ОТ ГЕНОВ К ПРИЗНАКАМ

План

1. Введение

2. Наследственные нарушения метаболизма у человека (исследования Гэррода);

3. Нейроспора как генетический объект;

4. Гипотеза «1 ген – 1 фермент».

5. Ген – фермент – биохимическая реакция.

1. Введение

После переоткрытия в 1900 законов Менделя году актуальными стали следующие вопросы:

1. **Как генотип контролирует развитие признаков?**
2. **Какова природа вещества наследственности?**

Феномен взаимодействия генов показал, что многие признаки, контролируются не одним, а целым набором генов. И наоборот, один и тот же ген нередко влияет на целый комплекс признаков (**плейотропия**).

В начале XX века стала ясна ведущая роль белков, особенно – ферментов, в осуществлении всех реакций в организме. Изучение причин ряда наследственных заболеваний человека на биохимическом уровне показало, что эти заболевания обусловлены дефектами некоторых ферментов.

2. Наследственные нарушения метаболизма у человека (исследования Гэррода);

2.1. Врождённые ошибки метаболизма

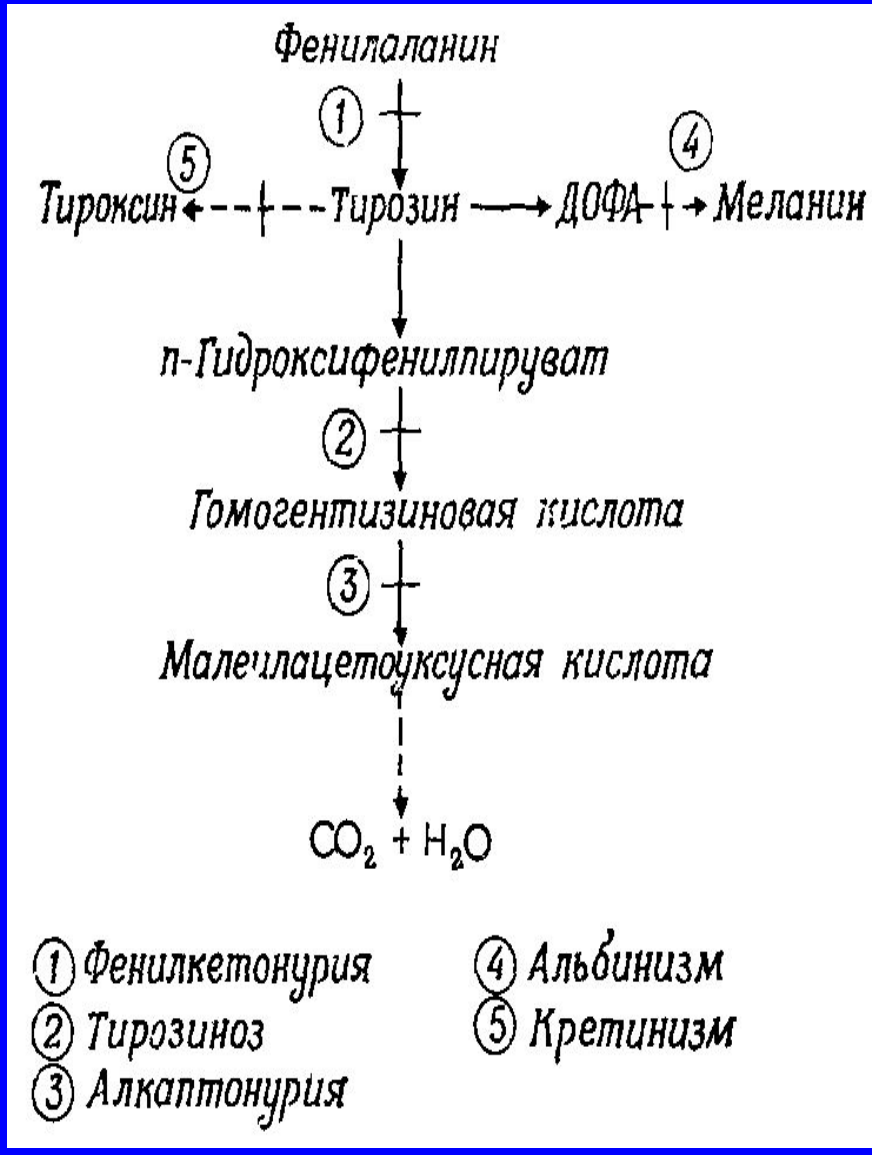
В 1902-09 гг. А. Гэррод показал, что причиной **алкаптонурии** (одной из форм артрита) является нарушение метаболизма ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина. Больные выделяют с мочой гомогентизиновую кислоту (алкаптон), которая вызывает почернение мочи под действием воздуха. **При повышении содержания фенилаланина и тирозина в пище количество гомогентизиновой кислоты в моче увеличивается.**

