуляции экспрессии различных генов и служат механизмом, контролирующим число делений клетки и ее запрограммированную гибель (апоптоз).

Строение и функции теломеразы

Старение и гибель клеток в процессе их дифференцировки и деления являются событиями, необходимыми для нормальной жизнедеятельности организма. Одну из ключевых ролей в этом играют хромосомные теломеры, при критическом укорочении которых клетки погибают. При этом длина теломер «клеточного депо» должна поддерживаться на относительно постоянном уровне, не достигая критически малого значения. Это также должно обеспечиваться в опухолевых клетках для поддержания неограниченного числа их делений. В 1971 г. А. Оловников, предложив теломерную гипотезу старения, высказал также и предположение о наличии специализированной ферментной системы, контролирующей и поддерживающей длину теломерной ДНК.

Фермент, способный увеличивать длину теломерных последовательностей ДНК, был выделен Э. Блекберном и Э. Грейдером в 1984 г. из культуры жгутиковых простейших *Tetrahymenathermophila*.

Строение фермента

Теломераза является уникальным по строению ферментом. Он представляет собой РНК-содержащий белок и относится к классу трансфераза, код фермента – 2.7.7.31.

Теломеразу не относят к белкам теломерного комплекса.

В настоящее время теломераза обнаружена в клетках практически всех видов эукариотических организмов, в том числе и человека.

Теломераза человека как рибонуклеопротеид состоит из белковой части и РНК-компонента.

Белковые компоненты теломеразного комплекса

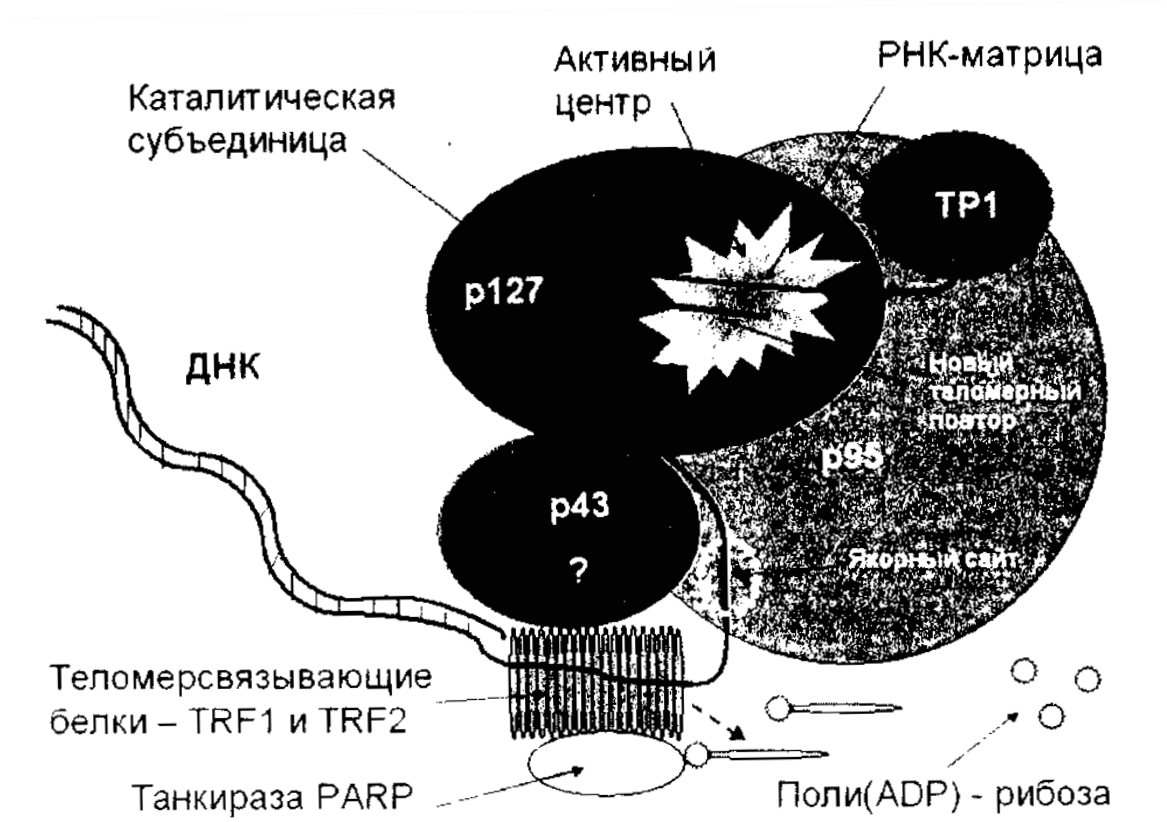
Все белки теломеразного комплекса можно условно разделить на два компонента – *структурный* (теломеразоассоциированные белки), обеспечивающий фиксацию РНК и ДНК, а также их сближение, и *функциональный*(каталитический) – собственно обратную транскриптазу, осуществляющую синтез теломерных повторов.

Первыми белками теломеразного комплекса, полученными из *Tetrahymenathermophila* были белки p80 и p95. Было установлено, что эти белки обладают способностью взаимодействовать с РНК-компонентом теломеразы, а также с теломерной ДНК. Однако способностью удлинять теломерную ДНК эти белки не обладают.

Наличие каталитической субъединицы в составе теломеразного комплекса является определяющим фактором для проявления активности фермента. Комплекс из РНК-компонента и структурных белков

теломеразыприсутствует в клетке практически постоянно. При присоединении (возможно, с участием hTEP1) к этому комплексу каталитической субъединицы наблюдается активация фермента.

Для проявления теломеразной активности достаточно присутствия в растворе РНК-компонента и каталитической субъединицы.



Строение теломеразного комплекса.

Модуль 5. Механизмы регуляции теломеразной активности.

1. Механизм и регуляция теломеразной активности

Активность теломеразы в клетке наблюдается в основном в S-фазу клеточного цикла, когда осуществляется репликация ДНК. Теломеры при этом частично освобождаются от теломерсвязывающих белков, обеспечивая теломеразе доступ к ДНК. После завершения репликации белково-теломерные комплексы образуются заново.

*Связывание.*Теломерная последовательность ДНК связывается в специфическом якорном сайте белка p95.

Элонгация. Во время этой стадии происходит достройка 3’ – конца теломеры на матрице РНК, в результате чего матричный участок РНК оказывается полностью связанным с ДНК. Эта реакция катализируется обратнотранскриптазной субъединицей теломеразы.

Транслокация. Происходит перемещение фермента вперед по теломерной ДНК. В результате этого оказывается свободной часть матричного участка РНК впереди 3’-конца теломеры. Далее стадии повторяются, в результате чего 3’-конец теломерной ДНК удлиняется на определенное число теломерных повторов.

Достройки только 3’-конца теломеры недостаточно для нормального ее восстановления, так как ДНК является двухцепочечной молекулой. Достройка 5’-конца теломерной ДНК происходит уже без участия теломеразы также в S-фазу клеточного цикла.

Достройка осуществляется в основном двумя методами.

Синтез обычным способом. При этом к вновь синтезированным теломерным повторам присоединяются РНК-праймеры и происходит синтез фрагментов Оказаки. Далее ДНК-полимераза β вырезает праймеры, ДНК-лигаза сшивает фрагменты, то есть осуществляется синтез отстающей цепи, как при репликации. Важно отметить, что небольшой 3’-оверхенг при этом остается.

Образование «шпильки». Это достаточно редко встречающийся способ. Длинный 3’-конец теломеры при этом образует небольшую петлю, и она служит началом для синтеза новой цепи ДНК, комплементарной вновь синтезированным теломернымповторам.Синтез 5’-конца теломеры завершает её удлинение.

Иммортализация – процесс, ведущий к приобретению клеткой способности делиться гипотетически неограниченное число раз, не вступая при этом в процесс апоптоза. Нормальный тканевый цикл регулируется большим количеством многоуровневых механизмов, поэтому иммортализация*invivo* практически всегда сопряжена со значительными мутациями в геноме и изменениями в фенотипе клетки и во многих случаях приводит к появлению новообразований. Клетки опухоли обязательно должны пройти через процесс иммортализации, иначе их неограниченное деление, составляющее основу роста опухоли, будет невозможно.

В любой соматической клетке в норме преобладает так называемый фенотип старения, что ведет к запрограммированной гибели клетки после выполнения определённых функций. Это явление носит название *терминальной остановки пролиферации* (terminalproliferationarrest, TPA). Связанная с этим процессом постоянная смена клеточных поколений в тканях является основополагающим фактором в осуществлении нормальной работы тканей, органов и всего организма в целом. Постоянное укорочение теломер играет в этом одну из ключевых ролей, являясь регулятором клеточной пролиферации и связанной с этим стабильности ткани.

Фаза М1– происходит подавление активности механизмов терминальной остановки пролиферации клетки, подошедшей к лимиту Хейфлика. При этом происходит увеличение количества делений клетки в среднем на 30. Но если действие онкогенного фактора продолжается, то происходит инактивация и этого пути, сопровождающаяся увеличением количества удвоений клетки еще на 30.

Фаза М2, или *фаза кризиса.* Преодоление клеткой лимита Хейфлика встречается в нормально функционирующей ткани достаточно часто, и в фазу М1 входит большое число клеток. Большее количество клеток, прошедших стадию М1, гибнет в фазу кризиса.

Стабилизация длины теломер приводит к уменьшению частоты мутаций и преодолению клеткой фазы кризиса. В результате клетка становится иммортализованной. В то же время множественные мутации в геноме приводят к необратимому изменению клеточного фенотипа. Иммортализация рассматривается как один из основных компонентов процесса опухолевого роста.

Регуляция теломеразной активности

В процессе внутриутробного развития теломераза активна во всех клетках организма, однако после рождения активность ее сохраняется только в некоторых видах клеток (мужские половые клетки, активированные лимфоциты, базальные слои эпителия, стволовые клетки тканей), что связано с необходимостью поддержания в них высокого пролиферативного потенциала.Изучениетеломеразы в различных типах опухолей показало достаточно выраженную зависимость между активностью фермента и злокачественностью.

