

Лекция 1

**Определение предмета
«Молекулярная
биология».**

Этапы развития.

Основные открытия

Молекулярная биология возникла во второй половине XX в.

Название науки чаще всего связывают с именем **Уильяма Эстбюри** (William Astbury) (1939).

Получил первую рентгенограмму ДНК, впервые выявленную **Фридрихом Мишером** (1869г.).

Первое официальное упоминание о молекулярной биологии, как новом направлении современной биологии, которое интегрировало усилия биологов, химиков и физиков в области изучения объектов живой природы, принадлежит **Уоррен Уиверу**, руководившему отделом естественных наук Рокфеллеровского фонда (1938)

Центром молекулярно-биологических исследований стали работы в области изучения материальных основ наследственности, природы генов и механизмов передачи наследственных признаков из поколения в поколение.

Основополагающие открытия молекулярной биологии

1869 – Ф. Мишер впервые выделил ДНК из лейкоцитов и молок лосося.

1935 – А.Н. Белозерский выделил ДНК из растений.

1939 – В.А. Энгельгардт открыл АТФазную активность миозина.

1939 – У. Эстбюри получил первую рентгенограмму ДНК.

1944 – О.Т. Эвери установил, что ДНК (а не белок, как полагали ранее) является носителем генетической информации.

1951 – Л. Полинг и Р. Кори обосновали существование основных типов укладки аминокислотных остатков в полипептидных цепях белков (α -спираль и складчатый β -слой).

1953 – Джеймс Уотсон и Френсис Крик создали модель двойной спирали ДНК на основе рентгенограмм, полученных Розалинд Франклин (Rosalind Franklin) и Морисом Уилкинсом (Maurice Wilkins).

1953 – Фредерик Сенгер расшифровал первичную структуру инсулина быка.

К началу 50х годов XX в. были получены фундаментальные данные об элементарном строении белков, нуклеиновых кислот, включая сведения о способах организации полипептидных цепей белков, и о структуре нуклеотидов и закономерностях их количественного содержания в молекулах ДНК и РНК (**Эрвин Чаргафф**).

Кроме указанных, биофизические исследования структуры ДНК, выполненные в Англии методом рентгеноструктурного анализа **Розалинд Франклин** и **Морисом Уилкинсом** подвели **Джеймса Уотсона** и **Френсиса Крика** к раскрытию молекулярной природы генов и механизма их воспроизведения (репликации) в составе ДНК.

1956 – А. Корнберг (Arthur Kornberg) открыл **ДНК-полимеразу**.

1957 – А.Н. Белозерский и А.С. Спирин предсказали существование **мРНК**.

1960 – Дж. Кедрию впервые описал трехмерную структуру миоглобина кашалота, а М. Перутц – **структуру гемоглобина**.

1960 – одновременно в нескольких лабораториях был открыт фермент транскрипции – **РНК-полимераза**.

1961 – Ф. Жакоб (Francois Jacob) и Ж. Моно (Jacques Monod) разработали модель **оперона**, установили механизм регуляции генов.

1965-1967 – Р. Холли выяснил первичную структуру аланиновой **тРНК**, А.А. Баев – валиновой тРНК.

1966 – М. Ниренберг (Marshall Warren Nirenberg), Х.-Г. Корана (Har Gobind Khorana), Р.У. Холли (Robert William Holley) (1968), С. Очоа (Severo Ochoa de Albornoz) **расшифровали генетический код**.

1967 – М. Геллерт открыл **ДНК-лигазу** – фермент, способный соединять фрагменты ДНК.

1970 – Г. Темин и Д. Балтимор открыли обратную транскриптазу (РНК-зависимую ДНК-полимеразу) в онкогенных вирусах.

1972 – П. Бозр, С. Коэн и П. Берг разработали технологию клонирования ДНК, заложили **основы генетической инженерии**.

1972 – Х.-Г. Корана осуществил химический синтез гена аланиновой тРНК.

1975-1977 – Ф. Сенгер, а также А. Максам и У. Гилберт разработали методы быстрого определения первичной структуры ДНК.

1976 – Ф. Сенгер расшифровал нуклеотидную последовательность ДНК фага φX-174.

1976 – У. Гилберт открыл мозаичное строение генов эукариот.

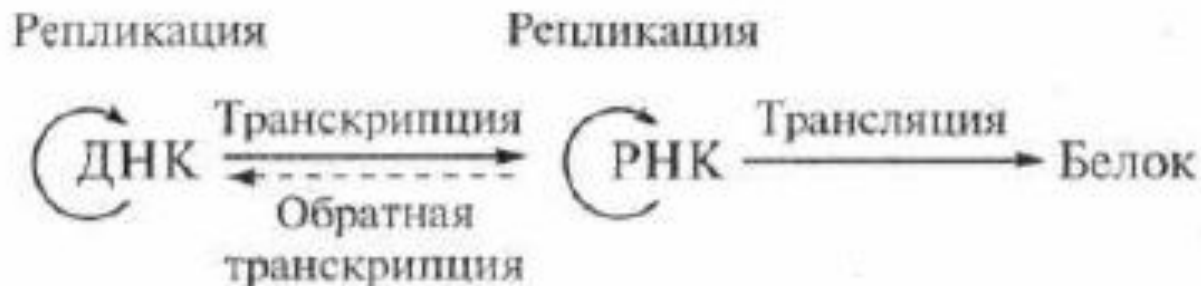
1976 – С. Ким, А. Рич, А. Круг определили **третичную структуру тРНК**.