Гэррод предположил, что у больных алкаптонурией отсутствует, или не активен фермент, необходимый для метаболизма гомогентизиновой кислоты.

Генетики Бэйтсон и Прюнет показали, что болезнь наследуется по моногенному типу: больные - всегда гомозиготы по рецессивному аллелю *(аа)*; у гетерозигот (Аа) и у людей, гомозиготных по доминантному аллелю *(АА),* признаков болезни не наблюдалось.

В 1914 г. было показано, что у больных алкаптонурией отсутствует активность фермента - оксидазы гомогентизиновой кис-лоты, которая превращает гомо-гентизиновую кислоту в мале-илацетоуксусную (рис.1).

- **Рис. 1. Наследственные нару-шения метаболизма фенила-ланина и тирозина у человека**



Впервые было показано, **что мутация гена вызывает дефект фермента**. Гаррод назвал такие болезни «врожденными ошибками метаболизма».

3. Neurospora crassa – объект биохимической генетики

В 30-х гг. XX в генетики хорошо понимали, что гены участвуют в регуляции определенных реакций либо непосредственно, либо определяя активность соответствующих ферментов. Основной объект генетиков - дрозофила - не была удобна для изучения работы генов. У высших организмов связь между генотипом и фенотипом является очень сложной, метаболические нарушения, вызываемые мутациями генов, обнаружить трудно. Для изучения биохимических мутаций необходим объ-ект, позволяющий исследовать влияние генов на совершенно оп-ределенные биохимические реакции. Для этого Бидл и Татум из-брали плесневый гриб – нейроспору - ***Neurospora crassa,***

Этот гриб может расти на минимальной среде, содержащей источник углерода (сахарозу), азота, неорганические соли, и витамин биотин, На этой среде гриб синтезирует все необходимые соединения: углеводы, жиры, белки, азотистые основания, витамины и др.

Принципы подхода Бидла и Татума

- Бидл и Татум предположили, что обработка рентгеновскими лучами вызовет мутации в генах, отвечающих за определенные реакции.
- Если в результате такой мутации гриб потеряет способность синтезировать какое-либо вещество, то он не сможет расти на синтетической среде, если в нее не будет добавлено соответствующее вещество.
- Бидл и Татум считали, что этот принцип можно применять для изучения различных метаболических процессов.