Регуляция теломеразной активности на различных уровнях представляется одним из основных механизмов контроля пролиферативного потенциала различных типов клеток. Нарушение этих механизмов в процессе

иммортализации ведет вприобретению клеткой возможности неограниченного деления и появлению опухолевых клонов.

Ключевым компонентом для проявления теломеразной активности в клетке является каталитическая субъединица фермента, и большинство изученных механизмов регуляции теломеразной активности у человека связаны с hTERT.

Экспрессия гена hTERT

Представленный в нормальной клетке в виде 1 копии ген содержит 16 экзонов и 15 интронов. Продуктом трансляции мРНК гена является белок с мол.массой 127 кДа (p127).

Транскрипция гена hTERT. Активируют транскрипцию гена hTERT, в основном, следующие факторы.

C-Myc. Данный фактор известен как один из онкогенов, влияющих на процессы пролиферации, роста и апоптоза в клетке. Процесс иммортализации очень часто связан с увеличением количества c-Myc в клетке. Активация hTERT является одним из основных компонентов онкогенного действия c-Myc.

Стероидные гормоны. По данным последних исследований, эстрогены влияют на теломеразную активность в гормон-зависимых тканях путем прямой активации экспрессии гена hTERT. Данный эффект особенно выражен в клетках, взятых из гормонально-зависимых тканей (молочная железа, эндометрий).

Прогестерон, напротив, инактивирует экспрессию hTERT.

Ингибиторами транскрипции гена hTERT являются следующие факторы:

1) апоптозные;

2) подавляющие пролиферацию – интерферон-α имеет выраженную антипролиферативную и противоопухолевую активность и способен подавлять экспрессию гена hTERT;

3) метилирование ДНК как фактор регуляции экспрессии большого числа генов влияет и на экспрессию гена hTERT. Метилирование может участвовать в репрессии гена в соматических клетках.

Регуляция на уровне посттрансляционных изменений hTERT

Данный уровень регуляции теломеразной активности является второстепенным по отношению к регуляции на уровне экспрессии гена hTERT. Посттрансляционные изменения hTERT (включая белок-белковые взаимодействия, фосфорилирование/дефосфорилирование и т.д.) играют более существенную роль в норме, в то время как при опухолевой патологии их значение снижается.

Посттрансляционные изменения и белок-белковые взаимодействия. Процесс сборки активной теломеразы и доставки ее в ядро протекает достаточно медленно, в течение 24 ч, из-за необходимости посттрансляционных модификаций полипептидов и последующего их объединения в теломеразный комплекс.

Фосфорилирование и дефосфорилирование – один из наиболее важных механизмов в регуляции структуры и функции белков – влияет и на активность теломеразы. Выраженное ингибирование функции фермента наблюдалось в эксперименте при действии фосфатазы А2. Теломераза может существовать в двух формах – фосфорилированной и дефосфорилированной, причем в фосфорилированной форме фермент активен.

ТанкиразаPARP. Кроме непосредственного влияния на фермент, регуляция функции теломеразы может осуществляться путем уменьшения ее доступа к теломерной ДНК. Такой механизм опосредован теломерсвязывающими белками, главным образом – TRF1. В обычном состоянии молекулы этого

белка связаны с теломерой практически на всем ее протяжении, закрывая доступ для теломеразы. Это взаимодействие может нарушаться при участии одного из белков теломерного комплекса – танкиразыPARP.

Действие танкиразы аналогично действию дифтерийного токсина, то есть это нарушение функции белков путем их АДФ-рибозилирования. Повышение экспрессии танкиразы в клетках ведет к постепенному удлинению теломер.

Активация этого фермента – одно из признаков раковой клетки. Активная теломераза присуща только опухолевым клеткам.

Присутствие активной теломеразы в подавляющем большинстве злокачественных опухолей означает, что стабилизация теломер, по-видимому, представляет собой важный фактор развития опухоли. Таким образом, теломераза как компенсирующий укорочение хромосом фермент действительно может считаться одним из компонентов, характеризующих раковую клетку.

АТ – активная теломераза

Короткие теломеры обнаружены в большинстве опухолей различных типов. Для таких заболеваний, как нейробластома, аденокарцинома эндометрия, рак молочной железы и миелодиспластический синдром, описана корреляция между уменьшением теломерной длины и возрастанием тяжести заболевания.

Таким образом, информация об активности теломеразы может иметь большое значение в диагностике рака. Позитивный результат может быть получен при наличии в образце всего лишь нескольких опухолевых клеток, при этом важно, что для диагностики могут оказаться пригодны образцы, полученные неинвазивными и минимально инвазивными способами. Для некоторых видов опухолей существует корреляция между АТ и определенными клинико-патологическими показателями. Так, например, при

нейробластоме низкая АТ ассоциировалась с ранними стадиями заболевания, а более высокая – с поздними. При раке желудка уровень АТ коррелировал с таким показателем, как выживаемость пациентов. Диагностический и прогностический потенциал теломеразы требует дальнейшего исследования с привлечением большего числа больных и с более длительными периодами наблюдения. Для этих целей также необходимо усовершенствование методов количественного определения АТ

Модуль 6. Противоопулевые препараты. Молекулярные принципы конструирования.

1. Основные отличия раковых клеток от здоровых. Причины аномалий клеток. Что такое митоз?
2. Что такое митогены?
3. Терапевтические мишени для противоопухолевых препаратов.
4. Принципы повышения эффективности противоопухолевых препаратов.
5. Моноклональные антитела, лекарственные средства на их основе для лечения опухолей.
6. Что представляет собой препарат милотарг. Иммуноконъюгаты.
7. Вектор иммуноконъюгата. Вещества, используемые в качестве векторов адресной доставки.
8. Рецептор-опосредованный эндоцитоз.
9. Эпидермальный фактор роста (ЭФР) и α-фетопротеин (АФП).
10. Преимуществами ЭФР и АФП при использовании их в качестве векторов.
11. Рецепторы ЭФР и их характеристика.
12. Рецепторы АФП.
13. Какие средства могут выступать в качестве терапевтических противоопухолевых компонентов гликоконъюгатов?
14. Что такое спитсер? Какие вещества могут выступать в качестве спитсеров?

15. Что такое фталоцианины?

16. Что такое антисмысловые нуклеотиды?

Существует свыше 200 заболеваний, характеризующихся неограниченным ростом тканей. Раковые клетки отличаются от здоровых следующими аномалиями: 1) морфологическими; 2) иммунофенотипическими; 3) цитохимическими; 4) генетическими.

Все эти аномалии являются следствием или причиной запуска клеточного деления – в виде неконтролируемого митоза. Поэтому, в первую очередь, *мишенями для терапевтического воздействия* являются те структуры раковых клеток, которые принимают участие в процессе митоза.

Митоз(-греч.-нить) – непрямое деление клетки, наиболее распространенный способ репродукции эукариотических клеток.

Биологическое значение митоза состоит в строго одинаковом распределении хромосом между дочерними ядрами, что обеспечивает образование генетически идентичных дочерних клеток и сохраняет преемственность в ряду клеточных делений. За 70 лет в теле человека суммарно осуществляется порядка 1014 клеточных делений. Количество клеточных делений может увеличиваться за счет влияния на организм митогенов.

Митогены– вещества, которые стимулируют начало клеточного деления (митоза), ими могут быть (продукты дегенерации, специфические митотические гормоны). *Например,* для Т-лимфоцитов – это фитогемагглютинины, для В-лимфоцитов ими являются липополисахаридыE. coli – эти примеры приведены как примеры нормы.

Терапевтические мишени

Мишенью для терапии онкологических процессов может быть такой этап митоза, как система синтеза и функционирования ДНК. Во-вторых – можно поразить ферменты, ответственные за отдельные стадии митоза. В третьих – можно воздействовать на отдельные микроструктуры самого аппарата митоза.

Эффективность большинства лекарственных препаратов, используемых в настоящее время для лечения рака, ограничена рядом факторов, таких как:

1) низкий терапевтический эффект химиотерапевтических агентов, и их токсичность для организма; 2) опасность появления лекарственно-устойчивых популяций раковых клеток; 3) гетерогенность опухолей; 4) наличие метастазов; 5) необходимо повышать избирательность (селективность) действия.

Основная цель при разработке новых препаратов – идентифицировать агенты, которые имели бы максимальный терапевтический эффект и минимальные побочные системные эффекты. Впервые эта концепция была сформулирована П.Эрлихом в начале XX века. Им же был предложен термин «химиотерапия».

Эрлих считал, что лекарство должно выполнять роль магической пули, избирательно поражающей мишень – уязвимое место болезнетворной клетки. Способы повысить селективность противоопухолевых препаратов предлагаются и активно разрабатываются в течение последних нескольких десятилетий. Одним из способов улучшить селективность противоопухолевой терапии является разработка препаратов, обладающих направленной активностью против терапевтических мишеней.

Значительные успехи достигнуты при использовании в качестве противоопухолевых лекарств моноклональных антител (МоАТ).

Впервые они были применены для лечения рака в 1979г. прогресс в терапии значительно ускорился с развитием МоАТ – инженерных технологий, результатом которых стали химерные (мышь/человек) МоАТ или только человеческие МоАТ со сниженной иммуногенностью. Они могут быть введены больным в течение продолжительного периода лечения без индукции клинически значимого иммунного ответа.

Моноклональные АТ получают к опухоль-ассоциированным антигенам. В основном в качестве донора иммунных спленоцитов используют удаленные

миндалины человека, у которых в условиях (invitro – в чашке Петри, в условиях специальной питательной среды вызывают иммунную реакцию в ответ на введенный антиген).