В середине 60х годов XX в. окончательно утвердился **основной постулат молекулярной генетики**, формулирующий магистральный путь реализации генетической информации в клетке:

ДНК → РНК → Белок

Изучались механизмы воспроизведения (репликации) ДНК, транскрипции (биосинтеза РНК) и трансляции (биосинтеза белка).

Постулат дополнен представлениями о существовании процесса **обратной транскрипции** (о биосинтезе ДНК на матрице РНК) и **репликации РНК**:



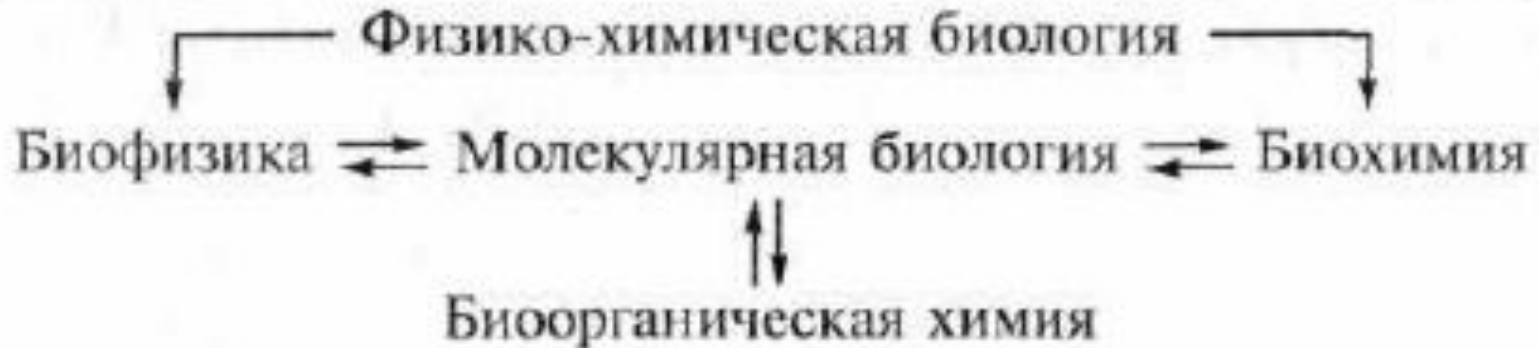
«**Молекулярная биология** изучает связь структуры биологических макромолекул и основных клеточных компонентов с их функцией, а также основные принципы и механизмы саморегуляции клеток, которые опосредуют согласованность и единство всех протекающих в клетке процессов, составляющих сущность жизни»

(Дж. Уотсон, 1968 г.).

Детализировались представления о строении и функциях белков, необходимых для катализа (ферменты) и регуляции (регуляторные белки, пептидные гормоны) важнейших молекулярно-генетических процессов.

В конце 70-х, начале 80х годов XX в. выясняются механизмы сплайсинга (В. Келлер и др.),
происходит открытие РНК-ферментов (рибозимов) и аутосплайсинга (Т. Чек),
исследуются механизмы генетической рекомбинации и подвижные генетические элементы (Д. Хогнесс, Г.П. Георгиев),
ведутся работы в области исследования структуры ферментов и биологических мембран (Ю.А. Овчинников),
начинаются работы по расшифровке структуры геномов высших организмов (включая геном человека),
создаются основы новых (генно-инженерных) биотехнологий,
обнаруживаются и синтезируются каталитически активные антитела (абзимы),
возникает белковая инженерия.

Взаимосвязь молекулярной биологии с науками, составляющими современную физико-химическую биологию



Развитие молекулярной биологии привело к возникновению в начале 80х годов XX в. новой науки – **биоинформатики** (вычислительной биологии, компьютерной генетики), возникшей на стыке молекулярной генетики и информатики.

Связано с появлением быстрых *методов определения нуклеотидных последовательностей ДНК*, разработанных в 1975-1976 гг. *Ф. Сенгером и А. Коулсоном*, а также *А. Максамом и У. Гилбертом*.

В 1982 г. были организованы банки нуклеотидных последовательностей: Gen Bank в США и EMBL в Европе, в которых концентрировалась информация о расшифрованных нуклеотидных последовательностях ДНК различных организмов.

Биоинформатика решает ряд важных молекулярно-биологических проблем:

- Статистический анализ нуклеотидных последовательностей ДНК;
- Предсказание функций по первичной структуре биополимеров (ДНК, РНК, белков);
- Анализ (моделирование) пространственной структуры белков и нуклеиновых кислот;
- Теория молекулярной эволюции и систематики.