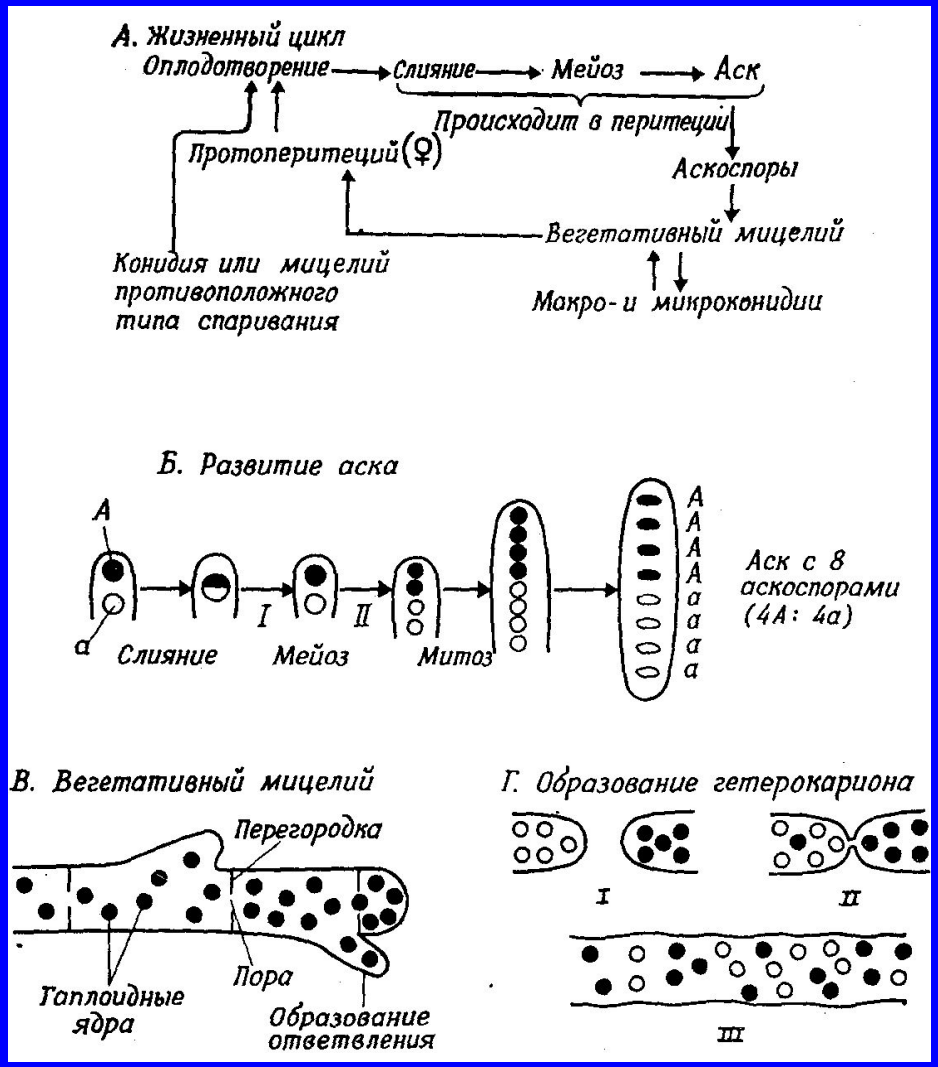
Чтобы понять принципы исследований Бидла и Татума рассмотрим особенности жизненного цикла нейроспоры (рис.2,А).

Рис. 2. Жизненный цикл *Neurospora crassa*

Мицелий гриба растет на твердой питательной среде в виде сплетения гиф. В многоядерных гифах на определенных расстояниях расположены перегородки, имеющие по-ры, через которые могут про-ходить ядра (рис.2,В). Ядра мицелии гаплоидные.

Мицелий образует конидиеносцы, от которых отпочковываются одноядерные конидии.

Нейроспора может размножаться как вегетативным, так и половым путём. Спаривание



ми противоположных типов спаривания. Тип спаривания контролируется двумя аллелями, А и а в одной из хромосом.

Культуры обоих типов спаривания образуют женские органы размножения - **протоперитеции**; они могут быть оплодотворе-ны при любом контакте с конидией противоположного типа спаривания. Образуется диплоидная клетка зиготы, которая претерпевает последовательность митотических делений и образует много одинаковых диплоидных ядер внутри общего **перитеция.** Эти диплоидные ядра вступают в мейотическое деление и образуют отдельные **аски** (рис.2,Б). В каждом аске образуются четыре гаплоидных ядра, которые ещё один раз делятся митозом и образуют **гаплоидные аскоспоры.** Всего в каждом аске образуется восемь аскоскпор. Аскоспоры можно выделить из каждого аска отдельно и проанализировать сегрегацию генетических маркеров.

В обычных условиях все ядра в гифах имеют один и тот же генотип (рис.2,В). Гифы с ядрами разных генотипов, выросшие совместно на питательной среде, могут сливаться и образовывать **гетерокарион** (рис.2,Г), в цитоплазме которого будут взаимодействовать продукты генов обоих штаммов. Эту систему можно использовать для изучения взаимодействия различных генотипов в общей цитоплазме.