В настоящее время в клинике применяются 4 препарата на основе МоАТ для лечения рака:

1) Мавтера (Ритуксимаб) химерные МоАТ мышь/человек против СД 20 – при острой миелоидной лейкемии.
2) Минтузумаб – МоАТ против СД 33 антигена – лейкемии.
3) Трастузумаб (Герцептин) – моноклональные антитела против HER2/пеле – при раке молочной железы.
4) Милотарг – конъюгат рекомбинантных человеческих антител к СД 33 с калихемицином.

Одним из новейших препаратов – милотарг (MIlotarg; gemturumabozogamicin) – применяют для лечения лейкозов, относится к препаратам, которые объединены общим названием *иммуноконъюгаты*.

Иммуноконъюгаты – это бифункциональные молекулы, которые состоят из адресующего домена (вектора), мишень для которого локализована в опухоли, и терапевтического компонента (например, антибиотика). В милотарге – к качестве вектора выступают МоАТ к СД 33, которые соединены с ендииновым антибиотиком калехимицином.

В качестве векторов могут выступать как антитела МоАТ к отдельным антигенам опухоли, так и белки-гормоны пептиды, ростовые факторы – т.е. лиганды рецепторов, которые являются для опухоли специфическими или выступают в качестве антигенов. *Например,* если мишенью для направленного транспорта лекарств являются рецепторы факторов роста опухолей или *онкофетальных белков*, то в качестве белков-переносчиков (векторов) могут выступать их физиологические лиганды – т.е. сами факторы роста или онкофетальные белки.

Доставка терапевтического агента (антибиотика или другого

цитотоксического агента бактериального или растительного происхождения), который должен быть не токсичен для всего организмапроисходит путем эндоцитоза. Связывание белка со специфическим рецептором на поверхности клетки индуцирует процесс рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Эндоцитоз– это перенос макромолекул через клеточную мембрану. (слайд)

Поглощаемые макромолекулы локализуются в эндосомах, которые могут сливаться со специфическими мембранами, что обеспечивает направленный перенос между внеклеточным пространством и содержимым клетки. Содержимое эндосом в конце концов либо попадает в лизосомы, либо происходит диссоциация лиганд – рецепторного комплекса и рецептор возвращается назад в плазматическую мембрану. Опосредуемый специфическими рецепторами эндоцитоз обеспечивает механизм избирательного (селективного) концентрирования, который увеличивает поглощение лигандов и их терапевтических компонентов в 1000 раз.

Эпидермальный фактор роста (ЭФР)– эффективный вектор адресной доставки терапевтических компонентов иммуноконъюгантов.

ЭФР – это маленький белок, состоящий из 53 аминокислот.

Преимущества ЭФР как белкового вектора для адресной доставки:

1 – способность к рецепторному эндоцитозу;

2 – высокая концентрация рецепторов ЭФР на поверхности опухолевых клеток;

3 – небольшие размеры белка ЭФР;

4 – возможности получения рекомбинантного белка ЭФР;

5 – низкая иммуногенность;

6 – растворимость в воде;

7 – термостабильность.

Кроме того модификация ЭФР по N-концу не влияет на связывание с рецепторами благодаря удаленности концевой NH_2-группы от места связывания, что позволяет присоединять к ЭФР биологически активные терапевтические компоненты.

ЭФР является важным митогеном для многих клеток эпителиального и эпидермального происхождения. ЭФР и его рецепторы обнаруживаются практически во всех злокачественных опухолях. В результате взаимодействия ЭФР с их рецепторами происходит аутокринная стимуляция роста, его активность регулирует пролиферацию, подвижность и дифференцировку многих клеток различных типов.

ЭФР на своей поверхности имеет высокую концентрацию рецепторов, они относятся к семейству рецепторов Er в B (слайд – Er в B – рецепторы и их лиганды). Рецепторы этого семейства представляют собой трансмембранные гликопротеины, состоящие из экстраклеточноголиганд-связывающего домена, трансмембранного домена, внутриклеточного домена, обладающего тирозинкиназной активностью. Связывание лиганда с внеклеточным доменом рецептора ЭФР (ре ЭФР) приводит к димеризации ре ЭФР , что активизирует рецептор. Активация рецептора индуцирует аутофосфорилирование его внутриклеточного домена, что в свою очередь, запускает каскад реакций, приводящих, в конечном итоге, к активации пролиферации, а так же регуляции некоторых других процессов. Киназныекакскады и специфические белок-белковые взаимодействия могут, в свою очередь, определить специфический клеточный ответ. Активированный ре ЭФР быстро интернализуется в окаймленных ямках, сортируется в ранних эндосомах и, депрадирует в лизосомах в процесс, называемом даун регуляцией (слайд – передача сигнала через рецептор Er в B).

А-фетопротеин – кандидат на роль белкового вектора для транспорта лекарственных препаратов (АФП)

АФП – основной белок сыворотки развивающегося плода онкофетальный белок. Впервые обнаружен Бергстраном и Царом в 1956 г. в фетальной сыворотке человека. АФП выявляется в сыворотке крови больных, первичной гепатоцеллюлярной карциномой, опухолей яичек и яичников.

АФП – это одноцепочечный белок из 590 аминокислот с молекулярной массой 68-74 кДа. АФП наряду с сывороточным альбумином и витамин Д-связывающим белком принадлежит сем. Альбумино-подобных белков. Необходимо упомянуть, что транспортные белки альбумин и трансферрин так же активно накапливаются многими опухолями и используются в качестве векторов. АФП имеет гомологию с сывороточным альбумином. АФП связывает полиненасыщенные жирные кислоты, эстрогены, билирубин, тяжелые металлы. Проникновение внутрь клеток происходит так же как и у эпидермального фактора роста путем рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Известно 4 типа мембранных рецепторов АФП – с М.м. 18, 31, 60, 67 кДа. 1984г. I.Uriel и R.Moro была выдвинута гипотеза о том, что рецептор α-фетопротеина является универсальным онкомаркером. С получением МоАТ к ре АФП появилась возможность идентифицировать его в опухолях. Рецептор АФП отсутствует в нормальных тканях человека, что и позволяет использовать альфа-фетопротеин в качестве белкового вектора для адресной доставки лекарств.

Терапевтические противоопухолевые компоненты иммуноконъюгатов на основе МоАТ, ЭФР, АФП

В качестве противоопухолевых агентов перечисленных векторов используют:

1. антибиотики группы антрациклинов (например: доксорубицин).
2. антибиотики группы ендиинов (эсперамицин, калихемицин).
3. фталоцианины – группа веществ, сходных по механизму действия с порфиринами.
4. Антисмысловыеамионуклеотиды (АСОН).

Доксорубицин (ДОКС), антибиотик из группы антрациклинов, продуцируемый *StreptomIcespeucetiusvax. coesius*.

Цитококсический эффект связан с его интеркаляцией в двойную спираль ДНК и последующим ингибированием ДНК и РНК синтеза, а так же воздействием на стабилизацию комплекса ДНК-топоизомеразаII.

Эффективность терапии связана с внутриклеточным накоплением и повышением цитотоксичности за счет конъюгирования с выше перечисленными векторами. *Сшивающими агентами* (спейсером) с ЭФР и АФП являются карбодиимид, глутаровый альдегид, малеимидсодержащие бифункциональные сшивки, имнотиолан.

*Спейсер*иммуноконъюгата должен обеспечивать прочность связи с одной стороны и лабильность с другой, чтобы внутри клетки антибиотик мог отщепиться от белкового вектора.

Ендииновые антибиотики – первые представители семейства были выделены в конце восьмидесятых из актиномицетов родов Micromonospora и Actinomaolura. Химическая структура представляет собой 10-членный ендииновый цикл, содержащий две ацетиленовые связи. Основной мишенью является ДНК. Связываясь с ДНК, эсперамицин индуцирует одно и двунитевые разрывы, что приводит к гибели клетки.

Эсперамицин в 1000 раз активнее (ДОКС), но обладает гепатоксичностью. Токсичность преодолевается конъюгацией с вектором АФП (альфа фетопротеином).

Фталоцианины

Новый класс терапевтических противоопухолевых агентов – принцип, действия которых фотодинамическая терапия. Фтосенсибилизаторы не

обладают противоопухолевой цитотоксичностью в обычных условиях, но активируются при облучении красным лазером, который можно сфокусировать исключительно на опухоли, избежав поражения нормальных тканей. Облучение, следующее после накопления фотосенсибилизатора, индуцирует фотохимическую реакцию второго типа, в результате которой происходит образование синглетного кислорода, что приводит к деструкции биомолекул. Поэтому фотосенсибилизаторы должны обладать как минимум двумя свойствами: 1) преимущественно накапливаться в опухоли; 2) интенсивно поглощать красный свет, чем можно избежать повреждения окружающей опухоль ткани.

Для повышения избирательности действия фталцианинов были синтезированы конъюгаты алюминиевого и кобальтового комплексов фталоцианина с АФП и ЭФР.

В качестве белков-векторов часто успешно применяют трасферрин, инсулин, ЭФР, пептиды. Конъюгацию осуществляют с помощью линейных или разветвлённых поликатионных молекул: полилизин, полиэтиленимин. При этом образуется комплекс между поликатионом и олигонуклеотидом за счёт электростатического взаимодействия.

Разработка адресных систем доставки лекарственных препаратов является в настоящее время объективной необходимостью. Несмотря на то, что за десятилетие развития этого направления удалось получить немного практических результатов, очевидны достоинства и преимущества созданных конструкций. Полученные с их помощью новые знания о механизмах клеточного обмена дают основание надеяться на внедрение новых, более эффективных препаратов для селективной терапии онкозаболеваний.

Антисмысловые-нуклеотиды (АСОН) – это короткие (15-25 нуклеотидов) одноцепочечные последовательности ДНК, комплементарные последовательностям мРНК. В основе концепции антисмысловыхолигонуклеотидов лежит идея гибридизации нуклеиновых кислот при взаимодействии комплементарных пар оснований. Основная идея

применения заключается в возможности модулировать различные стадии переноса информации от генов к белкам, т.е. влиять на промежуточный метаболизм РНК. Основным механизмом действия АСОН является ингибирование трансляции. АСОН обладает высокой специфичностью в отношении своих мишеней и, в отличие от большинства химиотерапевтических препаратов легко подвергаются биодеградации и удалению из организма.