Прогресс в области определения нуклеотидных последовательностей (секвенирования) ДНК различных организмов

- Секвенирован первый бактериальный геном (1995);
- Геном дрожжей (1997);
- Геном нематоды (1998);
- Геном дрозофилы и почти полностью геном человека (2000)

Привел к возникновению *геномики* – науки, изучающей наборы всех генов данного организма как единое целое.

Одновременно возникла *протеомика* – наука, исследующая полные наборы белков, функционирующих на различных этапах развития организма.

Задачи молекулярной биологии:

- Расшифровка структуры геномов;
- Создание банков генов;
- Геномная дактилоскопия;
- Изучение молекулярных основ эволюции, дифференцировки, биоразнообразия, развития и старения, канцерогенеза, иммунитета и др;
- Создание методов диагностики и лечения генетических болезней, вирусных заболеваний;
- Создание новых биотехнологий производства пищевых продуктов и разнообразных биологически активных соединений (гормонов, антигормонов, релизинг-факторов, энергоносителей и др.).

Методы молекулярной биологии

1. Микроскопия – световая, электронная, сканирующая электронная микроскопия

Электронная микроскопия позволяет обычно различать объекты размером около 2 нм (предел разрешения до 0,1 нм) – имеет широкое применение для изучения структур вирусов, внутриклеточных органелл, белково-нуклеиновых комплексов (хроматин, рибосомы) и отдельных белковых молекул.

В том числе криоэлектронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия.



Рисунок. Растровый электронный микроскоп Quanta 200 (FEI Company, США)

2. Рентгеноструктурный анализ – основан на дифракции рентгеновских лучей (электромагнитного излучения с длиной волны около 10^{-10} м); позволяет выявить трехмерное расположение атомов в молекулах (разрешение составляет менее 0,1 нм).

3. Радиоактивные изотопы – широко используются для изучения нуклеиновых кислот, белков, углеводов и других молекул в живой клетке.

Радиоизотопы нестабильны и подвергаются спонтанному распаду, при котором либо высвобождаются заряженные частицы – электроны, либо происходит гамма-излучение. Период полураспада варьирует от короткого, например, у изотопа ^{32}P (14 сут), до очень протяженного, у ^{14}C (5570 лет).

Электроны определяют по ионизации газа в сцинтилляционном счетчике Гейгера, либо методом радиоавтографии (по их воздействию на серебро, содержащееся в чувствительном фотоэмульсионном слое).

4. Ультрацентрифугирование – (седиментационный анализ).
Широкое распространение получило после 1926 г.
(изобретение аналитической ультрацентрифуги Т.
Сведбергом, с помощью которой впервые им была
определена молекулярная масса гемоглобина).

Скорость седиментации (осаждения) определяется размером и формой разделяемых компонентов и выражается коэффициентом седиментации S .

Коэффициент седиментации измеряется в секундах, однако коэффициенты седиментации обычно представляют собой очень малые значения и поэтому выражаются в единицах Сведберга (S): $1S = 1 \cdot 10^{-13}$.

Н., коэффициент седиментации молекулы гемоглобина составляет $4,5 S$, молекулы тРНК – $4S$, рибосомы кишечной палочки – $70S$, лизосомы – $9400S$.

В 40-50-е годы XX в. А.Клод и Ж.Браше разработали *метод дифференциального центрифугирования* для разделения органелл клетки, с помощью которого де Дюв впервые выделил лизосомы (1953), а затем пероксисомы.

1957 – М. Месельсон, У. Сталь, Дж. Виноград разработали *метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия* для разделения нуклеиновых кислот, с помощью которого было установлено, что репликация ДНК осуществляется полуконсервативным путем.

5. Методы фракционирования белков

А. Хроматография – ионообменная, гель-хроматография, аффинная хроматография (хроматография по сродству), высокоэффективная жидкостная хроматография.

Б. Электрофорез – в основе метода лежит способность белков, обладающих определенным суммарным положительным или отрицательным зарядом, перемещаться в электрическом поле в соответствии с величиной заряда, размером и формой молекул.

6. Культура клеток – метод берет начало с 1885 г.

(Вильгельм Ру)

В настоящее время используют диссоциированные культуры клеток, из которых можно получить клетки одного типа.

Клеточные линии служат источником большого количества клеток одного типа, могут храниться при $\sim -70^\circ$ С неопределенно долго, не теряя способности в пролиферации.

Наиболее часто используются клеточные линии фибробластов мышей и хомячков, а также эпителиальные клетки человека.

7. Моноклональные антитела – чувствительный инструмент выявления (идентификации) молекул в сложных смесях, находит широкое применение.

Клетки позвоночных животных способны синтезировать до 10^8 различных форм антител, отличающихся участками узнавания антигенов.

Метод включает клонирование В-лимфоцитов, секретирующих определенный вид антител, благодаря чему антитела можно получать в больших количествах.

С целью увеличения время жизни В-клетки проводят их слияние с клетками, происходящими от опухоли, полученной из В-лимфоцитов.

Клетки-гибриды, способные развиваться в культуре и синтезировать антитела, называют *гибридомами*.