Для генетического анализа удобны следующие особенности нейроспоры:

а) **гаплоидность** так как мутации сразу же экспрессируются;

б) возможность, изучать биохимические мутации;

в) **образование гетерокарионов**, позволяет иссле-довать взаимодействие изучаемых генов в общей цитоплазме;

г) **возможность выделенияи анализа продуктов мейоза** – отдельных аскоспор;

д) **быстрый рост и цикл воспроизводства,** который длится 14 дней;

е) **способность расти на искусственных средах.**

Исследования ауксотрофных мутантов Neurospora crassa

Для повышения частоты мутаций споры облучали рентгеновскими лучами и проращивали их на полной питательной среде (рис.3). Споры, выдержавшие облучение, образовывали колонии. Фрагменты гиф от этих колоний пересаживали на минимальную среду. Из 2000 проверенных колоний три не смогли расти на минимальной среде (такие мутанты называются **ауксотрофными**), но могли расти при добавлении в среду одного из недостающих инградиентов: один нуждался в пиридоксине, второй — в пантотенате, третий — в n-аминобензойной кислоте. Генетическую природу мутаций, вызвавших потребность в том или ином веществе, исследовали, скрещивая мутант с грибом дикого типа и анализируя продукты мейоза (рис.4). Соотношение ауксотрофности - прототрофности среди аскоспор, равное **4 : 4**, соответствовало сегрегации двух аллелей одного гена. Тем самым доказывалась генетическая обусловленность ауксотрофности.

Рис. 3. Метод выявления ауксотрофных мутаций

Конидии облучают (для увеличения частоты мутаций), проращивают на полной среде, скрещивают со штам-мом дикого типа. На полной среде проращивают гаплоидные споры. От полученной культуры делают отвивки на минимальную среду. Отсутствие роста на минимальной среде свидетельствует о возникно-вении мутации. Для выяснения природы мутации испытуемый штамм высевают на минимальные среды с теми или иными питатель-ными добавками (аминокислоты, витамины и др.). В представленном примере мутантный штамм является ауксотрофом по пантотеновой