Практическое использование антисмысловыхолигонуклеотидов в качестве лекарственных препаратов, однако, требует преодоления двух негативных факторов:

1) быстрой энзиматической деградации природных олигонуклеотидов;

2) плохого проникновения олигонуклеотидов в клетки из-за высокого отрицательного заряда этих соединений.

Модуль 7. Генная инженерия и рекомбинантные ДНК.

Современные биотехнологические процессы – получение лекарственных средств (инсулин, интерфероны), многих вакцин (против гепатитов В, С, арбовирусных лихорадок), получение генномодифицированных продуктов, основаны на методах рекомбинантных ДНК. Возможности генной инженерии способны приносить человечеству, как большую пользу, так и большой вред, в виде получения патогенных агентов и химических химер, влияющих на здоровье человека.

Рекомбинантными ДНК называются молекулы ДНК, полученные вне живой клетки, в пробирке invitro, путём соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами способными реплицироваться в клетке. Основу эксперимента составляет встраивание природной или чужеродной ДНК в *вектор*, который представляет собой *бактериальную плазмиду* или геном вируса, затем рекомбинантную молекулу ДНК вводят в клетку, где она реплицируется. Клетка, содержащая такую ДНК, размножается, образуя клон трансформированных клеток. Основная задача не только получить клон, но и добиться, чтобы клетка производила экспрессию продукта, встроенного гена и образовывала чужеродные белки в достаточных количествах.

В 1972 г. Арбером и Смитом – лауреатами Нобелевской премии 1978 г. – были открыты ферменты рестрикции – рестриктазы, которые расщепляют ДНК в специфических участках. Не менее важным оказалось открытие лигаз-ферментов, способных «сшивать» фрагменты ДНК, обратной транскриптазы, синтезирующей ДНК на матрице РНК. Для встраивания одного или нескольких генов в ДНК с последующим введением в клетки

микроорганизма необходимы как рестрикционныеэндонуклеазы, так и лигазы.

Необходимо отметить, что в живой природе между микроорганизмами, происходит обмен генетической информации, путем трансформации. В результате так же появляются новые варианты вирусов. Эти процессы *invivo*, называют генетическая рекомбинация, а возникшие в природе вирусы – рекомбинантными.

Рекомбинантный белок(recombinantprotein) [лат. re- - приставка, обозначающая повторность действия или противоположное действие, и combination – соединение] – белок, состоящий из аминокислотных последовательностей различных природных белков, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Рекомбинантные белки широко используются в медицине, как для лечения и профилактики заболеваний, так и в диагностических целях. Первым таким белком, полученным в промышленных масштабах, был гормон роста человека.

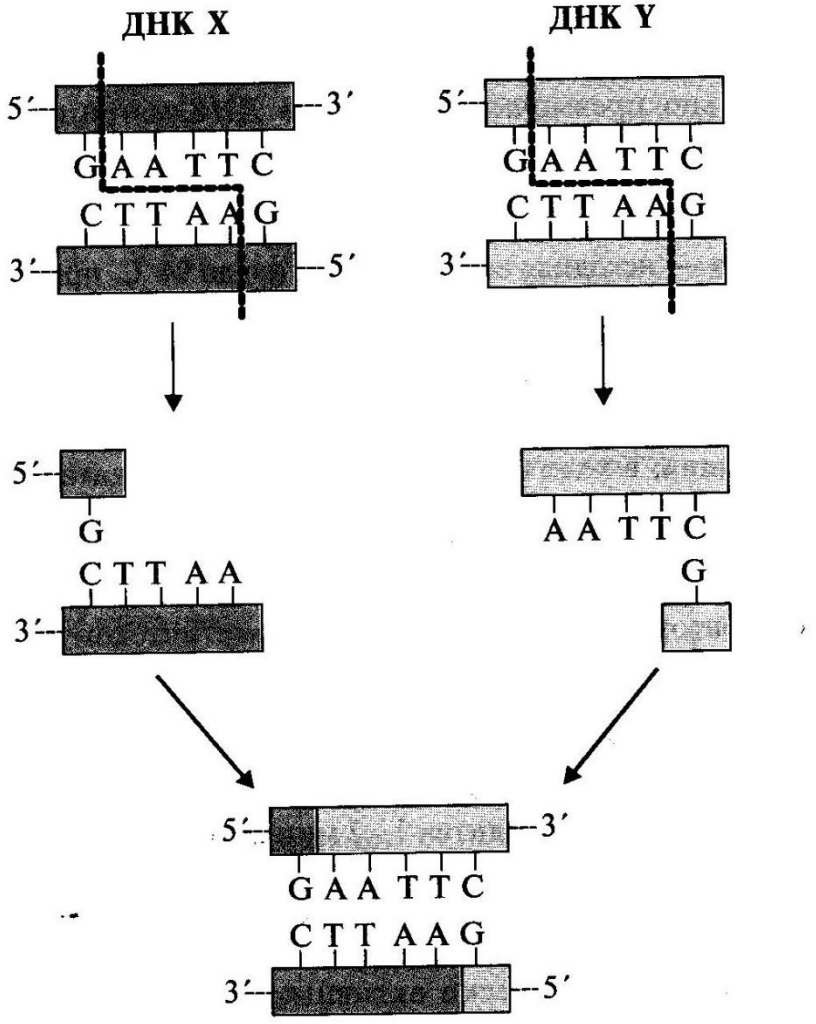
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК В МЕДИЦИНЕ

Для изучения генетической неоднородности специфическую ДНК, содержащую информацию об интересующем нас гене или его фрагменте, необходимо выделить из соответствующего источника и получить в достаточном для исследования количестве. Ген или его фрагмент получают, используя:

- **обратные транскриптазы** — ферменты ретровирусов, которые катализируют синтез ДНК на матрице мРНК;
- **химический синтез**, позволяющий на автоматическом синтезаторе получать одноцепочечные фрагменты ДНК с заданной последовательностью и длиной до 100 нуклеотидов;

- **рестриктазы** — бактериальные ферменты из группы эндонуклеаз. Они «узнают» короткую специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК длиной в 4–6, реже в 8–12 пар оснований и расщепляют обе нити. В настоящее время из бактериальных источников выделены сотни рестриктаз с разной субстратной специфичностью. Расщепление обеих нитей ДНК может происходить двояким путем — с образованием двухцепочечных («тупых») или одноцепочечных («липких») концов.

Синтез рекомбинантных ДНК. Образованные с помощью рестриктаз фрагменты гена, имеющие «липкий» конец, могут по принципу комплементарности взаимодействовать с «липким» концом другого, не родственного ему фрагмента ДНК, который может принадлежать бактериофагу, вирусу или плазмиде и получаться при действии на ДНК той же самой рестриктазы Фрагменты ковалентно соединяют друг с другом с помощью фермента ДНК-лигазы и получают рекомбинантные (или гибридные) ДНК.



Образование молекул рекомбинантной ДНК с помощью рестриктаз и ДНК-лигазы:

ДНК X и ДНК Y — две молекулы ДНК из различных источников; Eco RI — бактериальная рестрикционная эндонуклеаза

Клонирование ДНК. Методика клонирования и размножения рекомбинантной ДНК в бактериях позволяет получить интересующие нас продукты: ДНК, РНК или белки в достаточно больших количествах
Бактериофаги, бактериальные плазмиды — экстрахромосомные кольцевые ДНК — используются в качестве векторов, с помощью которых чужеродный ген вносится в бактерию, где обеспечивается его репликация, транскрипция и трансляция с образованием нужного белкового продукта.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод амплификации, т.е. получения большого числа копий интересующего нас гена или его фрагмента в условиях *in vitro*. Реакционная смесь для получения интересующей нас ДНК содержит: исследуемую ДНК-матрицу, субстраты реакции — четыре дНТФ (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ), два праймера, термостабильную Taq-полимеразу и реакционный буфер, содержащий ионы Mg^{2+} в качестве кофактора.

Праймеры — это искусственно синтезированные короткие однонитевые ДНК (20—30 нуклеотидов), выполняющие функцию «затравок» при ферментативном синтезе ДНК. В ПЦР обычно используют два праймера, которые комплементарны 3′-концевым последовательностям амплифицируемого участка на обеих нитях ДНК-матрицы соответственно. Концентрация праймеров значительно превышает количество ДНК-матрицы в реакционной смеси. Расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых в ПЦР фрагментов ДНК.

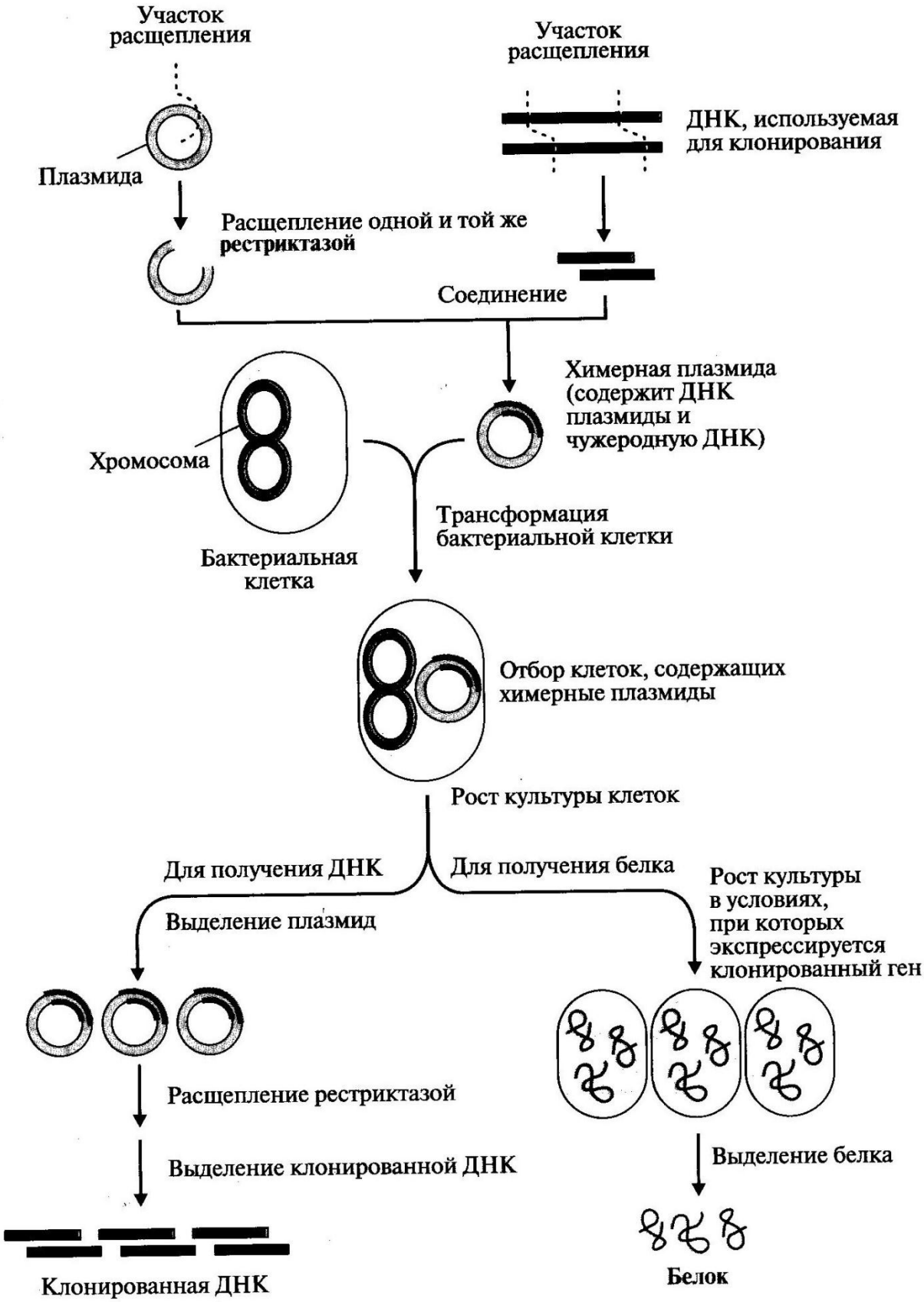
В один цикл ПЦР включается три этапа

- **денатурация** — исходная смесь нагревается до 94 °С, при этом имеет место разрушение двуспиральной структуры ДНК и расхождение цепей;
- **отжиг** — на этом этапе температура реакционной смеси снижается до 52—60 °С и происходит комплементарное связывание праймеров с нитями матричной ДНК;
- **полимеризация**, в ходе которой Taq-полимераза катализирует удлинение праймеров (с 3′-конца) и синтез новых цепей ДНК. Температура смеси для проявления оптимальной активности Taq-полимеразы соответствует 72 °С.

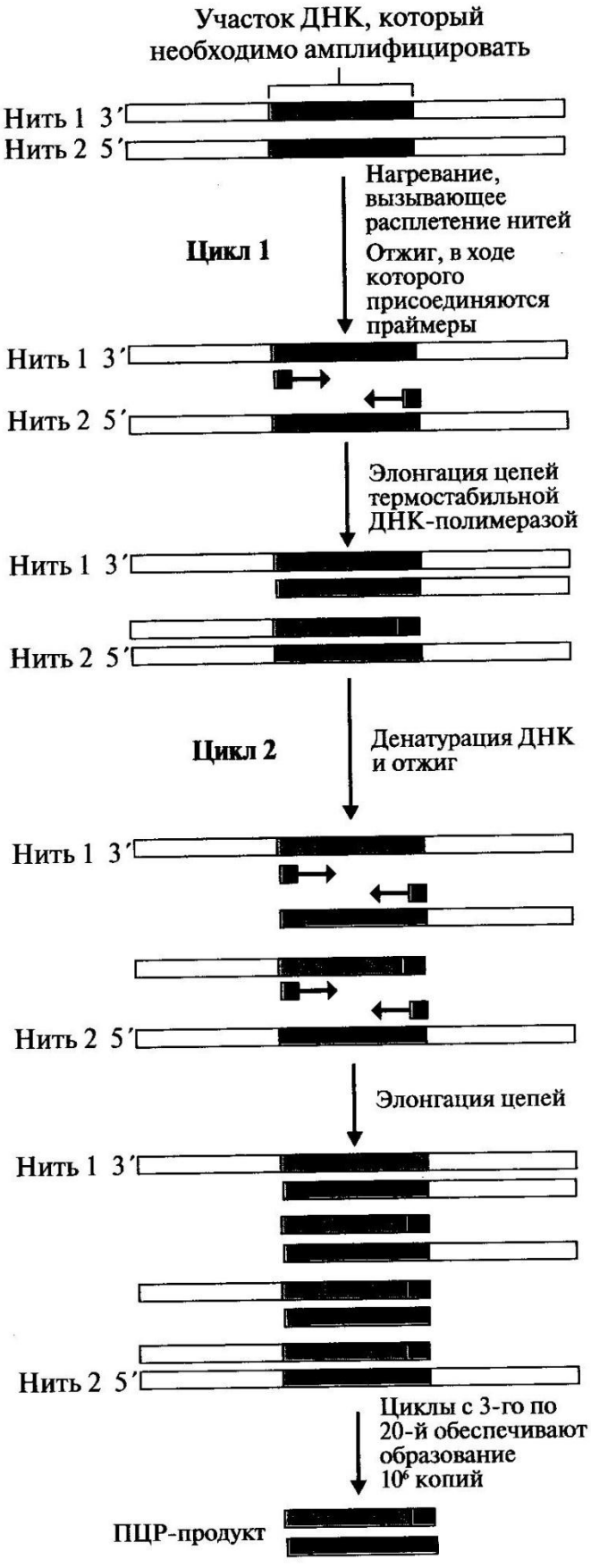
Эти этапы повторяются многократно в автоматическом приборе — амплификаторе (термоциклере), что позволяет получить огромное количество копий интересующего нас фрагмента ДНК. Так, в результате проведения 20 циклов ПЦР анализируемый участок ДНК амплифицируется более чем в миллион раз. Продолжительность каждого этапа цикла ПЦР определяется экспериментально и обычно длится 1—2 минуты.

Механизм образования рекомбинантных ДНК дает возможность:

- использовать микроорганизмы в качестве продуцентов необходимых для человека веществ: белковых гормонов (инсулин, гормон роста, соматостатин), биологически активных пептидов, вакцин (например, против гепатита С), факторов, участвующих в свертывании крови (фактор VIII для лечения гемофилии);
- создавать новые полезные для человека формы растений и животных;
- предпринимать попытки лечения наследственных болезней путем введения в клетки нормальных копий дефектных генов.



Клонирование ДНК в бактериальных клетках



Полимеразная цепная реакция

Благодаря использованию методов клонирования ДНК удается решать вопросы генетического картирования (т.е. составления генетической карты организма), установления хромосомной локализации многих генетических нарушений, таких, как серповидноклеточная анемия (11-хромосома), фенилкетонурия (12-хромосома), мышечная дистрофия Дюшена (10-я хромосома) и др., проводить пренатальную диагностику наследственных заболеваний.

Использование техники рекомбинанатных ДНК для диагностики и лечения заболеваний

Полиморфизм длины рестрикционнных фрагментов. Замены, делеции и вставки нуклеотидов вызывают изменения в первичной структуре ДНК, а следовательно, и в расположении сайтов рестрикции. После обработки рестриктазами мутированной ДНК образуются фрагменты иного размера, чем в случае анализа нормальной ДНК. Этим пользуются при обследовании пациентов на носительство патологических генов (в частности, при обследовании семей, в которых родители являются гетерозиготами по гену серповидноклеточной анемии).

Определение мутаций с помощью аллель-специфических проб. Синтезируются два коротких олигодезоксинуклеотида, меченных изотопом P^{32}, один из которых содержит ДНК-последовательность, включающую мутацию, а другой не изменен. С помощью этих аллель-специфических проб ДНК пациентов проверяют

на носительство исследуемой мутации. Для этого область гена, содержащая интересующий нас участок, амплифицируется с помощью ПЦР. Образцы наносят на узкие полоски нитроцеллюлозы и обрабатывают мечеными олигонуклеотидами, содержащими нормальную или мутантную последовательность. Радиоавтографически оценивают, с какой из проб преимущественно связывается ДНК пациента.

Генная терапия. Основная цель этого направления — терапия наследственных и ненаследственных (инфекционных) заболеваний путем введения в клетки пациентов генов, устраняющих генные дефекты или придающие им новые функции. Впервые эта задача была решена в 1990 г., когда четырехлетней девочке, страдающей наследственным иммунодефицитом, вызванным мутацией в гене аденозиндезаминазы (АДА), были пересажены ее собственные лимфоциты с предварительно введенным *in vitro* ретровирусным ДНК-вектором, содержащим нормальный ген АДА. К настоящему времени подобным способом пытаются лечить некоторые наследственные, онкологические заболевания и ВИЧ-инфекции.

С 1990 г. ученые всего мира участвуют в международном проекте «Геном человека», цель которого заключается в выяснении последовательности нуклеотидов во всех молекулах ДНК клеток человека с одновременным установлением локализации всех генов. Решение поставленных задач станет возможным благодаря внедрению новейших технологий второго и третьего поколений.

Из почти 10 000 различных заболеваний человека 3 000 — наследственные. Они не обязательно должны быть наследуемыми и передаваться от поколения к поколению. В этом контексте слово «наследственные» означает, что причина болезни заключается в повреждении наследственного аппарата. В настоящее время сотни генов, повреждение в которых вызывает болезнь, полностью секвенированы. Ожидается, что будут изучены все гены, вовлеченные в развитие патологических процессов у человека. Это поможет вывести на новый уровень методы ранней диагностики и лечения заболеваний.