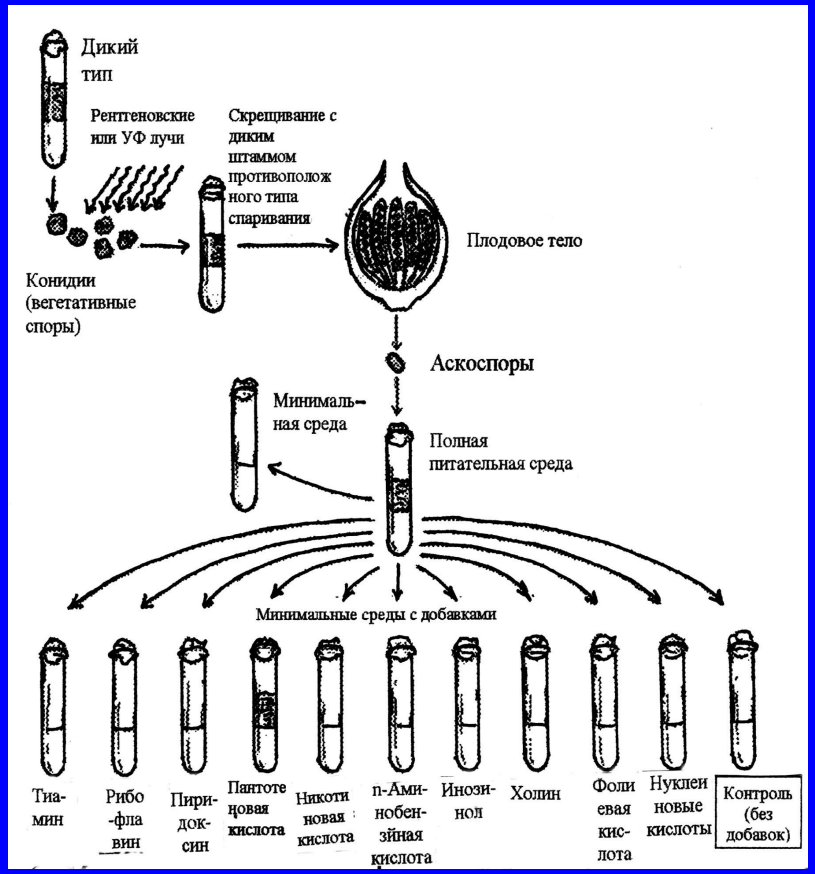
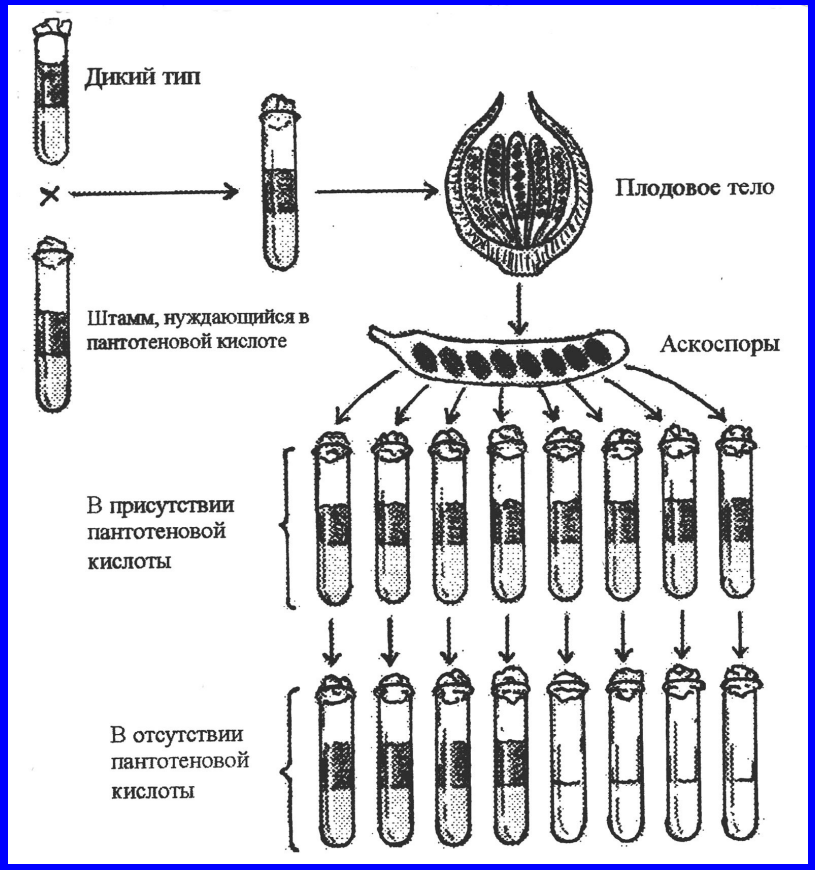


Рис.4. Доказательство генетической природы ауксотрофности мутанов *Neurospora.*

Мутантный штамм, выявленный как показано на рис. 3, скрещивают со штаммом дикого типа. Полученные гаплоидные споры высевают на минимальную среду. При этом оказывается, что соотношение прототроф : ауксотроф равно 4:4, что соответствует расположению продуктов мейоза, т.е. спор в аске (рис. 2). Это подтверждает, что ауксотрофность является следствием генетической мутации. *(Айала, Кайгер, 1988).*



- Бидл и Татум получили много разных мутантов, у которых были нарушены разные этапы биосинтеза того или иного вещества. К 1946 г. Бидл и его сотрудники установили шесть групп сцепления у *Neurospora* и получили мутантных штаммов, нуждающихся в аминокислотах, витаминах, пуринах, пиримидинах и холине. Генетический дефект индивидуальных мутантов во всех случаях соответствовал мутации в одном гене.
- Самый важный вывод из работы с *Neurospora*— это **наличие соответствия между генами и биохимическими процессами.**
- Поскольку большинство мутантов были чувствительны к отсутствию только какого-то одного соединения, проще всего было предположить, что один ген определяет специфичность одного фермента. Эту гипотезу **«один ген один – фермент»** впервые со всей определенностью сформулировал Бидл в 1945 г.
- Вскоре были обнаружены исключения из этого правила. Например, один