Генная диагностика – в основе комплекса методов генодиагностики лежат принципы полимеразной цепной реакции

Генная терапия

В настоящее время перспективным направлением лечения больных с нарушениями обменных процессов в результате повреждения ДНК является генная терапия. Принципы генной терапии включают определенные этапы:

1) Идентификация последовательности ДНК, которая будет корригирована;

2) Определение типа клеток, которые нуждаются в лечении;

3) Защита ДНК от гидролиза эндонуклеазами;

4) Транспорт ДНК в ядро клетки.

Генная терапия позволяет:

1) усиливать работу отдельных генов: это трансформация генов, ингибирующих апоптоз, например, гена BCl-2.

2) Ослаблять экспрессию генов: для селективного ингибирования экспрессии генов используют технику антисенсов-антисмысловых олигонуклеотидов. Это приводит к снижению синтеза определенных белков, влияющих на регуляцию апоптоза.

Механизм действия антисенсов:

1) Олигопептиды (ОП) – 12-13 оснований имеют последовательности, комплементарные последовательностям матричной РНК (мРНК) отдельных белков. Они могут блокировать генетическую информацию на стадии, предшествующей транскрипции.

2) а) ОП связываются с ДНК, формируют триплетную спиральную структуру. Это связывание:

1. Необратитмое или
2. Вызывает селективное выщепление триплетного комплекса.

В результате ингибируется экспрессия генов и наступает гибель клетки.

б) В других случаях антисенс комплиментарно связывается с мРНК, что вызывает нарушение трансляции и снижение концентрации соответствующего белка.

Модуль 8. ПЦР как метод биологической идентификации

1. **Что такое ПЦР**
2. **В каких практиках лабораторной диагностике применяют метод ПЦР**
3. **Основные этапы проведения ПЦР**
4. **Что такое репликация и амплификация**
5. **Основные этапы амплификации**
6. **Что такое отжиг и элонация**
7. **Значение Tag полимеразы для постановки ПЦР**
8. **Из чего должна состоять реакционная смесь для постановки ПЦР**
9. **Что такое детекция при ПЦР, основные способы детекции и виды ПЦР.**

ПЦР – это получение множества копий специфического фрагмента ДНК в пробирке invitro.

Основу ПЦР составляет, катализируемое ДНК – полимеразой многократное образование копий определенного участка ДНК. Реакция позволяет увеличить концентрацию заведомо известной последовательности ДНК в пробе, за счет синтеза многочисленных копий invitro – этот процесс называют амплификацией.

Амплификация – это многократное увеличение копий участка ДНК invitro с помощью ДНК – полимеразы, приводящее к увеличению концентрации в пробе искомого участка ДНК, что позволяет провести его детекцию.

Таким образом, в основе метода ПЦР лежит процесс многократного увеличения копий определенных участков ДНК, осуществляемый с помощью фермента ДНК – полимеразы.

Основу метода ПЦР составляет катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий определённого участка ДНК. Как было указано выше, реакция позволяет увеличить концентрацию определённой (заранее известной) последовательности ДНК в пробе за счёт синтеза многочисленных копий invitro. Этот процесс называют амплификацией.

Эти свойства делают её очень привлекательной в качестве самостоятельного метода, позволяющего выявлять ничтожные количества РНК в различных субстратах

Основные этапы ПЦР:

I этап.Выделение генетического материла ДНК или РНК из клинического образца.

В зависимости от вида определяемого возбудителя и клинической пробы применяют различные способы выделения нуклеиновых кислот. В основном применяют – фенольный, сорбентный, экспресс-метод (ДНК-коагулянтный), кипячение м/о.

Фенольный – это дептротеинизация фенолом (хлороформом с последующим осаждением ДНК (РНК) этанолом или изопропанолом.

Сорбентный– добавление лизирующего агента, содержащего раствор гуанидинтиоционата, с последующей сорбцией ДНК (РНК), многократной отмывки и элюции, очищенной нуклеиновой кислоты.

Экспресс-метод – внесение клинического материала в реагент с последующим прогреванием смеси до 98°С, в течение 15 мин и осаждении ненужных компонентов центрифугированием.

Кипячение м/о – взвесь 1×10^9 мл/л суточных м/о в бидистилированной воде с последующим кипячением (или 98°С) в течение 10-30 мин и осаждение ненужных компонентов центрифулерованием.

II этап.*Амплификация* включает 3 этапа.

1. *Денатурация* – реакционную смесь нагревают при 93-95°С в течение 30-40 сек., происходит «расщепление двуцепочечной ДНК», с образованием однонитевой формы. В результате освобождается место для «посадки» (гибридизации праймеров).

2. *Гибридизация (отжиг) праймеров* – это комплементарное связывание праймеров с ДНК – матрицей, происходит при понижении температуры до 50-65°С. Температура отжига специфична для разных праймеров, однако интервал не превышает 65°С. Реакция протекает (10-40 с).

Праймеры –это синтезированные одноцепочечные участки ДНК (препараты), которые созданы для того чтобы детектировать определенный (заданный участок ДНК) путем гибридизации (соединения) с комплементарным участком исходной расплавленной ДНК (матрицей).

Праймеры синтезируются химическим путем и определяют искомый участок ДНК. В молекулярной биологии *гибридизацию праймеров* на специфическом участке ДНК называют отжигом.

Отжиг –это гибридизацияпраймеров на специфическом участке ДНК.

Каждый праймергибридизуется на двух цепях ДНК от 3′-гидроксильного конца к 5′-гидроксильному концу. 3′-гидроксильные концы способны удлиняться направлены навстречу друг другу. После гибридизации праймеры строго ограничивают специфический участок ДНК.

Праймеры и условия отжига подбираются при помощи компьютерных программ. Существует база данных, где приведены первичные структуры всех известных м/о. эти данные используются при подборе праймеров к специфическому участку бактерии.

Основным критерием подбора праймеров является комплементарность 2-3 нуклеотидов на 3′-конце праймеров.

При этом исключается неспецифическое праймирование. Важным фактором, определяющим эффективность специфичность амплификации, является подбор оптимальной температуры отжига праймеров на матрице.

При пониженной температуре в реакционной смеси может произойти связывание праймеров с неспецифическим участком ДНК и в следствие этого сформироваться ложные неспецифические ампликоны (артефакты). Температура отжига зависит от длины праймеров.

Для олигонуклеотидов длиной 14-70 пар оснований оптимальную температуру отжига праймеров рассчитывают по формуле, в которой учитывается структура праймеров и условия проведения реакции (температура, ионный состав среды).

Приблизительно, температуру отжига праймера можно оценить по электрической формуле: T(°C) = 4 (G + C) + 2 (A+T) – 3,где A, T, G, C – число соответствующих нуклеотидов в одном праймере.

3 **этап амплификации** – это *элонгация цепи* – происходит синтез новых цепей ДНК Tag – полимеразой путем удлинения праймеров в направлении от 5´-конца к 3´-концу. Как правило, реакция протекает при 68-72°C.

Tag полимераза – это термостабильная ДНК-полимераза.

В начале использования метода, после каждого цикла нагревания – охлаждения приходилось добавлять ДНК-полимеразу, так как она – термолабильна, и инактивировалась при высокой температуре, которая необходима для разделения цепей (денатурации). Как вы могли заметить каждый этап амплификации регулируется определенным температурным промежутком:

Денатурация – 93-95°C; отжиг праймеров – 50-65°C; элонгация – 68-72 °C.

ДНК-полимеразу, добавляют в реакционную смесь сначала реакции. Процедура проведения ПЦР была сравнительно неэффективной, требовала много времени и фермента. В 1986 году было предложено использовать ДНК-полимеразы из термостабильных бактерий – Thermusaguaticus – Tag-полимераза.

Итак, Tag-полимераза – это термостабильная ДНК-полимераза, выделенная из термостабильных бактерий – *Thermusaguaticus*, катализирует удлинение новой цепи ДНК. Молекулярная масса приближается к 80-90 Да, то есть относятся к ДНК-полимеразам I типа, обладают 5′-3′-экзонуклеазной активностью. Недостаток этой полимеразы заключается в том, что вероятность ошибочного нуклеотида у нее достаточно высока, так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3′→5′экзонуклеазная активность).

Полимеразы Pfu и Two, выделенные изархей обладают таким механизмом, их использование уменьшает число мутаций ДНК, но скорость их работы (процессивность) ниже, чем у Tag. Сейчас применяют Tag-полимеразу + Pfu-полимеразу, чтобы добиться скорости и точности.

В момент изобретения метода КэриМуллис работал химиком-синтетиком (он синтезировал олигонуклеотиды, которые применялись для выявления точечных мутаций методом гибридизации с геномной ДНК) в компании ЦетусCorporation, которая запатентовала метод ПЦР. В 1992 году Цетус продала права на метод и патент на использование Tag-полимеразы компании Хофман-Ла Рош за 300 млн долларов. Однако, мало кто знает, что в 1980 году термостабильная ДНК-полимераза была охарактеризована советскими биохимиками (А.Калединым, А.Слюсаренко, С.Городецким).

При образовании комплекса праймер-матрица появляются условия для связывания с ним ДНК-полимеразы (двунитевая ДНК с выступающим 5′-концом является субстратом для ДНК-полимеразы).

ДНК-полимераза связывается с участком ДНК, в котором одна из цепей непрерывна (матрица), другая цепь заканчивается 3′-концом и содержит 3′-гидроксил, необходимый для продолжения цепи, куда и садится специфичный праймер.

После этого фермент в комплексе с матрицей и праймером, связывает соответствующий следующему нуклеотидному звену матрицы субстрат и

катализирует реакцию его присоединения. Субстратом для полимеразной реакции являются 4-дезоксинуклеотидтрифосфат (dNTP). Процесс удлинения ДНК можно представить в виде формулы:

$$(pdN)_n + P_3dN = (pdN)_{n+1} + PP_i ,$$

где: $(pdN)_n$ – растущаяцепьДНК;P_3dN – дезоксинуклеотидтртфосфат;

$(pdN)_{n+1}$– цепь ДНК, удлиненная на один нуклеотид;PP_i – пирофосфат.

Вывели эту химическую формулу, а также выделили первую ДНК-полимеразу А.Корнберг с сотрудниками. Открытие ДНК-полимераз легло в основу теории биосинтеза ДНК.

Химическая реакция, обеспечивающая данный процесс заключается в конденсации растущей цепи ДНК с очередным субстратом.

Следующий цикл реакции начинается с денатурации полученной ДНК (1 этап - денатурация), так как это повторение цикла, то получается в 2 раза больше молекул, на которых будут гибридизоватьсяпраймеры; 2 этап – отжиг и элонгация.

Серия повторяющихся циклов (30-40 циклов) позволяет получить накопление специфического фрагмента ДНК дляегодетекции.

Один цикл амплификации зависит от длины искомого участка. Если, например – это 50 пар нуклеотидов, то время цикла меньше; для 90 пар – в среднем цикл – 1,5 мин.

Таким образом, в результате 3-го этапа – элонгации – происходит синтез цепи ДНК.

1. При помощи Tag-полимеразы путем удлинения праймеров в направлении от 5′-конца к 3′-концу. Как правило, реакция протекает при 68-72°С, время проведения элонгации зависит от размера амплифицируемого фрагмента.

2. Образовавшееся в ходе первого цикла амплификации новые молекулы ДНК служат матрицей для второго цикла репликации ДНК, таким образом происходит экспоненциальное накопление целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси.

3. За 30-40 циклов амплификации в растворе накапливается миллионы молекул ампликона.

4. Такого количества копий достаточно для визуального обнаружения ПЦР – продукта.

Итак, в реакционной смеси для ПЦР должны присутствовать следующие компоненты:

1) ДНК-матрица – выделенная ДНК анализируемого образца, содержащая искомый специфический фрагмент.
2) Праймеры – синтетические олигонуклеотиды размером 15-30 пар нуклеотидов, комплементарные прямой и обратной цепям, определяемого фрагмента и ограничивающие его, играют ключевую роль в образовании продуктов реакции и обеспечивают чувствительность специфичность.
3) Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – смесь четырех нуклеотидных оснований «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.
4) Tag-полимераза-термостабильный фермент, катализирующий удлинение новой цепи ДНК.
5) Буферный раствор – реакционная среда, содержащая различные ионы, в том числе ионы Mg^{2+}, необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента.

Все этапы (3) амплификации денатурация, отжиг, синтез (элонгация) происходят в одном аппарате – амплификаторе, обычно это аппарат «Терцик» - регулировка происходит при помощи температурных режимов 1 этап - 93°±5°; 2. 60°±5°; 3. 72°±5°.

III этап. Детекция.

В настоящее время разделяют 3 вида ПЦР по способам детекции.

1. Классическая ПЦР с детекцией с помощью горизонтального электрофореза – амплификация и детекция разделены.
2. ПЦР в режиме реального времени «real-time» - амплификация и детекция проводится в одном аппарате, количественная оценка ДНК.
3. Детекция по конечной точке «endpoint» или «Flash» - детекция с флюорисцентной меткой после амплификации. Интенсивность флюоресцентного сигнала измеряется после окончания ПЦР в специальном флюоресцентномдетекторев закрытой пробирке, только качественная реакция.

Значение ПЦР и применение его в лабораторной практике.

Одной из важных молекулярных основ обеспечения биомедицинской безопасности в плане диагностики и мониторинга болезней является внедрение ПЦР в лабораторную практику. ПЦР основана на амплификации (многократном увеличении числа копий фрагмента ДНК-мишени в условиях invitro) и позволяет обнаружить специфический участок генома м/о. Аналитическая чувствительность тест-систем для выявления ДНК (РНК) микроорганизмов составляет $1\times10^{2(4)}$ микробных клеток или других микробных эквивалентов; специфичность – 85-100%, время выполнения анализа – 4-8 часов. Этот метод поднял лабораторную практику на новый уровень: появилась возможность прямого обнаружения инфекционного агента, не только бактерий вообще, но и трудно культивируемых форм микробов: некультивируемых форм бактерий; более быстрое обнаружение медленно растущих форм бактерий, таких как, например, туберкулез, вирусов, хламидий, ПЦР позволяет выявить в генетическом материале даже единичную мутацию.

ПЦР была открыта в 1984 г. американским биохимиком КериМюллисом, который впервые показал возможность амплификации кратного увеличения числа копий участков ДНК в пробирке. В 1993 г. за это открытие Мюллис был удостоен Нобелевской премии. Синтез копий молекул ДНК invivo (полимеразная реакция) происходит в организмах во время клеточного деления. Копирование ДНК осуществляют ферменты – ДНК-полимеразы.ПЦР – это получение множества копий специфического фрагмента ДНК в процессе invitro.

Препарат ДНК, который необходимо копировать может быть очищенным или находиться в составе сложной смеси биологических веществ. В качестве источника ДНК используют экстракт ткани, человеческий волос, каплю крови, образцы от мумий, даже от тех, которые пролежали в вечной мерзлоте сотни лет, используется в палеонтологии.

В настоящее время ПЦР широко используется в различных областях, например, в пищевой промышленности для оценки качества пищевых продуктов. Этот метод незаменим во время эпизоотий и эпидемий, для исследования различных проб из объектов окружающей среды (мониторинг), а также для получения рекомбинантных вакцин (как субъединичных, ДНК-вакцин).

В медицине и ветеринарии ПЦР используется для диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы, наследственных болезней, онкологических заболеваний, дифференциальной диагностики и генотипирования, для оценки эффективности лечения различных заболеваний. В трансплантологии при помощи ПЦР проводят обследование доноров или донорских органов, контролируют безопасность донорской крови и её компонентов, препаратов плазмы.

Таким образом, фундаментальные исследования в области молекулярной медицины, в основе которой лежат биохимические процессы живых

организмов, патогенез заболеваний создают базу для разработки средств диагностики, вакцин и лекарственных препаратов, необходимых для обеспечения биологической безопасности.

Модуль 9. Прогнозирование индивидуального риска сердечнососудистых заболеваний.

1. Причины заболеваний ССС.
2. Основные задачи молекулярной медицины.
3. Понятие о моногенных заболеваниях. Примеры наследственных моногенных заболеваний
4. Сдвиги в организме, свидетельствующие о наличии заболевания.
5. Дефекты передачи внутриклеточной информации и риск ИБС. Роль гиперхолестеринемии.
6. Предпосылки создания статинов. Их роль в снижении заболеваемости и смертности от ИБС.
7. Эндотелиальная дисфункция и развитие ИБС. Роль $NO^{\bullet}$.
8. Причины развития инфаркта миокарда.
9. Современные подходы к исследованию генетической основы заболеваний ССС.
10. Показатели, используемые в генодиагнорстике заболеваний ССС. Их роль в мониторинге заболевания.
11. Функции апобелка Е, полиморфизм его гена. Клиническое значение оценки его состояния.
12. Сложности диагностики предрасположенности к заболеваниям ССС.

Быстрое развитие современных биотехнологий позволило во многих случаях решить вопрос о вкладе наследственности в возникновение заболевания, определив в качестве непосредственной причины болезни изменения

нуклеотидной последовательности ДНК, выявить первичные биохимические дефекты, позволившие найти подходы к этиологической терапии. Возникло принципиально новое направление – молекулярная медицина, основывающееся на индивидуальности генома каждого человека (индивидуальная – персонифицированная - медицина) и возможности исследования генетических особенностей в любом возрасте, задолго до клинического проявления заболевания (предиктивная – предсказательная - медицина).

Сердечно-сосудистые заболевания рассматриваются как цепь событий, вызванных многочисленными факторами риска, связанными и не связанными между собой, прогрессирующие через многочисленные физиологические метаболические пути и приводящие в конечном счете к развитию заболевания сердца и сосудов (6). Постоянное накопление информации о патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы привело к пониманию того, насколько значительную роль в их развитии играют генетические факторы.

К настоящему времени описано около 2500 моногенных наследственных синдромов, при которых наблюдается вовлечение в патологический процесс сердца и/или сосудов (50). Моногенные заболевания – это заболевания, для развития которых достаточно наличия мутации в одном гене, в этих случаях работают законы менделевской генетики. Известно около сотни наследственных заболеваний, при которых поражение сердца и сосудов является ведущим в клинической картине. Все большее число моногенных форм, которые наследуются по менделевскому типу, вычленяются из общей структуры таких классических мультифакториальных заболеваний, как ИБС и АГ. Наиболее распространёнными примерами наследственных моногенных заболеваний ССС служат:

- семейнаягиперхолестеринемия (мутации в генах LDLR, APOB, PCSK9)

- синдром удлиненного интервала QT (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, ANKB, KCNE1, KCNE2, KCNJ2)
- синдром укороченного интервала QT (KCNQ1, KCNH2)
- синдромБругата (SCN5A)
- гипертрофическая кардиомиопатия (MYHCB, TNNT2, TPM1, MYBPC3, PRKAG2, TNNI3, MYL3, TTN)
- дилатационнаякардиомиопатия (более 20 локусов)
- синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта (PRAKG2)
- семейная форма синдрома слабости синусового узла (SCN5A)
- семейная форма фибрилляции предсердий (KCNQ1) (13, 51)

Выявление мутации в конкретном гене напрямую свидетельствует о наличии заболевания, независимо от степени выраженности клинических симптомов и даже при их отсутствии. По данным Prioryetal., около 30% больных с синдромом удлиненного интервала QT имеют скрытое течение заболевания, при котором отсутствуют характерные изменения на ЭКГ.