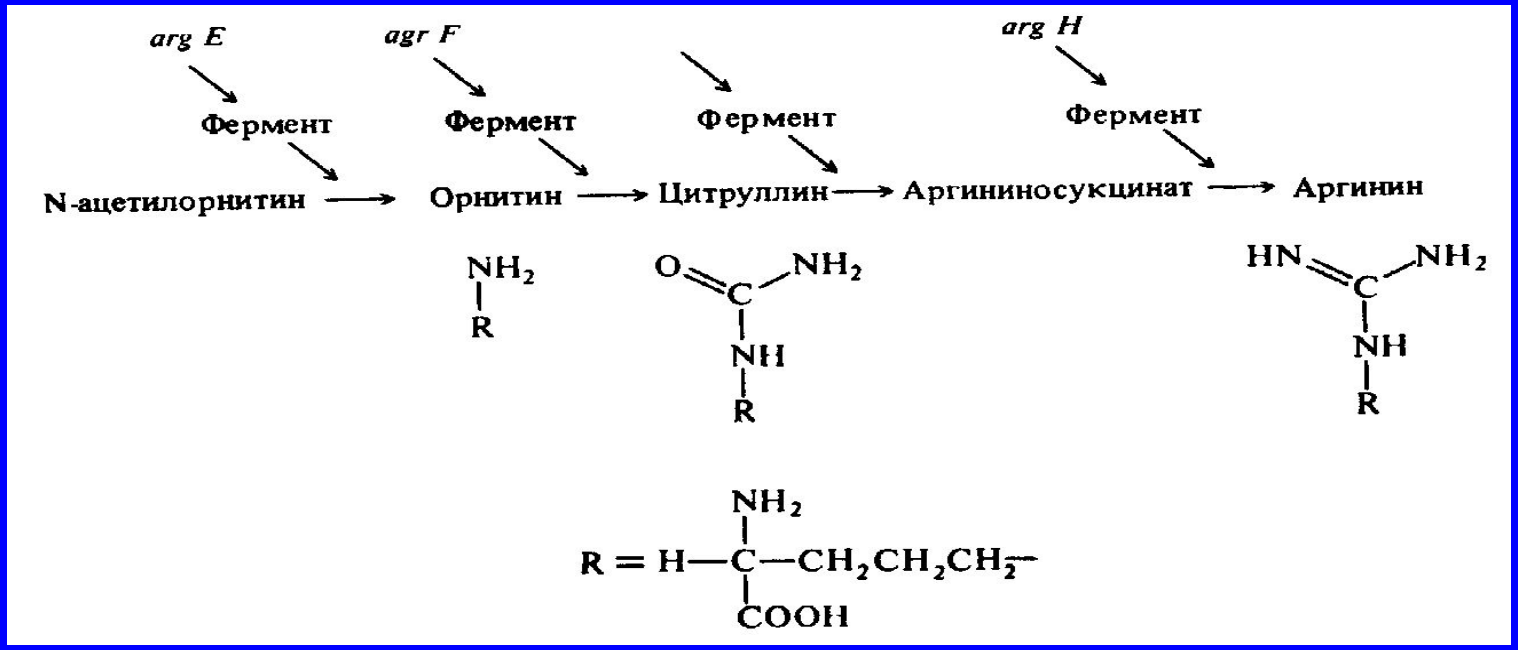
мутант *Neurospora* проявлял потребность одновременно и в метионине и треонине, хотя наследовалась эта двойная потребность, так, как если бы она была обусловлена мутацией в одном гене. Оказалось, что первичное

5. Ген – фермент - биохимическая реакция

Различные ауксотрофные штаммы, требующие для своего роста добавки одного и того же вещества, не обязательно являются мутантами по одному и тому же гену. Так, все три мутанта *Neurospora* (табл.), могут расти на среде с добавкой аргинина. Но мутант 2 может расти также на минимальной среде с цитруллином, а мутант 1 растёт и на аргинине, и на цитруллине, и на орнитине. Следовательно, второй мутант может синтезировать аргинин при наличии в среде готового цитруллина, а первый мутант способен также синтезировать аргинин из орнитина. Это объясняется тем, что биосинтез трёх веществ происходит в одной и той же цепи биохимических превращений (рис.5).

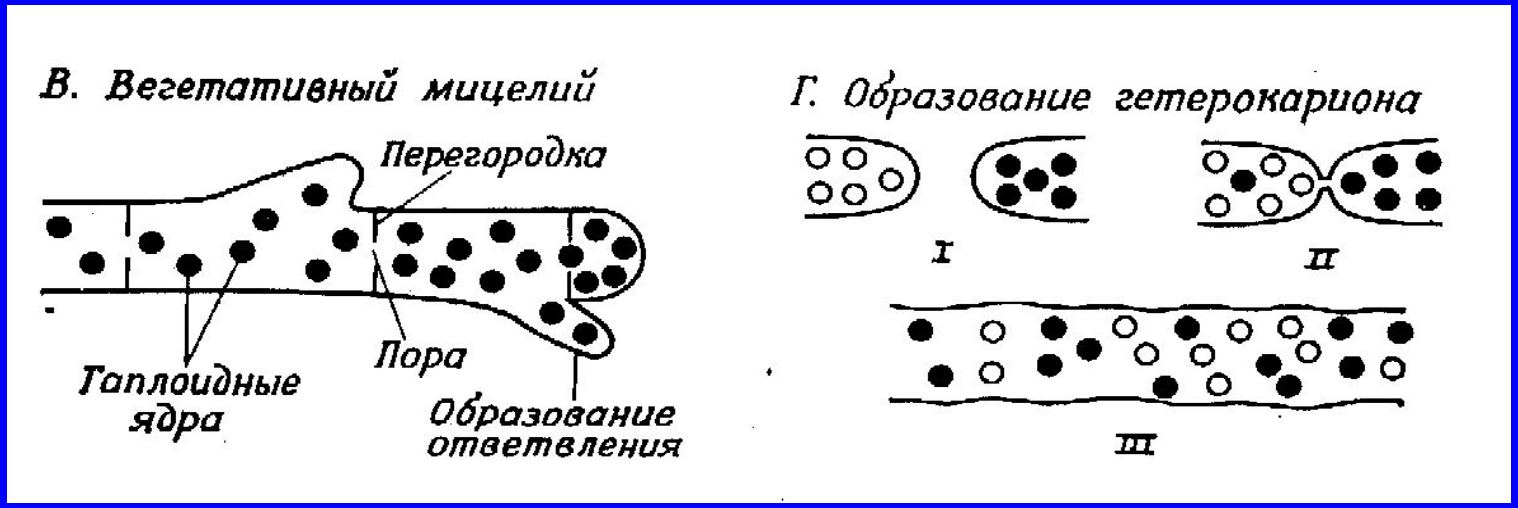
Мутант	Вещество, необходимое для роста
1	Аргинин, цитруллин или орнитин
2	Аргинин или цитруллин
3	Аргинин-Аргининсукцинат-Аргинин

Рис. 5. Цепь синтеза аргинина. Показаны этапы, на которых происходит блокирование синтеза в результате мутаций соответствующих генов