Способность идентифицировать гены, полиморфные варианты которых приводят к развитию заболеваний, привела к значимому прогрессу в развитии создания лекарств. Более чем 30 лет назад была выявлена связь между развитием семейной гиперхолестеринемией и ЛПНП-рецепторов при изучении фивробластов больных данной паталогией (8, 25). Исследование продемонстрировало, что в фибробластах с дефектным ЛПНП-рецептором повышалась активность 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А (HMGCoA) редуктазы, участвующей в синтезе холестерина. Высокий риск ИБС у больных семейной гиперхолестеринемией вместе с растущим количеством эпидемиологических данных о связи ЛПНП с ИБС утвердил мнение о том, что HMG-CoA-редуктазу можно рассматривать как мишень для антиатеросклеротического лекарственного препарата. Это привело к созданию статинов (ингибиторов HMG-CoA-редуктазы), которые позволяют уменьшить заболеваемость и смертность от ИБС на 30% (5).

В патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний одним из наиболее ранних событий предполагается развитие эндотелиальной дисфункции. Эндотелиальная дисфункция, возникающая вследствие воздействия повреждающих факторов, приводит к компенсаторному ответу, что изменяет нормальные гомеостатические свойства эндотелия. Эндотелий представляет собой источник многих факторов и модуляторов клеточного роста, действующих преимущественно на ГМК, а также агентов, регулирующих сосудистый тонус, главным образом оксида азота, простациклина и эндотелина. Дисфункция сосудистого тонуса включает сниженное эндотелий-зависимое расслабление и парадоксальную вазоконстрикцию вследствие прямой инактивации оксида азота избыточной продукцией свободных радикалов, сниженной транскрипции мРНК и снижения активности эндотелиальной NO-синтазы (78). Снижение доступности оксида азота сопровождается повышением адгезии тромбоцитов, усилением синтеза ингибитора активатора плазминогена и снижением уровня тканевого активатора плазминогена, повышением экспрессии тканевого фактора, снижениеим уровня тромбомодулина и изменениями в протеогликанах. В патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и формировании эндотелиальной дисфункции важную роль отводят оксидантному стрессу. Оксидантный стресс играет ключевую роль в патогенезе артериальной гипертонии, кардиомиопатии, атеросклероза, ИБС, клапанных поражений и застойной сердечной недостаточности.

В настоящее время считается доказанным, что причиной развивающегося инфаркта миокарда и острого коронарного синдрома является внутрикоронарный тромбоз, возникающий, как правило, на месте имеющейся атеросклеротической бляшки с поврежденной поверхностью.

Атеросклеротическая бляшка является основным элементом атеросклероза. Начальные стадии ее образования связаны с накоплением липидов в макрофагах и в свободном состоянии в тканях, с пролиферацией

гладкомышечных клеток и образованием коллагена. Вследствие этих процессов образуется атеросклеротическая бляшка с ядром, в котором содержатся внеклеточные липиды. Ядро заключено в фиброзную соединительнотканную капсулу. Помимо свободного холестерина в ядре содержатся пенистые клетки – наполненные липидами макрофаги. Макрофаги разрушаются, и их липидное содержимое увеличивает ядро бляшки. Форма и состав атеросклеротических бляшек определяют прогрессирование коронарной болезни сердца.

При анализе летальных исходов от тромбоза коронарных артерий установлено, что только в 25% случаев тромбоз связан с эрозией эндотелия, а в остальных – с разрывом бляшек (32, 42).

За последние 15 лет сформировалось 2 подхода к исследованию генетической основы мультифакториальных сердечно-сосудистых заболеваний:

- анализ генов-кандидатов на роль прогностических маркеров ССЗ
- GWA-исследования (полногеномный скрининг аллельных ассоциаций)

В основе обоих методов лежит выявление полиморфизма генов (SNP) (12).

Из наследственных факторов наиболее охарактеризованы аномалии обмена атерогенных липопротеидов, ускоряющие развитие атеросклероза. Кроме того, накапливаются данные о существовании дополнительных генетических механизмов сердечно-сосудистых заболеваний, не связанных с обменом холестерина. Так, в развитие АГ весомый вклад вносит полиморфизм генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (в частности, генов ангиотензиногена и рецепторов к ангиотензину), а также полиморфизм генов различных регуляторных факторов (например, гена NO-синтазы). Для развития ИБС могут быть важны генетически обусловленные вариации активности белков, вовлеченных в патогенез атеросклероза и его осложнений, в том числе участвующие в процессах активации эндотелия,

развитии воспалительных реакций, регуляции миграции и пролиферации гладкомышечных клеток, а также связанные с коагуляцией и фибринолизом.

В программу генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний могут быть включены наиболее изученные гены, влияние полиморфизма которых на развитие сердечно-сосудистых заболеваний неоднократно подтверждено в различных исследованиях, в том числе и на российской популяции. Это полиморфизм генов, кодирующих белки свертывающей и противосвертывающей системы крови: полиморфизм G1691A гена V фактора, полиморфизм R353QVII фактора, полиморфизм V34LXIII фактора свертывания крови, G20210A полиморфизм протромбина и 4G/5G полиморфизм ингибитора активатора плазминогена 1 типа; полиморфизмгеновтромбоцитарных рецепторов гликопротеина Ia (C807T) и гликопротеина IIIa (PLA1/PLA2); генов, кодирующих белки ренин-ангиотензин-альдостеро-новой системы: инсерционно-делеционный полиморфизм ангиотензинпревращающего фермента (I/D), два аллельных варианта гена ангиотензиногена (M235T и (-6) G/A); полиморфизм генов, связанных с дисфункцией эндотелия: эндотелиальной NO-синтазы (G894T), p22-phox субъединицы NADPH-оксидазы (C242T), метилентетрагидрофолатредуктазы (C677T) и белка, образующего щелевые контакты в эндотелии сосудов, - коннексина 37 (C1019T). Использование указанных генетических маркеров в качестве предикторов раннего развития АГ, атеросклероза и их осложнений представляет большой практический интерес, поскольку позволяет обнаружить предрасположенность к заболеванию на доклинической стадии и своевременно провести профилактические мероприятия.

Основной функцией аполипопротеина Е (ApoE) является обеспечение захвата липопротеидов тканями для поддержания трофики и обеспечения баланса между системами переноса липидов и их потребителями – тканями человеческого организма.Во всех тканях имеются рецепторы ApoE/B-100 а кооперативный лигандApoE/B-100 играет роль «ключа», благодаря которому

ЛПНП узнается тканями и захватывается. После этого рецептор подвергается эндоцитозу и деградации в лизосомах, что приводит к высвобождению содержимого ядра липопротеидов, которое затем усваивается клеткой.

Полиформизм гена

Ген APOEкартирован на 19 хромосоме и включает 4 экзона и 3 интрона, состоящие из 3597 пар оснований. Полиморфизм этого гена определяет носительство той или иной изоформыApoE. Изоформа белка ApoE определяется двумя заменами нуклеотидов в позициях 2903 и 3041 гена APOE. Эти изменения приводят к аминокислотным заменам в позициях 112 и 158 белка ApoE, которые меняют аффинитет ApoE к его рецептору. Эти замены и их сочетания были названы аллелями ε2, ε3 и ε4, а изоформы белка назвали E2, E3 и E4 соответственно.

Клиническое значение

В настоящее время показано, что носительство аллели ApoE ε4 является фактором, повышающим риск развития ряда заболеваний, в частности ИБС и болезни Альцгеймера. Это напрямую связано с механизмом действия белка ApoE, а также может быть связано и с влиянием данного фактора на эффективность проводимой профилактики и лечения.

Протективная роль ε2 в отношении развития ИБС и её осложнений, была показана во многих популяциях, в том числе и в группе афро-американцев и белых жителей центральной Европы. Относительно влияния на развитие острого коронарного синдрома существуют данные о том, что у лиц без сахарного диабета носительство ε2 и ε4 аллели может быть предрасполагающим фактором развития коронарных событий.

Заболевания ССС не относятся к разряду моногенных, и с этим связана сложность диагностики предрасположенности к ним. В отличие от классических генетических болезней, таких как фенилкетонурия или гемофилия, заболевания ССС, за исключением редких случаев, не возникают вследствие мутации в одном гене и не наследуются по менделевским законам. Причиной этого является описанное выше сложное взаимодействие

различных систем организма, играющих роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, на развитие сердечно-сосудистых заболеваний оказывают значительное влияние негенетические факторы (курение, возраст, уровень холестерина и глюкозы крови), что приводит к сложным взаимодействиям «ген-среда».

Рекомендованная литература

1. Лебедев А.Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов / А.Т. Лебедев, К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина. – М.: Техносфера, 2012. – 1976 с.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. / Под Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. - М.: Шико, 2013. – 560 с.
3. Руководство по медицинской микробиологии / под ред.: А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. – М.: БИНОМ, 2010 – 1152 с.
4. Ганин В.С. По тропам эпидемических катастроф / В.С. Ганин. – Иркутск: НЦРВХ СО РАМН, 2011. – 424 с.
5. Онищенко Г.Г. Биологическая безопасность: учебник. / Г.Г. Онищенко, М.А. Пальцев, В.В. Зверев [и др.]. – М.: Медицина, – 2006. – 304 с.
6. Биологическая химия: учебник / под ред. С.Е. Северин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
7. Биохимия человека: учебник / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэл М.: Мир; БИНОМ, 2009.
8. Биохимия мышечной ткани / З.И. Микашинович, О.Г. Саркисян, Т.Д. Коваленко [и др.] – Ростов-н/Д. 2013.
9. Определение индивидуального генетического риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Метод.пособие по молекулярной генетике / Андреенко Е.Ю., Балацкий А.В. [и др.] – М.: Из-во МГУ, 2010.
10. Л.М. Самоходская, В.М. Бочков, А.В. Воротников, В.А. Ткачук. – Практикум по общей биохимии и молекулярной биологии / М.: Из-во МГУ, 2011.