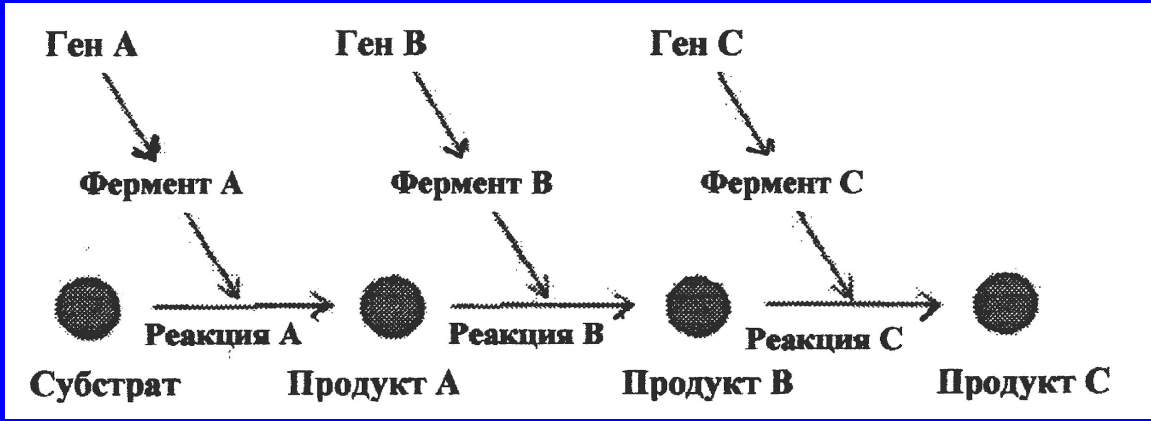
Мутация в гене *argE* блокирует образование орнитина. Этот блок можно обойти, добавив в среду орнитин, цитруллин или аргинин. Мутацию в гене *argF*, блокирующую превращение орнитина в цитруллин, добавкой орнитина компенсировать нельзя, её можно «исправить» добавлением как аргинина, так и цитруллина. Мутант по гену *argH* может расти только на среде с аргинином.

Таким образом, ауксотрофы по аргинину могут иметь разные генетические причины, т.е. обусловлены мутациями разных генов.



Способность нейроспоры образовывать гетерокарионы – позволяет определить число генов, контролирующих синтез того или иного вещества. Число этих генов должно быть равно числу разных ауксотрофных мутаций. Для этого разные штаммы, ауксотрофные по исследуемому веществу, выращивали совместно. В местах контакта между гифами происходит их слияние. Образуется гетерокарионы – гифы, содержащие ядра обоих штаммов (рис.6).

Рис. 7. Гипотеза «1 ген – 1 фермент». Каждый ген контролирует работу одного фермента. Мутация в любом из генов приводит к образованию «дефектного» фермента, прерывая, тем самым цепь метаболических превращений



Если штаммы несут мутации различных генов, то гетерокарионы приобретают способность расти на минимальной среде. Если же исходные штаммы несут мутации одного и того же гена, то гетерокарион так и останется ауксотрофным. Такой способ анализа называется ***комплементационным*** – разные мутантные штаммы компенсируют дефекты мутантных генов в гетеракарионе. Таким способом было установлено, что у нейроспоры биосинтез аргинина контроли-руют семь различных генов. Смысл гипотезы «1 ген – 1 фермент» можно представить схемой (рис.7).

Заключение

В настоящее время мы знаем, что теория «один ген — один фермент» была упрощением: не все гены кодируют ферменты, а некоторые ферменты являются продуктами более чем одного гена. Точнее было бы сказать, что один ген определяет синтез одного первичного продукта. Тем не менее, к началу 50-х годов стало ясно, **что в генах закодированы ферменты**.

Самой неотложной задачей стало изучение природы гена и идентификация генетического материала.

Вопросы и задания

I. Перерисуйте в тетрадь схему метаболизма аминокислот (рис.1) и ответьте на следующие вопросы:

1. Нарушение каких этапов метаболизма приводят к: алкаптонурии? К альбинизму? К фенилкетонурии?
2. Почему у больных фенилкетонурией обычно светлые волосы?

II. Какие особенности нейроспоры позволили обосновать гипотезу «1 ген – один фермент»?

III. Напишите определения понятий: прототроф, ауксотроф, минимальная среда, селективная среда.

IV. Что такое комплементационный анализ? Как с его помощью можно узнать, обусловлен одинаковый мутантный фенотип разных штаммов одним и тем же геном или разными (неаллельными) генами?

V. Нарисуйте схему, поясняющую смысл гипотезы «1 ген – один фермент».